

Inibidores de Mieloperoxidase como Candidatos a Fármacos Anti-Inflamatórios

Myeloperoxidase Inhibitors as Anti-Inflammatory Drug Candidates

Rômulo Pereira de Jesus,^a  Leticia de Souza Fraga,^b Bárbara Abraham Vieira,^{b,#} Maria Letícia de C. Barbosa,^{a,*} 

^aUniversidade Federal do Rio de Janeiro, Faculdade de Farmácia, Departamento de Fármacos e Medicamentos, Laboratório de Síntese Orgânica e Química Medicinal (LaSOQuiM), Av. Carlos Chagas Filho 373, Centro de Ciências da Saúde, Bloco A subsolo, sala 34, Cidade Universitária, CEP 21941-902, Rio de Janeiro-RJ, Brasil.

^bUniversidade Federal do Rio de Janeiro, Faculdade de Farmácia, Departamento de Fármacos e Medicamentos, Laboratório de Modelagem Molecular & QSAR (ModMolQSAR), Av. Carlos Chagas Filho 373, Centro de Ciências da Saúde, Bloco L subsolo, Cidade Universitária, CEP 21941-902, Rio de Janeiro-RJ, Brasil

*E-mail: marialeticia@pharma.ufrj.br
barbaraabraham@pharma.ufrj.br

Recebido em: 14 de Junho de 2021

Aceito em: 15 de Setembro de 2021

Publicado online: 18 de Março de 2022

Myeloperoxidase (MPO) is an enzyme directly linked to innate immune responses and inflammation, which belongs to the hemeperoxidase family and is expressed in granulated leukocytes, mainly neutrophils. Once released from these granules, MPO is responsible for the production of highly reactive molecules, such as free radicals and hypochlorous acid (HClO), which contribute to the elimination of pathogens in infections and to the induction of tissue damage in sites of inflammation. Since the increase in MPO activity is associated with the establishment and progression of several inflammatory diseases, this enzyme is recognized as a promising therapeutic target for the treatment of several chronic inflammatory, cardiovascular, neurodegenerative and autoimmune diseases. Despite this, to date, no drug has been approved on the market as a MPO inhibitor. This review offers a description of the key characteristics and properties of MPO, presenting the main structural patterns already described for its' inhibition by micromolecules. In addition to reviewing and updating the topic, this paper provides a useful overview of structural information for further design of new chemical entities as MPO inhibitors.

Keywords: Myeloperoxidase; MPO; inflammation; anti-inflammatory; inhibitors; medicinal chemistry; drugs.

1. Mieloperoxidase: Função Fisiológica, Estrutura e Atividade Catalítica

A enzima mieloperoxidase (MPO) desempenha um papel central nas respostas imunológicas inatas e nos processos inflamatórios,¹ atuando não apenas na defesa inata do hospedeiro via indução eficiente da morte de diferentes patógenos, mas contribuindo adicionalmente para o dano tecidual progressivo em quadros inflamatórios crônicos.² Isso ocorre uma vez que o mecanismo de defesa mediado pela MPO não é seletivo aos patógenos, exercendo um efeito citotóxico também nas células do tecido hospedeiro e causando assim lesão tecidual.³

A MPO é expressa majoritariamente em neutrófilos,⁴ leucócitos polimorfonucleares que compõe parte da resposta inata do sistema imune,³ sendo projetada para o vacúolo quando há a fagocitose de um agente patogênico por estas células.⁵ A MPO corresponde a cerca de 2-5% do conteúdo total de proteínas nos neutrófilos. Monócitos humanos também possuem conteúdo granular rico em MPO, embora em menor quantidade que os neutrófilos, sendo essa característica perdida durante a sua diferenciação em macrófagos.⁶

A MPO é uma enzima catiônica composta, basicamente, por duas subunidades idênticas ligadas por uma ponte bissulfeto, com peso molecular de 144 kD (Figura 1). Cada uma dessas subunidades é constituída por uma cadeia leve, com 108 aminoácidos, e uma cadeia pesada, com 466 aminoácidos.^{7,8}

A MPO pertencente à família das hemeperoxidases e age convertendo íons haleto (X⁻, e.g. Cl⁻ e Br⁻) presentes no conteúdo granular em suas respectivas formas de HOX, utilizando para tal o peróxido de hidrogênio (H₂O₂) como substrato.^{7,10} Dentre os compostos formados, existe um que possui notória ação no dano tecidual: o ácido hipocloroso (HOCl), que, ao entrar em contato com tecidos, pode levar a reações irreversíveis com biomacromoléculas, danificando extensamente os mesmos.¹¹

Os mecanismos de catálise da MPO são relativamente complexos, envolvendo transferência de elétrons entre o grupamento heme da enzima e diferentes substratos biológicos, o que leva à formação de espécies muito reativas, como radicais livres e oxidantes citotóxicos.⁶

A MPO contém um grupamento prostético heme, em que os nitrogênios presentes nos quatro anéis heterocíclicos de um núcleo porfirínico ligam-se a um átomo de ferro central para formar a esfera interna de coordenação, que é essencial para a atividade catalítica da enzima.

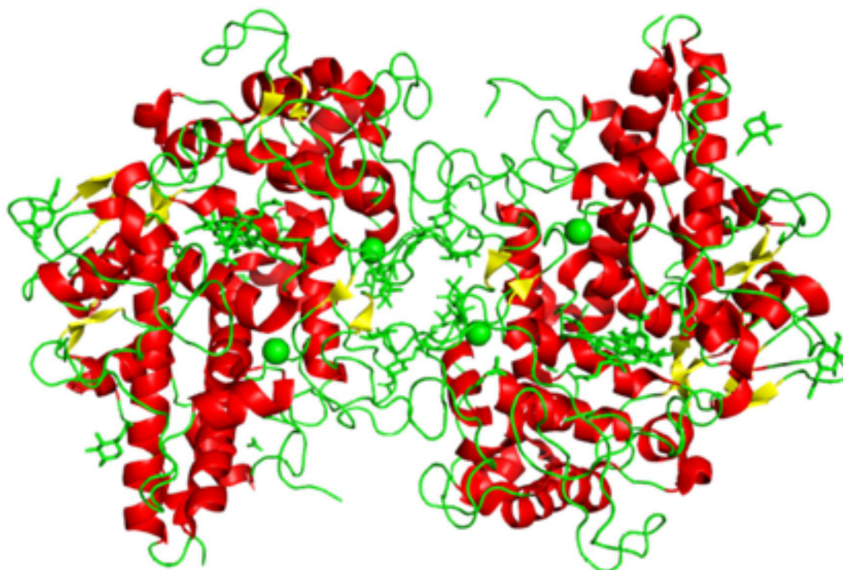


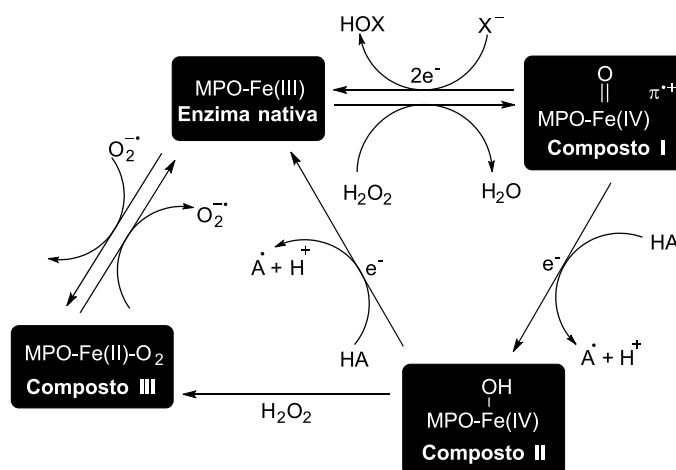
Figura 1. Representação da estrutura tridimensional da enzima mieloperoxidase (MPO) obtida a partir da estrutura cristalográfica de código 4C1M,⁹ disponível no banco de dados *Protein Data Bank* (PDB; <https://www.rcsb.org/>). Imagem gerada no programa Pymol

A MPO no estado nativo (como é secretada), apresenta o átomo de ferro com NOX 3+ [MPO-Fe(III)] (Esquema 1).¹⁰

A atividade catalítica da MPO abrange duas vias principais, o ciclo de halogenação e o ciclo de peroxidação (Esquema 1). Em ambos os casos, a [MPO-Fe(III)] é oxidada para formar o intermediário convencionalmente denominado Composto I, o qual possui dois elétrons a menos que a forma nativa, havendo duas possibilidades para que a enzima seja convertida novamente a seu estado nativo. Esses elétrons podem ser obtidos tanto por uma única etapa, através de uma reação redox com íons haletos ou pseudohaletos (ciclo de halogenação) ou por duas etapas sucessivas de um elétron (ciclo de peroxidação).¹²

Conforme ilustrado no Esquema 1, na primeira etapa, a enzima nativa [MPO-Fe(III)] reage de forma rápida e reversível com H₂O₂ para gerar o intermediário nomeado como Composto I, um intermediário oxidado com dois elétrons a menos, o qual contém um grupo Fe(IV)=O e um π cátion radical porfirínico estabilizado por ressonância.^{6,13,15}

No ciclo de halogenação (Esquema 1), o Composto I pode reagir com haletos (X⁻) presentes no meio, como, por exemplo, íons Cl⁻ e Br⁻, ou com pseudohaletos (SCN⁻), gerando os correspondentes ácidos HOX e reduzindo a enzima novamente ao estado nativo [MPO-Fe(III)].^{6,13-15} Ou seja, ao utilizar o haletos X⁻ como um cosubstrato na presença de peróxido de hidrogênio (H₂O₂), o Composto I é



Esquema 1. Ciclo catalítico da enzima MPO: A enzima nativa [MPO-Fe(III)] reage de forma rápida e reversível com H₂O₂ para gerar o Composto I, um intermediário oxidado com dois elétrons a menos. No ciclo de halogenação, o Composto I pode reagir com haletos (X⁻) presentes no meio, gerando os correspondentes ácidos HOX e reduzindo a enzima novamente ao estado nativo [MPO-Fe(III)].

No ciclo de peroxidação, o Composto I é inicialmente convertido em Composto II por uma reação de redução por um elétron, seguida de uma nova etapa de redução por um elétron ao estado nativo da enzima [MPO-Fe(III)]. Em sua atividade peroxidase, a MPO catalisa, então, a oxidação de diferentes substratos orgânicos, enquanto o grupo heme é reduzido em duas etapas sequenciais de redução por um elétron ao estado nativo, passando pela formação do intermediário Composto II. Uma via catalítica menos relevante para a atividade enzimática da MPO compreende a formação do Composto III, gerado em determinadas condições na presença de peróxido ou superóxido.

capaz de gerar oxidantes HOX. Em condições fisiológicas, o cosubstrato com maior afinidade pela enzima é o íon cloreto, sendo o ácido hipocloroso (HOCl), uma espécie muito reativa com potente efeito antimicrobiano, o principal produto deste tipo de reação. Além de contribuir significativamente para o dano tecidual no tecido inflamado, o HOCl também está diretamente envolvido na formação de novas espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, contribuindo para amplificar o estresse oxidativo característico do processo inflamatório.^{6,13}

Por sua vez, no ciclo de peroxidação (Esquema 1), o Composto I é inicialmente convertido em Composto II por uma reação de redução por um elétron, seguida de uma nova etapa de redução por um elétron que origina o estado nativo da enzima [MPO-Fe(III)].^{6,13} Através de sua atividade peroxidase, a MPO catalisa, então, a oxidação de diferentes substratos orgânicos, enquanto o grupo heme é reduzido em duas etapas sequenciais de redução por um elétron ao estado nativo, passando pela formação do Composto II, conforme mencionado.¹⁵ A etapa de conversão do Composto II em [MPO-Fe(III)] corresponde à etapa limitante de velocidade no ciclo de peroxidação.¹³ Uma via catalítica menos relevante para a atividade enzimática da MPO compreende a formação do Composto III, gerado em determinadas condições na presença de peróxido ou superóxido. A presença de superóxido nos neutrófilos afeta diretamente o ciclo catalítico, levando à rápida formação do Composto III. O superóxido, além disso, reage com o Composto II, aumentando a atividade clorinante da enzima.¹³

2. A MPO como um Biomarcador em Processos Inflamatórios Crônicos e seu Potencial como Alvo Terapêutico

Devido ao seu papel de destaque no estresse oxidativo e no dano tecidual progressivo característicos de processos inflamatórios crônicos,¹⁻³ inúmeros estudos científicos tem se debruçado sobre a utilidade da MPO como um alvo terapêutico promissor no tratamento de diversas doenças inflamatórias.¹⁶ Sua importância é demonstrada pela sua caracterização como um biomarcador em tecidos inflamados de doentes acometidos por diferentes enfermidades, e.g. aterosclerose,¹⁷ doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC)¹⁸ e doença de Alzheimer (DA).¹⁹

2.1. Aterosclerose

A aterosclerose é caracterizada por sua patogênese multifatorial, a qual envolve uma disfunção endotelial vascular, o estabelecimento de alterações oxidativas e inflamatórias e a modificação de lipoproteínas.^{20,21} O papel da MPO no estabelecimento da doença é evidenciado pela presença da enzima e seus múltiplos produtos de oxidação nas lesões ateroscleróticas.^{7,20} Ademais, WONG e

colaboradores relataram que pessoas com níveis aumentados de MPO apresentam um maior risco de sofrer algum evento cardiovascular, sendo a MPO um importante biomarcador para detectar a vulnerabilidade da placa aterosclerótica.²²

O aparecimento da aterosclerose passa pela oxidação e acúmulo da lipoproteína de baixa densidade (do inglês, *low density lipoprotein* - LDL) na íntima arterial. Consequentemente, há a ativação de uma série de vias pró-inflamatórias no local, culminando na produção e liberação de uma grande variedade de citocinas, quimiocinas e outros mediadores envolvidos no desenvolvimento e crescimento das placas de ateroma.²³ A MPO é uma das enzimas mediadoras da inflamação e do estresse oxidativo na aterogênese, participando na oxidação das moléculas de LDL.²⁴ As lipoproteínas de baixa densidade, quando oxidadas, desencadeiam o recrutamento e acúmulo de leucócitos, a lesão do tecido vascular, bem como a formação de células esponjosas nas paredes dos vasos.^{21,24} Adicionalmente, a MPO também pode estar envolvida no estabelecimento da disfunção endotelial, uma vez que utiliza o óxido nítrico como um de seus substratos, o qual tem uma potente ação ateroprotetora. No entanto, uma das características mais marcantes da MPO e do seu produto principal HOCl continua sendo a sua capacidade de ativar as metaloproteinases da matriz (do inglês, *matrix metalloproteinases* - MMPs), que são responsáveis por promover a desestabilização da placa aterosclerótica.²¹

Por sua vez, as lipoproteínas de alta densidade (do inglês, *high density lipoproteins* - HDL), quando funcionais, são essenciais para impedir o desenvolvimento da doença cardiovascular aterosclerótica. Esse efeito antiaterosclerótico ocorre principalmente devido à ação da apolipoproteína A1, principal componente proteico da HDL no plasma, que possui a capacidade de remover o excesso de colesterol dos tecidos periféricos, como a parede de vasos, facilitando assim, a excreção de colesterol. Estudos recentes demonstraram que a HDL também sofre oxidação pela MPO, gerando modificações nos resíduos de tirosina da apolipoproteína A1, as quais prejudicam a funcionalidade do transporte reverso de colesterol, e, consequentemente, contribuindo para a formação das placas ateroscleróticas.^{8,20,25}

2.2. Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica (DPOC)

A doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC) não é uma doença isolada, mas um termo genérico empregado para descrever doenças pulmonares crônicas que geram limitações ou impedimentos no fluxo aéreo pulmonar, respectivamente, falta de ar, produção excessiva de muco e tosse crônica, sendo caracterizadas pela inflamação das vias aéreas.^{26,27} Termos mais populares, como “bronquite crônica” e “enfisema”, não são mais usados, mas agora estão incluídos no diagnóstico de DPOC. Exacerbações agudas da DPOC subjacente são uma causa comum de deterioração respiratória.^{28,29}

A DPOC provavelmente continuará sendo um importante problema de saúde no futuro. Com fatores de risco praticamente inalterados, devido ao crescimento populacional em países desenvolvidos e um crescimento significativo de “doenças e agravos não transmissíveis (DANTs)” em países de baixa renda, estima-se que a incidência da DPOC seguirá aumentando nos próximos anos, resultando em um crescente ônus social e econômico.³⁰ O estudo sobre a carga global da doença (do inglês, *Global Burden of Disease - GBD*) reporta uma prevalência de 251 milhões de casos de DPOC em 2016, e estima que 3,17 milhões de mortes foram causadas pela doença em 2015, ou seja, 5% de todas as mortes mundialmente naquele ano.³¹ Projeções preveem que a DPOC poderá se tornar a terceira principal causa de morte em todo o mundo até 2030.³²

As causas que levam ao desenvolvimento da DPOC estão ligadas a dois fatores principais, a saber: pré-disposição genética e exposição ambiental. Na fase adulta, o tabagismo é a causa mais importante da DPOC. A fumaça inalada atua em conjunto com a suscetibilidade do usuário e com outros fatores ambientais para resultar na DPOC em 15% de todos os fumantes. A fumaça do cigarro inalada é considerada como o ponto de partida, desencadeando a liberação de espécies oxidantes e proteases nas vias aéreas e em células residentes no pulmão, com dano crônico sequencial aos alvéolos, juntamente com inflamação peribrônquica e hiperplasia de células secretoras de muco, culminando nas consequências da síndrome clínica conhecida como DPOC.^{33,34}

A MPO é considerada um biomarcador e um alvo terapêutico de interesse na DPOC por vários motivos.^{10,35} Uma vez que a DPOC é caracterizada pela inflamação das vias aéreas, uma análise dos componentes do escarro possibilita a quantificação não invasiva da progressão da inflamação local. A MPO presente no escarro dos pacientes pode ser quantificada e usada como biomarcador não invasivo da atividade dos neutrófilos, refletindo a gravidade ou o prognóstico da DPOC.³⁶⁻³⁹

Os níveis séricos de MPO estão relacionados à diminuição acelerada da função pulmonar e ao aumento do risco de mortalidade cardiovascular.⁴⁰ As espécies oxidantes geradas pela MPO são capazes de oxidar uma ampla variedade de substratos, incluindo os componentes químicos da fumaça do cigarro e também as diversas biomacromoléculas do tecido pulmonar e vascular do paciente. Estudos em animais demonstraram que a inibição da MPO por uma micromolécula pode deter a progressão das alterações induzidas pelo fumo, incluindo o enfisema, o remodelamento das vias aéreas e remodelação arterial pulmonar, mesmo quando o inibidor é fornecido de forma tardia após a exposição contínua à fumaça do cigarro.^{41,42}

2.3. Doença de Alzheimer (DA)

A demência é um termo genérico empregado para designar doenças que afetam o ser humano de forma similar, comprometendo a memória, habilidades cognitivas

e o comportamento. Quase sempre estas doenças são progressivas, ou seja, pioram no decorrer do tempo, interferindo na qualidade de vida do paciente e dificultando atividades corriqueiras. Dentre as demências, a mais comum é a doença de Alzheimer (DA).⁴³ A Associação Brasileira de Alzheimer estima que mais de 1 milhão de brasileiros convivem com a DA e prevê que até 2030, ano no qual a população acima de 60 anos ultrapassará a população na faixa de 0 a 14 anos, esse número terá dobrado.⁴⁴

A DA é uma desordem neurodegenerativa caracterizada principalmente pela presença de emaranhados neurofibrilares intracelulares compostos pela proteína tau e por placas extracelulares contendo peptídeo β -amilóide.⁴⁵⁻⁴⁷

A MPO está normalmente ausente no parênquima cerebral, mas, em pacientes com DA, esta enzima pode ser encontrada em macrófagos ativos da micróglia em torno das placas amiloides.⁴⁸ Em estudo realizado por GELLHAAR e colaboradores, a análise de amostras de córtex cerebral de pacientes com DA permitiu a identificação de células com expressão aumentada de MPO nas proximidades dos vasos sanguíneos de áreas com uma extensa neurodegeneração.⁴⁹ A colocalização da MPO com os agregados β -amilóides e com as áreas de neurodegeneração^{49,50} permite a sua caracterização como um biomarcador da DA.

3. Inibidores de MPO como Novos Candidatos a Fármacos Anti-Inflamatórios

Embora a MPO já seja reconhecida como um importante alvo terapêutico para o tratamento de diversas doenças inflamatórias, até o momento não existe no mercado farmacêutico um inibidor aprovado para uso clínico. Dentre os inibidores conhecidos, diversas substâncias anti-inflamatórias são capazes de inibir reversivelmente a MPO, requerendo, no entanto, concentrações elevadas para uma inibição significativa. Por outro lado, alguns potentes inibidores de MPO já descritos apresentam uma toxicidade elevada que inviabiliza seu emprego terapêutico.¹³ Assim sendo, diferentes grupos de pesquisa têm se dedicado a encontrar novos inibidores de MPO com eficácia clínica e segurança adequadas.⁵¹ No entanto, devido à complexidade do mecanismo catalítico da enzima alvo (Esquema 1), a busca por um inibidor seguro e eficaz ainda representa um grande desafio para os pesquisadores da área.¹³ Para que uma micromolécula inibidora de MPO seja considerada um candidato a fármaco ideal, esta deve apresentar algumas características importantes, como estabilidade química e viabilidade sintética, além de um potente efeito inibitório e uma biodisponibilidade aceitável, garantindo assim eficácia adequada com mínimos efeitos adversos, para assegurar a sua segurança clínica.²⁵

Os inibidores de MPO já descritos na literatura nas últimas quatro décadas, podem ser agrupados de acordo com seu mecanismo de inibição da enzima em três categorias principais: *i*) inibidores que promovem o acúmulo do

Composto II, os quais correspondem a substratos fracos do ciclo de peroxidação, ou seja, conseguem reagir rapidamente com o Composto I e lentamente com o Composto II, promovendo, por isso, o acúmulo do último; *ii*) os inibidores irreversíveis, também denominados substratos suicidas, os quais, quando oxidados pela MPO, promovem a inativação por modificação estrutural da enzima; e *iii*) os inibidores reversíveis, que se ligam reversivelmente à enzima nativa.^{7,13,51}

Particularmente, a inibição *in vitro* da MPO por substratos fracos do ciclo de peroxidação, resultando em acúmulo do Composto II, provavelmente não é capaz de refletir em um efeito terapêutico útil, uma vez que outros substratos naturais de peroxidação estão presentes em abundância em condições fisiológicas, permitindo a rápida conversão do Composto II em enzima nativa.⁷ Por isso, para que um inibidor com este mecanismo seja promissor, é necessário que esta substância forme um complexo estável com o Composto II, evitando a sua conversão à enzima nativa.¹³

Pesquisas buscaram também descobrir inibidores endógenos da MPO, identificando a proteína plasmática ceruloplasmina como um inibidor de MPO *in vitro*, estando a CI_{50} entre 25 e 50 nM.⁵² No entanto, não existem até o momento evidências claras do seu efeito inibitório *in vivo*. O mecanismo inibitório proposto para a ação da ceruloplasmina baseia-se na associação das duas proteínas (MPO-ceruloplasmina), sendo a ceruloplasmina capaz de reduzir o Composto I a Composto II, retardando a subsequente redução do Composto II de volta para a MPO nativa (*vide* Esquema 1).^{52,53}

3.1. Substratos fracos do ciclo de peroxidação

3.1.1. Melatonina

A melatonina (**1**, Figura 2) é o principal hormônio secretado pela glândula pineal e está envolvida na regulação dos ritmos circadianos, sono, humor e outras funções ainda não totalmente elucidadas, tendo um aumento em sua concentração sérica durante a noite, devido à escuridão, e um declínio durante o dia, induzido pela luz. É utilizada na clínica para tratar distúrbios do sono e enxaquecas.⁵⁴

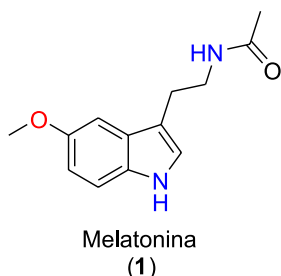


Figura 2. Estrutura química da melatonina (1)

Pesquisas demonstraram a ação inibitória de **1** frente à MPO para ambas as atividades catalíticas.⁵⁵ Avaliação

in vitro evidenciou que o aumento da concentração de melatonina (**1**) no meio diminui a taxa de consumo de H_2O_2 no ciclo de peroxidação, pois desencadeia a formação de um complexo melatonina-MPO inativo. Por sua vez, em ensaios na presença de íon cloreto, referentes ao ciclo de halogenação, evidenciou-se também um aumento significativo da interação entre a melatonina e a MPO, logo, favorecendo o equilíbrio para a formação de complexo melatonina-MPO inativo. Tal fato foi justificado pela hipótese de o cloreto interagir com a enzima causando modificações estruturais que possibilitam uma melhor interação enzima-melatonina, amplificando a atividade inibitória esperada sobre a MPO.^{55,56}

A melatonina (**1**) inibe a atividade catalítica da MPO promovendo o acúmulo do Composto II, apresentando assim um ciclo semelhante ao esperado para um substrato fraco (*vide* Esquema 1). Em testes *in vitro*, foi determinada a concentração inibitória média (CI_{50}) de 18 μ M. A melatonina (**1**) não consegue modular adequadamente a atividade da MPO em condições fisiológicas, uma vez que suas concentrações *in vivo* não são suficientes para observação do referido efeito. No entanto, buscar compreender como a estrutura de **1** interage com a MPO é relevante visando incrementar o conhecimento sobre as micromoléculas capazes de serem reconhecidas de maneira complementar por esta enzima, fornecendo informações estruturais úteis para o planejamento de novos inibidores.^{55,57}

3.1.2. Derivado 3-(aminoalquil)-5-fluoroindólicos

A série de análogos 3-(aminoalquil)-5-fluoroindólicos (**3a-y**) foi desenvolvida e sintetizada a partir de informações estruturais obtidas pelos estudos de *docking* molecular com a 5-fluorotriptamina (**2**), um inibidor já conhecido da MPO. Duas estratégias foram utilizadas para construir essa nova série de análogos: variar o comprimento da cadeia lateral amino alquila de **2** e adicionar substituintes de diferentes tamanhos no grupo amino da cadeia lateral (Figura 3).²⁵

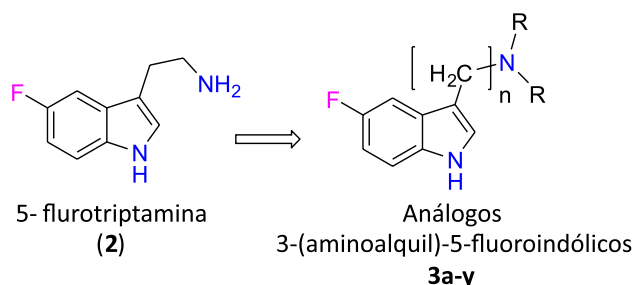


Figura 3. Modificação estrutural do precursor 5-fluorotriptamina (2) para o planejamento de novos candidatos a inibidores indólicos de MPO **3a-y**²⁵

Para a nova série de análogos, o estudo de relação estrutura-atividade (do inglês, *Structure-Activity Relationship* - SAR) demonstrou que a distância entre o anel indol e o átomo de nitrogênio da alquilamina é um importante parâmetro para a interação e a consequente inibição da enzima MPO. A observação das poses de

docking obtidas para os derivados **3a**, **3b** e **3c** ($n = 1$) indicou que, por conta da cadeia lateral alquila curta, o nitrogênio protonado da amina não consegue se aproximar do resíduo de aminoácido Glu102, que é negativamente carregado, para formar uma ponte salina.²⁵

Utilizando-se como referência a SAR para as aminas não substituídas **3a**, **3d**, **3m**, **3v**, **3w** e **3y** (Tabela 1), o efeito da homologação na cadeia alquila fica bastante evidente, com uma redução gradativa dos valores de CI_{50} em consequência do aumento da cadeia alquila para os derivados **3a** ($n = 1$, $CI_{50} = 0,9 \mu M$), **3d** ($n = 2$, $CI_{50} = 0,2 \mu M$), **3m** ($n = 3$, $CI_{50} = 0,05 \mu M$), **3v** ($n = 4$, $CI_{50} = 0,015 \mu M$), **3w** ($n = 5$, $CI_{50} = 0,008 \mu M$). Por sua vez, para **3y**, com cadeia alquila de 6 carbonos, foi observado que o valor de CI_{50} volta a aumentar ($CI_{50} = 0,26 \mu M$). Os resultados de maior potência inibitória para esta série congênera de derivados foram aqueles descritos para **3v** e **3w**, contendo uma amina primária e uma cadeia alquila com 4 e 5 carbonos, respectivamente.²⁵

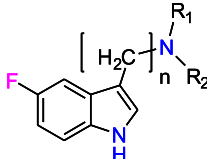
No caso dos derivados com cadeia alquila de 2 e 3 carbonos, foi visto que a substituição do grupo amino com substituintes alquila mais volumosos também resulta em redução da potência inibitória (Tabela 1), a exemplo dos resultados obtidos para os derivados **3h** ($n = 2$, $R_1 = C_4H_9$, $R_2 = H$, $CI_{50} = 1,03 \mu M$) e **3q** ($n = 3$, $R_1 = C_4H_9$, $R_2 = H$, $CI_{50} = 1,5 \mu M$).²⁵

No que diz respeito ao mecanismo de inibição enzimática descrito para série em questão, os derivados são considerados doadores de elétrons, atuando no ciclo de peroxidação. Como o Composto I é um oxidante mais forte que o Composto II, os inibidores são rapidamente oxidados por este. Sendo assim, o Composto I é reduzido a Composto II, gerando um acúmulo do último (*vide* Esquema 1).^{13,25}

Devido a este alto potencial de redução do Composto I, os inibidores descritos acabam deslocando a atividade enzimática da MPO do ciclo de cloração para o ciclo de peroxidação, prevenindo a ação da MPO na formação de ácidos HOX a partir de íons haleto, uma vez que promovem o acúmulo do Composto II e, por consequência diminuem a quantidade de enzima nativa e Composto I, os quais são os grandes responsáveis pelos danos oxidativos por meio da atividade clorinante da enzima.²⁵

Apesar desta nova série de derivados indólicos apresentar pronunciada inibição da MPO *in vitro*, estes derivados também inibiram o transportador SERT (do inglês, *serotonin transporter*), devido às semelhanças estruturais entre esses inibidores e o neurotransmissor serotonina (**4**, *vide* Figura 4). Sendo assim, foram desenvolvidos análogos estruturais otimizados mais seletivos para a inibição da MPO.²⁵ As estratégias utilizadas para desenvolver essa nova série incluíram: *i*) variações na natureza e na posição do grupo retirador de elétrons do sistema indólico; *ii*) alquilação do grupamento amino ou ainda substituição do grupo amino básico da cadeia lateral por outros grupos, sendo esta última modificação importante para diminuir a inibição de SERT por estas novas substâncias. A maioria dos compostos

Tabela 1. Padrão de substituição e valores de CI_{50} (μM) obtidos para a série de derivados 3-(aminoalquil)-5-fluoroindólicos desenvolvidos como inibidores de MPO.²⁵



Análogos
3-(aminoalquil)-5-fluoroindólicos
3a-y

Derivado	n	R ₁	R ₂	CI ₅₀ (μM)
3a	1	H	H	0,9±0,3
3b	1	C ₂ H ₅	C ₂ H ₅	0,2±0,2
3c	1	<i>N</i> -metilpiperazinil		1,0±0,1
3d	2	H	H	0,20±0,3
3e	2	CH ₃	H	0,20±0,02
3f	2	C ₂ H ₅	H	0,3±0,1
3g	2	C ₃ H ₇	H	0,80±0,02
3h	2	C ₄ H ₉	H	1,03±0,08
3i	2	CH ₃	CH ₃	0,09±0,06
3j	2	C ₂ H ₅	C ₂ H ₅	0,16±0,08
3k	2	Pirrolidinil		0,04±0,03
3l	2	<i>N</i> -metilpiperazinil		0,2±0,1
3m	3	H	H	0,050±0,008
3n	3	CH ₃	H	0,2±0,2
3o	3	C ₂ H ₅	H	0,3±0,1
3p	3	C ₃ H ₇	H	0,17±0,08
3q	3	C ₄ H ₉	H	1,5±0,5
3r	3	CH ₃	CH ₃	0,13±0,09
3s	3	C ₂ H ₅	C ₂ H ₅	0,35±0,09
3t	3	Pirrolidinil		0,32±0,01
3u	3	<i>N</i> -metilpiperazinil		0,35±0,06
3v	4	H	H	0,015±0,004
3w	5	H	H	0,008±0,002
3y	6	H	H	0,26±0,01

dessa nova série de análogos apresentou interações do tipo π -stacking com um anel pirrólico do grupo prostético heme da enzima, bem como interações do tipo ligação de hidrogênio e/ou pontes salinas com o resíduo de aminoácido Glu102. Dentre os análogos otimizados, o derivado **5** (Figura 4) foi o que obteve a combinação de maior seletividade pela MPO em comparação com o transportador SERT (índice de seletividade K_i SERT/ CI_{50} MPO igual a 35) e maior potência inibitória (CI_{50} igual a 18 nM).^{25,58}

Conforme ilustrado na Figura 4, é possível observar a analogia estrutural existente entre o neurotransmissor serotonina (**4**) e o análogo 3-aminoalquila **3v**, justificando a modificação estrutural deste último com introdução do grupamento amida não protonável no derivado **5** para assegurar maior seletividade na inibição da MPO e uma

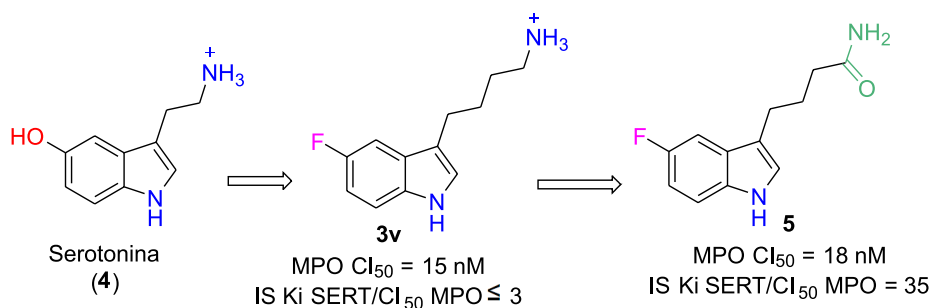


Figura 4. Analogia estrutural entre o neurotransmissor serotonina (4) e o análogo 3-aminoalquila 3v, justificando a modificação estrutural deste último ao análogo 5, mais seletivo⁵⁸

redução do efeito frente ao transportador SERT. Com relação a seu mecanismo de ação, espera-se que o inibidor 5 se comporte de maneira semelhante a sua série precursora, promovendo o acúmulo do Composto II, porém seu mecanismo ainda está em discussão e não foi totalmente elucidado.⁵⁸

3.1.3. Bis-arilalquilaminas

A classe de inibidores bis-arilalquilaminas foi identificada empregando-se a técnica de triagem virtual a partir de uma quimioteca de substâncias-teste. Nesta triagem, o derivado fenólico 6 (Figura 5) foi inicialmente identificado como um potencial inibidor de MPO, apresentando, *a posteriori*, efeito inibitório *in vitro* com CI_{50} igual a 0,5 μ M. Ademais, ALDIB e colaboradores (2012) sugeriram que os inibidores identificados atuam por transferência de elétrons, favorecendo a formação do Composto II e, conseqüentemente, deslocando a MPO do ciclo de cloração para o ciclo peroxidase.⁵⁹

Nos estudos de *docking* molecular, a pose com melhor pontuação obtida para 6 apresentou complementariedade com a MPO por meio de interações do tipo π -stacking do anel fenólico A (Figura 5) de 6 com o anel pirrol do grupamento heme da enzima, além da formação de uma ligação hidrogênio entre o grupo OH deste grupamento fenólico e o resíduo de aminoácido Arg239. Foram descritos também uma interação iônica entre o resíduo de aminoácido Glu102 e o nitrogênio positivamente carregado (mais próximo ao anel B) de 6, além de ligação hidrogênio entre os resíduos Glu102 e Phe147 e o grupo hidroxila do anel fenólico B. A partir dos modos de ligação observados, ALDIB e colaboradores desenvolveram novos análogos estruturais otimizados de 6.⁵⁹

Um dos novos análogos planejados a partir de 6, o composto 7, foi o mais potente do estudo, apresentando CI_{50} igual a 54 nM, 10 vezes mais potente que o seu precursor 6. O composto 7 apresenta modo de ligação com a MPO semelhante a 6, interagindo no mesmo sítio de reconhecimento e apresentando interações com resíduos importantes, a exemplo de Glu102 e Arg239. Ademais, por possuir o núcleo 5-fluorindol em substituição ao anel aromático B e um espaçador propila entre a função amino e o anel indólico, o análogo 7 realiza uma interação complementar mais produtiva com a enzima alvo em relação aos demais derivados bis-arilalquilaminas, culminando na otimização de sua potência inibitória.^{4,59}

Por este inibidor apresentar também capacidade de ligação com o transportador SERT, a seletividade frente a ambas as proteínas de interesse também foi avaliada. O composto 7 apresentou seletividade pela MPO em comparação ao SERT, com um índice de seletividade igual a 14 ($KiSERT/CI_{50}$ MPO), demonstrando assim ser uma estrutura promissora na busca por novos inibidores de MPO.⁴

3.2. Inibidores irreversíveis

3.2.1. Derivados 6-ariltiouracil

Desenvolvidos pelo grupo de pesquisa do laboratório Pfizer, análogos 6-ariltiouracil foram obtidos e otimizados utilizando técnicas de síntese racional baseada em planejamento estrutural por métodos computacionais. Estes estudos viabilizaram a criação de novos derivados 6-ariltiouracil com atividade inibitória frente à MPO (Figura 6), destacando-se como mais promissoras as substâncias PF-1355 (8) e PF-06282999 (9). O estudo

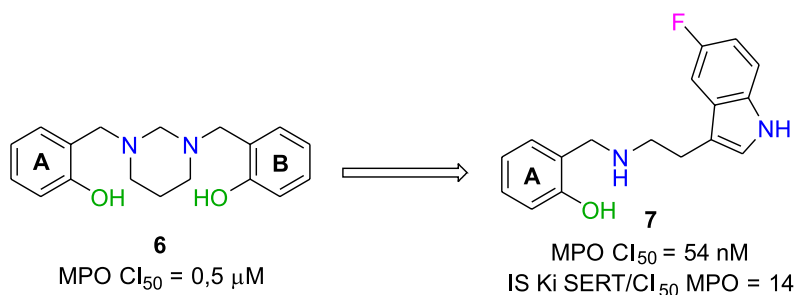


Figura 5. Bis-arilalquilaminas com efeito inibitório frente à enzima alvo MPO⁴

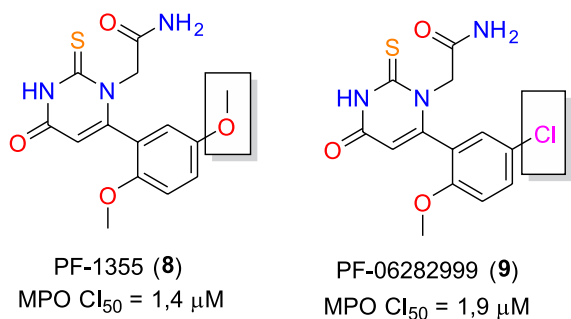


Figura 6. Estruturas químicas dos derivados 6-ariltiouracila PF-1355 (**8**) e PF-06282999 (**9**) com efeito inibitório frente à enzima alvo MPO⁶⁰

em questão demonstrou ainda a importância do átomo de enxofre presente nas estruturas dos análogos para a função inibitória irreversível proposta, e, a partir de estudos computacionais de SAR, foi possível evidenciar que a presença de um grupo aromático arila com o substituinte *orto*-metoxi aumentaria a seletividade pela enzima alvo, sem alterar consideravelmente a potência inibitória. O derivado PF-06282999 (**9**) tem somente uma variação estrutural quando comparado ao PF-1355 (**8**), correspondendo à presença de um átomo de cloro na posição 5 do anel arila em **9**, enquanto no PF-1355 (**8**) existe um grupamento metoxi.⁶⁰

Estudos detalhados *in vitro* e *in vivo* demonstraram o efeito inibitório de PF-06282999 (**9**, Figura 6) frente à MPO e a sua elevada seletividade pela enzima alvo,⁶⁸ tendo este derivado avançado para ensaios clínicos de Fase 1, sendo, no entanto, descontinuado devido aos efeitos colaterais apresentados (ClinicalTrials.gov Identifier: NCT01965600). Em ensaios *in vitro* de inibição da MPO em sangue total humano foi feita a determinação de sua CI_{50} em 1,9 μ M.⁶⁰

Por sua vez, o derivado PF-1355 (**8**, Figura 6) foi submetido a protocolos de avaliação *in vitro* e *in vivo* com o objetivo de demonstrar sua efetividade inibitória frente à atividade catalítica da MPO, apresentado uma CI_{50} estimada em 1,4 μ M. Além da determinação de sua potência inibitória e da elucidação do seu mecanismo de inibição irreversível, o estudo visava comprovar a alta seletividade de **8**, demonstrando que este composto não apresentou atividade modulatória em testes com mais de 50 alvos distintos.⁶³

Ambos os derivados 6-ariltiouracila **8** e **9** (Figura 6) são denominados substratos suicidas por serem inibidores irreversíveis que ligam-se covalentemente à MPO, bloqueando, desta maneira, o seu sítio ativo e impedindo que outros substratos consigam interagir com a mesma. O estudo do mecanismo de ação demonstrou que sua atuação inibitória é dependente da presença de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) para gerar o Composto I. O átomo de enxofre presente no grupo tiouracila é, então, oxidado pelo Composto I, produzindo um intermediário radicalar, que, por sua vez, se liga covalentemente ao grupo heme da enzima, causando a inativação da função da mesma, justificando assim a efetividade inibitória.⁶⁰

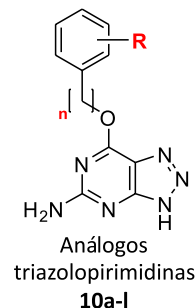
3.3. Inibidores reversíveis

3.3.1. Triazolopirimidinas

Em uma busca por novas substâncias com potencial inibitório frente à MPO e mecanismo de ação reversível, foi feito um estudo utilizando a estratégia de triagem robotizada chamada de *high throughput screening* (HTS; “triagem de alta produtividade”, em tradução livre para o português), que corresponde a um processo automatizado de avaliação *in vitro* que permite examinar milhares de substâncias por dia, possibilitando a triagem de milhões de substâncias por semana. Partindo de uma quimioteca composta inicialmente por 124 mil substâncias, foi identificado um novo padrão estrutural triazolopirimidínico para inibição reversível da enzima alvo MPO.⁶¹

Partindo do arcabouço geral inicialmente identificado (Tabela 2), foi realizada a avaliação sequencial de análogos triazolopirimidinas (**10a-l**) com padrões de substituição distintos com a finalidade de se identificar o derivado da série com o melhor potencial inibitório.

Tabela 2. Padrão de substituição e valores de CI_{50} (μ M) obtidos para a série de derivados triazolopirimidinas desenvolvidos como inibidores de MPO⁶¹



Derivado	n	R	CI_{50} (μ M)
10a	0	H	>13
10b	1	2-F	0,078
10c	1	2-Cl	0,18
10d	1	2-CH ₃	0,47
10e	1	3-F	0,040
10f	1	3-Cl	0,20
10g	1	3-OMe	0,49
10h	1	3-OCF ₂ H	0,20
10i	1	4-F	0,047
10j	1	4-CF ₃	0,14
10k	1	4-CH ₃	0,51
10l	2	H	0,63

O estudo de SAR realizado indicou que o espaçador ideal compreendia a distância de um carbono metilênico entre a fenila e grupo éter. Ademais, a substituição com átomos de flúor no anel fenila demonstrou-se favorável ao efeito inibitório frente à MPO, a exemplo dos derivados **10b**, **10e** e **10i** com CI_{50} em escala nanomolar (Tabela 2).⁶¹

Em estudos de cocristalização com a enzima-alvo, pode-

se observar que os derivados triazolopirimidinas inibem a enzima MPO nativa por interagirem com os resíduos de aminoácidos polares Gln-91, His-95 e Arg-239 em seu sítio ativo, bloqueando deste modo a ação catalítica e, conseqüentemente, a produção de espécies reativas.^{61,62}

3.4. Padrões estruturais com mecanismo de inibição desconhecido ou variado

3.4.1. Flavonoides

Segundo Jucá e colaboradores,⁶⁴ os flavonoides são

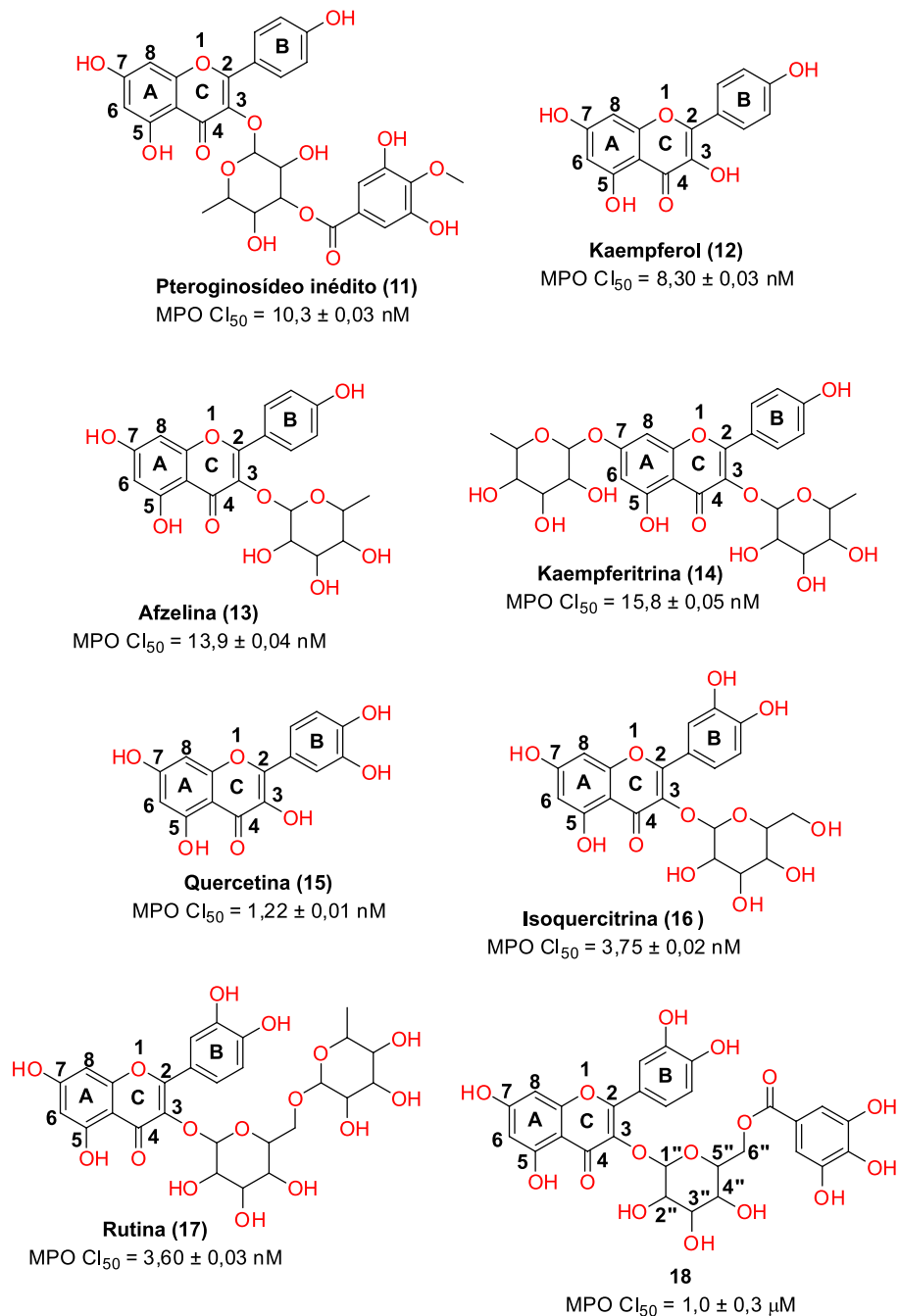


Figura 7. Estruturas químicas e potencial inibitório frente à MPO descrito para os flavonoides isolados de *Pterogyne nitens* (11-17),^{65,67} e de *Tapirira guianensis* (18)⁶⁶

subunidade catecol no anel B, sendo a presença de uma carbonila α,β -insaturada com o grupo hidroxila livre em C-3 também favorável para o efeito inibitório, conforme observado para o flavonoide quercetina (**15**) em comparação à isoquercitrina (**16**) e à rutina (**17**).⁶⁵

Em estudos mais recentes, flavonoides derivados da quercetina isolados de folhas de *Tapirira guianensis* (Anacardiaceae) foram avaliados frente à MPO, destacando-se o derivado **18** (quercetina 3-*O*-(6''-*O*-galoil)- β -D-galactopiranosídeo, Figura 7) como o inibidor mais potente da atividade peroxidase da enzima, com CI_{50} igual a $1,0 \pm 0,3 \mu\text{M}$ no ensaio de inibição *in vitro*.⁶⁶

Esses dados são de extrema relevância uma vez que os flavonoides são substâncias amplamente estudadas, com baixa toxicidade, e estão ricamente disponíveis na flora vegetal, apresentando propriedades de proteção das células contra estresse oxidativo induzido pela produção de radicais livres. Cabe mencionar que, para estes produtos naturais, estudos de cinética de inibição não estão descritos, sendo o mecanismo exato envolvido na inibição enzimática até o momento desconhecido.^{64,65,67}

3.4.2. Derivados aril-hidrazônicos

Uma nova série de inibidores aril-hidrazônicos da MPO (Figura 8) foi desenvolvida a partir da estratégia de Química

Combinatória Dinâmica (do inglês, *Dynamic Combinatorial Chemistry*). Partindo do conhecimento sobre a inibição irreversível da MPO pelas substâncias previamente descritas hidralazina (**19**) e isoniazida (**20**), com CI_{50} iguais a $0,9 \mu\text{M}$ e $5 \mu\text{M}$, respectivamente, este estudo propôs a exploração da reatividade química de **19** e **20** na presença de diferentes aldeídos aromáticos e alifáticos para a formação de hidrazonas, com o objetivo de identificar novos inibidores hidrazônicos de MPO com potência otimizada.¹²

A partir da formação das novas hidrazonas e da avaliação da atividade inibitória frente à MPO, destacaram-se quatro novos derivados aril-hidrazônicos, sendo todos eles derivados sintéticos do protótipo **19**, *i.e.* as ftalazinas **21** com CI_{50} de $0,15 \mu\text{M}$, **22** com CI_{50} de $0,34 \mu\text{M}$, **23** com CI_{50} de $0,11 \mu\text{M}$, e **24** com CI_{50} de $0,08 \mu\text{M}$.^{12,69}

O estudo de *docking* molecular para avaliação dos modos de ligação das novas aril-hidrazonas **21-24** com a enzima-alvo MPO destacou importantes interações realizadas pelos grupamentos provenientes dos aldeídos correspondentes empregados na preparação dos derivados **21-24**.¹²

Para os derivados **21** e **22**, os substituintes hidroxil e metoxi participam de interações do tipo ligação de hidrogênio com o resíduo de Glu102, um resíduo-chave para o reconhecimento e inibição da MPO. Por sua vez, para o derivado **23**, a hidroxila está também envolvida em ligação

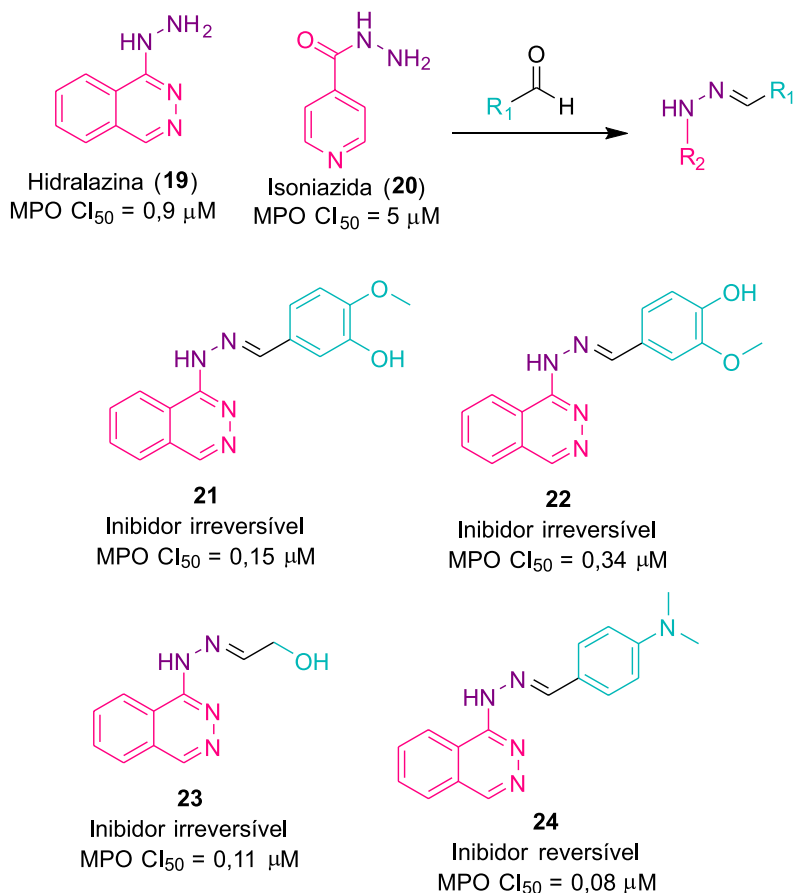


Figura 8. Aplicação da estratégia de Química Combinatória Dinâmica a partir dos protótipos hidralazina (**19**) e isoniazida (**20**) para a identificação de novos análogos aril-hidrazônicos (**21-24**) como inibidores de MPO¹²

de hidrogênio com outro resíduo, a Thr100. Ademais, para esses três derivados (**21-23**), foi identificada uma interação do tipo π -stacking formada entre um anel pirrol do grupo heme no sítio ativo da MPO e o anel ftalazina na estrutura dos ligantes.¹²

Por sua vez, o padrão de substituição proveniente do aldeído empregado na formação da aril-hidrazona **24** resultou em um modo de ligação bastante diferenciado para este derivado, com uma inversão de seu posicionamento no sítio de ligação em comparação às aril-hidrazonas **21-23**. Foi observado que **24** interage duplamente por ligação de hidrogênio entre o resíduo Glu102 e a função amino-ftalazina em sua estrutura. Por outro lado, no análogo **24**, o grupamento responsável pela interação do tipo π -stacking com o pirrol do grupo heme no sítio ativo da MPO é o grupo 4-dimetil-amino-fenila proveniente do aldeído correspondente.¹²

Os estudos cinéticos de inibição enzimática demonstraram que, enquanto as aril-hidrazonas **21-23** pertencem à classe dos inibidores irreversíveis, o análogo **24** foi caracterizado como um inibidor reversível de MPO, indicando uma variação no mecanismo de inibição da enzima a depender do padrão de substituição introduzido a partir do aldeído empregado na formação da aril-hidrazona correspondente. Esses resultados corroboram com a detecção de um modo de interação bastante diferenciado para a aril-hidrazona **24**, conforme observado nos estudos de *docking* molecular.¹²

4. Considerações Finais

A mieloperoxidase (MPO) é uma enzima diretamente ligada a respostas imunológicas inatas e à inflamação. Uma vez que o aumento da atividade da MPO está associado ao estabelecimento e progressão de diversas enfermidades de natureza inflamatória, esta enzima é reconhecida como um alvo terapêutico promissor para o tratamento de doenças inflamatórias crônicas, cardiovasculares, neurodegenerativas e autoimunes.

Apesar disso, até o momento não existe no mercado farmacêutico um inibidor de MPO aprovado para uso clínico. Assim sendo, diferentes grupos de pesquisa têm se dedicado nas últimas décadas a encontrar inibidores com segurança e eficácia adequadas como candidatos a fármacos anti-inflamatórios. O conhecimento dos esforços previamente realizados é primordial para que futuras iniciativas encontrem maior chance de êxito.

Esta revisão oferece uma descrição das principais características e propriedades da MPO, justificando sua indicação como um alvo terapêutico de interesse para o tratamento das referidas enfermidades. Além da revisão e atualização no tema, o artigo fornece um apanhado útil de informações estruturais para o futuro planejamento de novas entidades químicas idealizadas como inibidores de MPO por meio da apresentação dos requisitos estruturais previamente identificados como relevantes para o reconhecimento molecular complementar pela enzima alvo e para a inibição

potente e seletiva da MPO por diferentes classes químicas de micromoléculas.

Agradecimentos

Os autores agradecem à Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio de Janeiro (FF-UFRJ) e às agências de fomento CAPES, CNPq e FAPERJ.

Referências Bibliográficas

1. Gałecki, P.; Florkowski, A.; Bobińska, K.; Śmigielski, J.; Bienkiewicz, M.; Szemraj, J.; Functional polymorphism of the myeloperoxidase gene (G-463A) in depressive patients. *Acta Neuropsychiatrica* **2010**, *22*, 218. [[Crossref](#)]
2. Andersson, E.; Hellman, L.; Gullberg, U.; Olsson I.; The role of the propeptide for processing and sorting of human myeloperoxidase. *The Journal of biological chemistry* **1998**, *273*, 4747. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
3. Geering, B.; Stoekle, C.; Conus, S.; Simon, H. U.; Living and dying for inflammation: neutrophils, eosinophils, basophils. *Trends in Immunology* **2013**, *34*, 398. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
4. Aldib, I.; Gelbcke, M.; Soubhye, J.; Prévost, M.; Furtmüller, P. G.; Obinger, C.; Elfving, B.; Alard, I. C.; Roos, G.; Delporte, C.; Berger, G.; Dufour, D.; Zouaoui Boudjeltia, K.; Nève, J.; Dufrasne, F.; Van Antwerpen, P.; Novel bis-arylalkylamines as myeloperoxidase inhibitors: Design, synthesis, and structure-activity relationship study. *European Journal of Medicinal Chemistry* **2016**, *123*, 746. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
5. Segal, A. W.; How Neutrophils Kill Microbes. *Annual Review of Immunology* **2005**, *23*, 197. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
6. Malle, E.; Furtmüller, P. G.; Sattler, W.; Obinger, C.; Myeloperoxidase: A target for new drug development? *British Journal of Pharmacology* **2007**, *152*, 838. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
7. Lazarević-Pasti, T.; Leskovac, A.; Vasić, V.; Myeloperoxidase Inhibitors as Potential Drugs. *Current Drug Metabolism* **2015**, *16*, 168. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
8. Roman, R. M.; Wendland, A. E.; Polanczyk, C. A.; Mieloperoxidase e doença arterial coronariana: Da pesquisa à prática clínica. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia* **2008**, *91*, 12. [[Crossref](#)]
9. Forbes, L. V.; Sjögren, T.; Auchère, F.; Jenkins, D. W.; Thong, B.; Loughton, D.; Hemsley, P.; Paireadeau, G.; Turner, R.; Eriksson, H.; Unitt, J. F.; Kettle, A. J.; Potent reversible inhibition of myeloperoxidase by aromatic hydroxamates. *The Journal of biological chemistry*, **2013**, *288*, 36636. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
10. Klebanoff, S.J.; Myeloperoxidase: friend and foe. *Journal of Leukocyte Biology* **2005**, *77*, 598. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
11. Chong-Hou, S.; Hsein-Kun, L.; The role of hypochlorous acid as one of the reactive oxygen species in periodontal disease. *Journal of Dental Sciences* **2009**, *4*, 45. [[Crossref](#)]
12. Soubhye, J.; Gelbcke, M.; Van Antwerpen, P.; Dufrasne, F.; Boufadi, M.Y.; Nève, J.; Furtmüller, P.G.; Obinger, C.; Zouaoui Boudjeltia, K.; Meyer, F.; From Dynamic Combinatorial

- Chemistry to in Vivo Evaluation of Reversible and Irreversible Myeloperoxidase Inhibitors. *ACS Medicinal Chemistry Letters* **2017**, *8*, 206. [Crossref] [PubMed]
13. Galijasevic, S.; The development of myeloperoxidase inhibitors. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters* **2019**, *29*, 1. [Crossref] [PubMed]
 14. Harrison, J. E.; Schultz, J.; Studies on the chlorinating activity of myeloperoxidase. *Journal of Biological Chemistry* **1976**, *251*, 1371. [PubMed]
 15. Podrez, E. A.; Abu-Soud, H. M.; Hazen, S. L.; Myeloperoxidase-generated oxidants and atherosclerosis. *Free Radical Biology and Medicine* **2000**, *15*, 1717. [Crossref] [PubMed]
 16. Pokorska, J.; Poskart, K.; Kułaj, D.; Ochrem, A.; Dusza, M.; Gil, Z.; Świątek, E.; Makulska, J.; Effect of g.9476869G>A myeloperoxidase (MPO) gene polymorphism on the antioxidant activity of milk from Polish Holstein-Friesian cows of the Black-and-White variety (HO). *Journal of Dairy Research* **2017**, *84*, 159. [Crossref] [PubMed]
 17. Esporcatte, R.; Rey, H. C. V.; Rangel, F. O. D.; Rocha, R. M.; Mendonça Filho, H. T. F.; Albanesi, H. F. R. D. F. M.; Valor Preditivo da Mieloperoxidase na Identificação de Pacientes de Alto Risco Admitidos por Dor Torácica Aguda. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia* **2007**, *89*, 377. [Crossref]
 18. Rufino, R.; Silva, J. R. L.; Bases celulares e bioquímicas da doença pulmonar obstrutiva crônica. *Jornal Brasileiro de Pneumologia* **2006**, *32*, 241. [Crossref]
 19. Green, P. S.; Mendez, A. J.; Jacob, J. S.; Crowley, J. R.; Growdon, W.; Hyman, B. T.; Heinecke, J. W.; Neuronal expression of myeloperoxidase is increased in Alzheimer's disease. *Journal of Neurochemistry* **2004**, *90*, 724. [Crossref] [PubMed]
 20. Kamanna, V. S.; Ganji, S. H.; Kashyap, M. L.; Myeloperoxidase and Atherosclerosis. *Current Cardiovascular Risk Reports* **2013**, *7*, 102. [Crossref]
 21. Koenig, W.; Khuseyinova, N.; Biomarkers of atherosclerotic plaque instability and rupture. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* **2007**, *27*, 15. [Crossref] [PubMed]
 22. Wong, N. D.; Gransar, H.; Narula, J.; Shaw, L.; Moon, J. H.; Miranda-Peats, R.; Rozanski, A.; Hayes, S. W.; Thomson, L. E.; Friedman, J. D.; Berman, D. S.; Myeloperoxidase, subclinical atherosclerosis, and cardiovascular disease events. *JACC Cardiovasc Imaging* **2009**, *2*, 1093. [Crossref] [PubMed]
 23. Soeki, T.; Sata, M.; Inflammatory biomarkers and atherosclerosis. *International Heart Journal* **2016**, *57*, 134. [Crossref] [PubMed]
 24. Hermus, L.; Lefrandt, J. D.; Tio, R. A.; Breek, J.; Zeebregts, J. C.; Carotid plaque formation and serum biomarkers. *Atherosclerosis* **2010**, *213*, 21. [Crossref]
 25. Soubhye, J.; Prévost, M.; Van Antwerpen, P.; Zouaoui Boudjeltia, K.; Rousseau, A.; Furtmüller, P. G.; Obinger, C.; Vanhaeverbeek, M.; Ducobu, J.; Néve, J.; Gelbcke, M.; Dufrasne, F. O.; Structure-based design, synthesis, and pharmacological evaluation of 3-(Aminoalkyl)-5-fluoroindoles as myeloperoxidase inhibitors. *Journal of Medicinal Chemistry* **2010**, *53*, 8747. [Crossref] [PubMed]
 26. World Health Organization, Chronic respiratory diseases, 2020. Disponível em: <https://www.who.int/health-topics/chronic-respiratory-diseases#tab=tab_2>. Acesso em: 10 jun. 2020.
 27. Barnes, P. J.; Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *New England Journal of Medicine* **2000**, *343*, 269. [Crossref] [PubMed]
 28. Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease (GOLD). Pocket Guide to Copd Diagnosis, Management, And Prevention A Guide for Health Care Professionals, **2019** EDITION. Disponível em: <<https://goldcopd.org/wp-content/uploads/2018/11/GOLD-2019-POCKET-GUIDE-FINAL-WMS.pdf>> Acesso em: 10 junho 2020.
 29. Fisher, C. M.; Chronic obstructive pulmonary disease. *The Lancet* **1998**, *352*, 1314. [Crossref] [PubMed]
 30. Rabe, K. F.; Watz, H.; Chronic obstructive pulmonary disease. *The Lancet* **2017**, *389*, 1931. [Crossref] [PubMed]
 31. Institute for Health Metrics and Evaluation (IHME). Findings from the Global Burden of Disease Study 2017. Seattle, WA: IHME, 2018. Disponível em: <http://www.healthdata.org/sites/default/files/files/policy_report/2019/GBD_2017_Booklet.pdf>. Acesso em: 10 junho 2020.
 32. Mathers, C. D.; Loncar, D.; Projections of global mortality and burden of disease from 2002 to 2030. *PLoS medicine* **2006**, *3*, e442. [Crossref] [PubMed]
 33. Moschino, L.; Carraro, S.; Baraldi, E.; Early life origin and prevention of chronic obstructive pulmonary diseases. *Pediatr Allergy Immunol* **2020**, *31*, 16. [Crossref] [PubMed]
 34. Sethi, J. M.; Rochester, C. L.; Smoking and Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Clinics in Chest Medicine* **2000**, *21*, 67. [Crossref]
 35. Aggarwal, T.; Wadhwa, R.; Thapliyal, N.; Sharma, K.; Rani, V.; Maurya, P. K.; Oxidative, inflammatory, genetic, and epigenetic biomarkers associated with chronic obstructive pulmonary disorder. *Journal of Cellular Physiology*. **2018**, *234*, 2067. [Crossref] [PubMed]
 36. Stockley, R. A.; Halpin, D.; Celli, B. R.; Singh, D.; Chronic Obstructive Pulmonary Disease Biomarkers and Their Interpretation. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* **2019**, *199*, 1195. [Crossref] [PubMed]
 37. Barnes, P. J.; Chowdhury, B.; Kharitonov, S. A.; Magnussen, H.; Page, C. P.; Postma, D.; Saetta, M.; Pulmonary Biomarkers in Chronic Obstructive. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* **2006**, *174*, 6. [Crossref] [PubMed]
 38. Pesci, A.; Balbi, B.; Majori, M.; Cacciani, G.; Bertacco, S.; Alciato, P.; Donner, C. F.; Inflammatory cells and mediators in bronchial lavage of patients with chronic obstructive pulmonary disease. *European Respiratory Journal* **1998**, *12*, 380. [Crossref] [PubMed]
 39. Zhu, A.; Ge, D.; Zhang, J.; Teng, Y.; Yuan, C.; Huang, M.; Adcock, I. M.; Barnes, P. J.; Yao, X.; Sputum myeloperoxidase in chronic obstructive pulmonary disease. *European Journal of Medical Research* **2014**, *19*, 1. [Crossref] [PubMed]
 40. Park, H. Y.; Man, S. F.; Tashkin, D.; Wise, R. A.; Connett, J. E.; Anthonisen, N. A.; Sin, D. D.; The relation of serum myeloperoxidase to disease progression and mortality in patients with chronic obstructive pulmonary disease (COPD). *Plos One* **2013**, *8*, e61315. [Crossref] [PubMed]
 41. Dickerhof, N.; Huang, J.; Min, E.; Michaëlsson, E.; Lindstedt, E. L.; Pearson, J. F.; Kettle, A. J.; Day, B. J.; Myeloperoxidase

- inhibition decreases morbidity and oxidative stress in mice with cystic fibrosis-like lung inflammation. *Free Radical Biology and Medicine* **2020**, *20*, 91. [Crossref] [PubMed]
42. Churg, A.; Marshall, C. V.; Sin, D. D.; Bolton, S.; Zhou, S.; Thain, K.; Cadogan, E. B.; Maltby, J.; Soars, M. G.; Mallinder, P. R.; Wright, J. L.; Late Intervention with a Myeloperoxidase Inhibitor Stops Progression of Experimental Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* **2012**, *185*, 34. [Crossref] [PubMed]
 43. Organização Pan-Americana de Saúde, 2017. Demência: número de pessoas afetadas triplicará nos próximos 30 anos. 2017. Disponível em: <<https://www.rets.epsjv.fiocruz.br/noticias/demencia-numero-de-pessoas-afetadas-triplicara-nos-proximos-30-anos>>. Acesso em: 15 julho 2020.
 44. Associação Brasileira de Alzheimer. A cada três segundos, um idoso é diagnosticado com algum tipo de demência no mundo. Disponível em: <<https://abraz.org.br/2020/2018/08/31/a-cada-tres-segundos-um-idoso-desenvolve-algum-tipo-de-demencia-no-mundo-2/>>. Acesso em: 10 junho 2020.
 45. Dwivedi, N.; Shah, J.; Mishra, V.; Tambuwala, M.; Kesharwani, P.; Nanoneuromedicine for management of neurodegenerative disorder. *Journal of Drug Delivery Science and Technology* **2019**, *49*, 477. [Crossref]
 46. Vitek, M. P.; Bhattacharya, K.; Glendening, J. M.; Stopa, E.; Vlassara, H.; Bucala, R.; Manogue, K.; Cerami, A.; Advanced glycation end products contribute to amyloidosis in Alzheimer disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1994**, *91*, 4766. [Crossref] [PubMed]
 47. Yan, S. D.; Chen, X.; Schmidt, A. M.; Brett, J.; Godman, G.; Zou, Y. S.; Scott, C. W.; Caputo, C.; Frappier, T.; Smith, M. A.; Glycated tau protein in Alzheimer disease: a mechanism for induction of oxidant stress. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1994**, *91*, 7787. [Crossref] [PubMed]
 48. Zappia, M.; Manna, I.; Serra, P.; Cittadella, R.; Andreoli, V.; La Russa, A.; Annesi, F.; Spadafora, P.; Romeo, N.; Nicoletti, G.; Messina, D.; Gambardella, A.; Quattrone, A.; Increased Risk for Alzheimer Disease With the Interaction of MPO and A2M Polymorphisms. *Archives of Neurology* **2004**, *61*, 41. [Crossref] [PubMed]
 49. Gellhaar, S.; Sunnemark, D.; Eriksson, H.; Olson, L.; Galter, D.; Myeloperoxidase-immunoreactive cells are significantly increased in brain areas affected by neurodegeneration in Parkinson's and Alzheimer's disease. *Cell and tissue research* **2017**, *369*, 445. [Crossref] [PubMed]
 50. Reynolds, W. F.; Rhees, J.; Maciejewski, D.; Paladino, T.; Sieburg, H.; Maki, R. A.; Masliah, E.; Myeloperoxidase Polymorphism Is Associated with Gender Specific Risk for Alzheimer's Disease. *Experimental Neurology* **1999**, *155*, 31. [Crossref] [PubMed]
 51. Forbes, L. V.; Kettle, A. J.; A multi-substrate assay for finding physiologically effective inhibitors of myeloperoxidase. *Anal Biochem* **2018**, *1*, 13. [Crossref] [PubMed]
 52. Chapman, A. L.; Mocatta, T. J.; Shiva, S.; Seidel, A.; Chen, B.; Khalilova, I.; Paumann-Page, M. E.; Jameson, G. N.; Winterbourn, C. C.; Kettle, A. J.; Ceruloplasmin is an endogenous inhibitor of myeloperoxidase. *Journal of Biological Chemistry* **2013**, *288*, 6465. [Crossref] [PubMed]
 53. Segelmark, M.; Persson, B.; Hellmark, T.; Wieslander, J.; Binding and inhibition of myeloperoxidase (MPO): A major function of ceruloplasmin. *Clinical and Experimental Immunology* **1997**, *108*, 167. [Crossref] [PubMed]
 54. Glanzmann, R.; Moreira, L.; Marques, S.; Silva, K.; Soares, V.; O uso da melatonina como indutor do sono – uma revisão bibliográfica. *Revista Uningá* **2019**, *56*, 157. Disponível em: [Link]
 55. Galijasevic, S.; Abdulhamid, I.; Abu-soud, H. M.; Melatonin Is a Potent Inhibitor for Myeloperoxidase. *Biochemistry* **2008**, *47*, 2668. [Crossref] [PubMed]
 56. Galijasevic, S.; Maitra, D.; Lu, T.; Sliskovic, I.; Abdulhamid, I.; Abu-Soud, H. M.; Myeloperoxidase interaction with peroxynitrite: chloride deficiency and heme depletion. *Free radical biology & medicine* **2009**, *47*, 431. [Crossref] [PubMed]
 57. Ximenes, V. F.; Silva, S. O.; Rodrigues, M. R.; Catalani, L. H.; Maghzal, G. J.; Kettle, A. J.; Campa, A.; Superoxide-dependent oxidation of melatonin by myeloperoxidase. *Journal of Biological Chemistry* **2005**, *280*, 38160. [Crossref] [PubMed]
 58. Soubhye, J.; Aldib, I.; Elfving, B.; Gelbcke, M.; Furtmüller, P. G.; Podrecca, M.; Conotte, R.; Colet, J. M.; Rousseau, A.; Reye, F.; Sarakbi, A.; Vanhaeverbeek, M.; Kauffmann, J. M.; Obinger, C.; Nève, J.; Prévost, M.; Zouaoui Boudjeltia, K.; Dufrasne, F.; Van Antwerpen, P.; Design, Synthesis, and Structure – Activity Relationship Studies of Novel 3 - Alkylindole Derivatives as Selective and Highly Potent Myeloperoxidase Inhibitors. *Journal of Medicinal Chemistry* **2013**, *56*, 3943. [Crossref] [PubMed]
 59. Aldib, I.; Soubhye, J.; Zouaoui Boudjeltia, K.; Vanhaeverbeek, M.; Rousseau, A.; Furtmüller, P. G.; Obinger, C.; Dufrasne, F.; Nève, J.; Van Antwerpen, P.; Prévost, M.; Evaluation of New Scaffolds of Myeloperoxidase Inhibitors by Rational Design Combined with High-Throughput Virtual Screening. *Journal of Medicinal Chemistry* **2012**, *55*, 7208. [Crossref] [PubMed]
 60. Ruggeri, R. B.; Buckbinder, L.; Bagley, S. W.; Carpino, P. A.; Conn, E. L.; Dowling, M. S.; Fernando, D. P.; Jiao, W.; Kung, D. W.; Orr, S. T.; Qi, Y.; Rocke, B. N.; Smith, A.; Warmus, J. S.; Zhang, Y.; Bowles, D.; Widlicka, D. W.; Eng, H.; Ryder, T.; Sharma, R.; Wolford, A.; Okerberg, C.; Walters, K.; Maurer, T. S.; Zhang, Y.; Bonin, P. D.; Spath, S. N.; Xing, G.; Hepworth, D.; Ahn, K.; Kalgutkar, A. S.; Discovery of 2-(6-(5-Chloro-2-methoxyphenyl)-4-oxo-2-thioxo-3,4-dihydropyrimidin-1(2H)-yl)acetamide (PF-06282999): A Highly Selective Mechanism-Based Myeloperoxidase Inhibitor for the Treatment of Cardiovascular Diseases. *Journal of Medicinal Chemistry* **2015**, *58*, 8513. [Crossref] [PubMed]
 61. Duclos, F.; Abell, L. M.; Harden, D. G.; Pike, K.; Nowak, K.; Locke, G. A.; Duke, G. J.; Liu, X.; Fernando, G.; Shaw, S. A.; Vokits, B. P.; Wurtz, N. R.; Viet, A.; Valente, M. N.; Stachura, S.; Sleph, P.; Khan, J. A.; Gao, J.; Dongre, A. R.; Zhao, L.; Wexler, R. R.; Gordon, D. A.; Kick, E. K.; Triazolopyrimidines identified as reversible myeloperoxidase inhibitors. *MedChemComm* **2017**, *8*, 2093. [Crossref] [PubMed]
 62. Wurtz, N. R.; Viet, A.; Shaw, S. A.; Dilger, A.; Valente, M. N.; Khan, J. A.; Jusuf, S.; Narayanan, R.; Fernando, G.; Lo, F.; Liu, X.; Locke, G. A.; Kopcho, L.; Abell, L. M.; Sleph, P.; Basso,

- M.; Zhao, L.; Wexler, R. R.; Duclos, F.; Kick, E. K.; Potent Triazolopyridine Myeloperoxidase Inhibitors. *ACS Medicinal Chemistry Letters* **2018**, *9*, 1175. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
63. Zheng, W.; Warner, R.; Ruggeri, R.; Su, C.; Cortes, C.; Skoura, A.; Ward, J.; Ahn, K.; Kalgutkar, A.; Sun, D.; Maurer, T. S.; Bonin, P. D.; Okerberg, C.; Bobrowski, W.; Kawabe, T.; Zhang, Y.; Coskran, T.; Bell, S.; Kapoor, B.; Johnson, K.; Buckbinder, L.; PF-1355, a mechanism-based myeloperoxidase inhibitor, prevents immune complex vasculitis and anti-glomerular basement membrane glomerulonephritis. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **2015**, *353*, 288. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
64. Jucá, M. M.; Cysne F. F. M. S.; Almeida, J. C.; Mesquita, D. S.; Barriga, J. R. M.; Dias, K. C. F.; Vasconcelos, S. M. M.; Flavonoids: biological activities and therapeutic potential. *Natural Product Research* **2020**, *34*, 692. [[Crossref](#)]
65. Fernandes, D. C.; Regasini, L. O.; Velloso, J. C.; Pauletti, P. M.; Castro-Gamboa, I.; Bolzani, V. S.; Oliveira, O. M.; Silva, D. H.; Myeloperoxidase Inhibitory and Radical Scavenging Activities of Flavones from Pterogynenitens. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* **2008**, *56*, 723. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
66. Calassara, I. L.; Pinto, S. C.; Condack, C. P. M.; Leite, B. F.; Nery, I. C. E. S.; Tinoco, I. W.; Muzitano, M. F.; Isolation and characterization of flavonoids from Tapirira guianensis leaves with vasodilatory and myeloperoxidase-inhibitoryactivities. *Natural Product Research* **2020**, *25*, 1. [[Crossref](#)]
67. Regasini, L. O.; Velloso, J. C.; Silva, D. H.; Furlan, M.; Oliveira, O. M.; Khalil, N. M.; Brunetti, I. L.; Young, M. C.; Barreiro, E. J.; Bolzani, V. S.; Flavonols from Pterogyne nitens and their evaluation as myeloperoxidase inhibitors. *Phytochemistry* **2008**, *69*, 1739. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
68. Dong, J. Q.; Varma, M. V.; Wolford, A.; Ryder, T.; Di, L.; Feng, B.; Terra, S. G.; Sagawa, K.; Kalgutkar, A. S.; Pharmacokinetics and Disposition of the Thiouracil Derivative PF-06282999, an Orally Bioavailable, Irreversible Inactivator of Myeloperoxidase Enzyme, Across Animals and Humans. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals*, **2016**, *44*, 209. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
69. Soubhye, J.; Meyer, F.; Furtmüller, P.; Obinger, C.; Dufrasne, F.; Antwerpen, P. V.; Characterization of chemical features of potent myeloperoxidase inhibitors. *Future Medicinal Chemistry* **2016**, *8*, 1163. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]