

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS  
BACHARELADO EM BIOTECNOLOGIA

SOFIA DALLASTA PEDROSO

**ANÁLISE IN SILICO DE UM NOVO COMPOSTO POSSÍVEL INIBIDOR DE  
CICLOOXIGENASE 2 UTILIZANDO DOCKING MOLECULAR**

SÃO CARLOS

2021

SOFIA DALLASTA PEDROSO

**ANÁLISE IN SILICO DE UM NOVO COMPOSTO POSSÍVEL INIBIDOR DE  
CICLOOXIGENASE 2 UTILIZANDO DOCKING MOLECULAR**

Trabalho de conclusão de curso  
apresentado ao curso de bacharelado em  
biotecnologia, da Universidade Federal de São  
Carlos, como parte dos requisitos para obtenção  
do título de bacharel em biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Julio Zukerman Schpector

SÃO CARLOS

2021

SOFIA DALLASTA PEDROSO

**ANÁLISE IN SILICO DE UM NOVO COMPOSTO POSSÍVEL INIBIDOR DE  
CICLOOXIGENASE 2 UTILIZANDO DOCKING MOLECULAR**

Trabalho de conclusão de curso apresentado a Universidade Federal de São Carlos como requisito parcial para obtenção do título de bacharel.

**BANCA EXAMINADORA**

**Local:** Online

**Horário:** 16:00

**Data:** 04/01/2021

Felix Nicolai Delling

Lucas Sousa Madureira

SÃO CARLOS

2021

Aos meus pais, Wagner e Tânia, pelo amor, apoio e carinho, sem os quais não poderia ter tido a oportunidade de alcançar tantas coisas maravilhosas.

À minha irmã Júlia, pelo amor, amizade e exemplo.

Às minhas avós Bene e Dita, pelo carinho, suporte e amor. Nunca serei suficientemente grata.

## AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Julio Zukerman-Schpector, que viu em mim potencial para contribuir com trabalhos tão importantes. Agradeço pela orientação, incentivo, dedicação e amizade.

À Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> Ignez Caracelli, pelo auxílio sempre pronto e disposto, exemplo, apoio e amizade.

A todos os professores que contribuíram para minha formação e ao secretário Rodrigo Roberto Malimpensa.

À Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> Maria Cristina Pranchevicius, pela amizade e apoio.

Aos colegas de laboratório Stella Hernandez Maganhi, María José Dávila e Thales Freire, pela orientação, paciência e amizade. Bem como Guilherme, Elisa e Glaudeston, pelo companheirismo na equipe de laboratório.

Ao CNPq pelo financiamento concedido durante a graduação.

Às minhas amigas e parceiras de carreira Ana Carolina Vasconcelos Fernandes, Beatriz Gusson, Iara Ciancaglino e Júlia Oliveira Dias, que se tornaram família quando ingressei na faculdade, agradeço por todo apoio, carinho e ensinamentos.

Às minhas amigas irmãs de longa data, Maria Clara Dyonísio, Juliana Nardy Curi e Gabrielli Cerini Ferreira, pelo carinho e amizade que nem a distância pode afetar.

Ao Eduardo Santos, com quem pude partilhar o amor pela ciência e que foi essencial para minha formação como pesquisadora, agradeço pela amizade e carinho sempre.

À minha família pelo carinho e apoio.

Aos meus pais, por acreditarem em meu potencial e por todo o suporte.

À minha irmã Júlia, pela amizade, companheirismo e ensinamentos.

Às minhas avós, pelo amor e suporte.

## RESUMO

Este trabalho descreve o estudo da formação de complexos entre a enzima ciclooxigenase (COX-2) e inibidores da mesma. Para tal, foram avaliados nos estudos os inibidores comprovados celecoxibe(CEL), rofecoxibe(RCX) e *Korean 21* e também o ligante RJA4, um potencial inibidor. A ação da COX-2 pode ser bloqueada por fármacos anti-inflamatórios não-esteroidais (AINEs) como CEL, RCX, entre outros. Estes fármacos são conhecidos por sua ação na redução de reações inflamatórias, dor e febre, bem como efeito anticoagulatório quando usado em baixas dosagens, não obstante, os primeiros efeitos colaterais detectados foram insuficiência renal, e úlcera péptica. O trabalho foi realizado utilizando simulações de docking molecular avaliando-se a possível capacidade de inibição seletiva de COX-2 pelo composto RJA4, cuja estrutura é semelhante à de outros fármacos inibidores de COX-2, conhecidos genericamente de coxibes. Para os trabalhos de docking, utilizou-se a proteína de código PDB 5IKR, um complexo cristalográfico formado pela enzima COX-2 humana e o inibidor ácido mefenâmico (ID8). Os estudos de docking foram feitos utilizando a mesma cavidade da enzima ocupada pelo ácido mefenâmico para posicionar os demais compostos. A avaliação dos resultados de docking foi feita por análise gráfica, primeiro selecionando poses (posição, orientação e conformação) dos compostos no sítio, depois foram avaliadas as interações entre átomos dos ligantes e os átomos dos aminoácidos da proteína: ligações de hidrogênio, interações de van der Waals e interações  $\pi$ . Observou-se que merece destaque a interação  $\pi$  dos ligantes com a Val523, resíduo relacionado com a especificidade para a COX-2. Para obter mais detalhes sobre a interação, foram realizados estudos sobre as interações não-covalentes utilizando também cálculos computacionais baseados em densidade eletrônica. Os resultados indicam que o composto RJA4 se posiciona de forma similar às moléculas estudadas (coxibes, o *Korean 21*, ID8) e realiza interações similares com a enzima COX-2, o que permite sugerir que este composto poderá ser um bom inibidor de COX-2. Este é o ponto de partida para realizar mais estudos sejam teóricos, como dinâmica molecular, ou *in vitro*, para determinar experimentalmente o potencial inibitório da molécula estudada.

Palavras-chave: Ciclooxigenase 2; docking; desenho de compostos baseado em estrutura.

## ABSTRACT

This work describes the study of the formation of complexes between the enzyme cyclooxygenase (COX-2) and some of its inhibitors. For this purpose, the known inhibitors celecoxib (CEL), rofecoxib (RCX) and Korean 21 and the ligand RJA4, a potential inhibitor, were evaluated in the studies. The activity of COX-2 can be blocked by non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) such as CEL, RCX, among others. These drugs are known for their action in reducing inflammatory reactions, pain and fever, as well as their anticoagulatory effect when used in low doses, however, the first side effects detected were kidney failure, and peptic ulcer. The work was carried out using molecular docking simulations evaluating the possible capacity for selective COX-2 inhibition by the RJA4 compound, whose structure is similar to that of other COX-2 inhibiting drugs, generically known as coxibs. For the docking work, the protein with PDB code 5IKR, a crystallographic complex formed by the human COX-2 enzyme and the inhibitor mefenamic acid (ID8), was used. Docking studies were done using the same enzyme cavity occupied by mefenamic acid to position the studied compounds. The evaluation of the docking results was done by graphic analysis, first selecting poses (position, orientation and conformation) of the compounds at the site, and then the interactions between atoms of the ligands and that of the protein amino acids were evaluated: hydrogen bonds, van der Waals interactions and  $\pi$  interactions. It was observed that the  $\pi$  interaction of the ligands with Val523 deserves to be highlighted, a residue related to the specificity for COX-2. To obtain more details on this interaction computational calculations based on electronic density were also performed. The results indicate that the RJA4 compound is positioned similarly to the studied molecules (coxibs, Korean 21, ID8) making similar interactions with the COX-2 enzyme, which suggests that this compound may be a good inhibitor of COX-2. This is the starting point for further studies, whether theoretical, such as molecular dynamics, or in vitro, to experimentally determine the inhibitory potential of the studied molecule.

Keywords: Cyclooxygenase 2; docking; structure-based drug design.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Estruturas do ácido araquidônico, PGG2 e PGH2	12
<b>Figura 2.</b> Monômero de COX-2 com destaque para o grupo heme	13
<b>Figura 3.</b> Esquema da formação de prostaglandinas pela ação da ciclooxigenase	14
<b>Figura 4.</b> Comparação entre os sítios ativos de COX-1 e COX-2	16
<b>Figura 5.</b> Estrutura do homodímero de COX-2	18
<b>Figura 6.</b> Rofecoxibe no sítio da ciclooxigenase em COX-2	20
<b>Figura 7.</b> Estrutura ideal proposta para inibidores seletivos de COX-2	20
<b>Figura 8.</b> Esquema do processo de structure-based drug design	25
<b>Figura 9.</b> Estrutura do celecoxibe	29
<b>Figura 10.</b> Estrutura do rofecoxibe	30
<b>Figura 11.</b> Estrutura do composto Korean 21	30
<b>Figura 12.</b> Estrutura de RJA4	31
<b>Figura 13.</b> Estrutura de RJA4 com as regiões de Baura e Chetti destacadas	31
<b>Figura 14.</b> Estruturas do RJA4 (a) e do celecoxibe (b)	32
<b>Figura 15.</b> Estruturas do ligante cristalográfico extraído de 5IKR	32
<b>Figura 16.</b> Parâmetros utilizados pelo WIN para análise das interações $\pi$	34
<b>Figura 17.</b> Resultados da etapa de redocking	35
<b>Figura 18.</b> Sobreposição entre a pose cristalográfica (cinza) e a de docking (verde) para celecoxibe	36
<b>Figura 19.</b> Sobreposição entre a pose cristalográfica (cinza) e a de docking (roxo) para rofecoxibe	37
<b>Figura 20.</b> Sobreposição dos resultados de Korean 21 (laranja) e celecoxibe (verde)	38
<b>Figura 21.</b> Sobreposição das poses de docking para os quatro ligantes estudados	41
<b>Figura 22.</b> Posicionamento dos ligantes com extremidade voltada para TYR385	41
<b>Figura 23.</b> Interações $\pi$ com SER353	42
<b>Figura 24.</b> Interações $\pi$ com VAL523	43
<b>Figura 25.</b> Resultados de NCIPlot para a. celecoxibe; b. rofecoxibe; c. Korean 21; d. RJA4	44



## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Resumo das interações observadas para celecoxibe no sítio ativo de COX-2	36
<b>Tabela 2.</b> Resumo das interações observadas para rofecoxibe no sítio ativo de COX-2	37
<b>Tabela 3.</b> Resumo das interações observadas para Korean 21 no sítio ativo de COX-2	39
<b>Tabela 4.</b> Resumo das interações observadas para RJA4 no sítio ativo de COX-2	39
<b>Tabela 5.</b> Comparação entre as ligações de hidrogênio estabelecidas entre os quatro ligantes estudados e o sítio ativo	40
<b>Tabela 6.</b> Comparação entre as interações pi para os quatro ligantes estudados	42
<b>Tabela 7.</b> Parâmetros para a ligação CH... $\pi$ com VAL523 para todos os coxibes, Korean 21 e RJA4	43

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO .....	11
1.1 CICLOOXIGENASES.....	11
1.2 ESTRUTURA DA COX-2.....	18
1.3 INIBIDORES DO TIPO COXIBE E A COX-2.....	19
1.4 INTERAÇÕES NÃO COVALENTES EM PROTEÍNAS.....	21
1.5 DESENHO DE FÁRMACOS BASEADO EM ESTRUTURA (STRUCTURE-BASED DRUG DESIGN). 23	
1.6 DOCKING MOLECULAR.....	25
2 OBJETIVOS .....	27
3 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL.....	28
3.1 SELEÇÃO DA ESTRUTURA TRIDIMENSIONAL DA MOLÉCULA RECEPTORA.....	28
3.2 SELEÇÃO DOS LIGANTES.....	28
3.2.1. Celecoxibe .....	28
3.2.2 Rofecoxibe.....	29
3.2.3 Korean 21 .....	30
3.2.4 RJA4 .....	31
3.2.5 Ligante extraído para redocking.....	32
3.3 PREPARAÇÃO DAS ESTRUTURAS PARA A REALIZAÇÃO DE CÁLCULOS DE <i>DOCKING</i> .....	33
3.4 REALIZAÇÃO DO EXPERIMENTO DE <i>DOCKING</i> .....	33
3.5 VISUALIZAÇÃO EM TELA GRÁFICA E ANÁLISE DE INTERAÇÕES.....	33
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	35
4.1 REDOCKING .....	35
4.2 DOCKING .....	35
4.2.1. Celecoxibe .....	35
4.2.2. Rofecoxibe.....	36
4.2.3. Korean 21 .....	37
4.2.4. RJA4.....	39
5 CONCLUSÕES.....	44

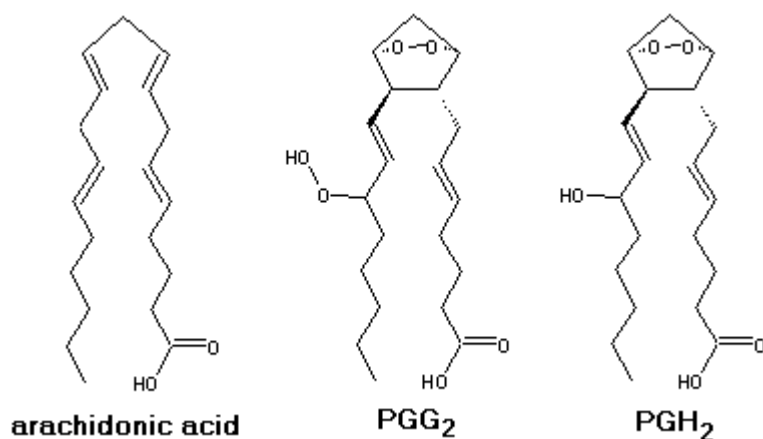
# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1 CICLOOXIGENASES

A inflamação é a resposta imediata do organismo a qualquer tipo de dano ou infecção que possa prejudicar a homeostase (RANKIN, 2004). Por isso, esta condição pode ser encontrada em associação a diversas patologias tais como artrite reumatoide, tumores, epilepsia, derrames, doenças neurodegenerativas, dentre outras (BEURA; CHETTI, 2020). Após poucas horas do início do processo inflamatório, o sistema pode atingir a fase aguda em que são recrutadas células especializadas e proteínas plasmáticas no local da inflamação, cujo efeito tem como consequência a vasodilatação, o aumento da permeabilidade microvascular e a liberação de fatores quimiotáticos de recrutamento, que em conjunto geram os cinco pilares da inflamação: calor, vermelhidão, inchaço, dor e perda de função (LAWRENCE; WILLOUGHBY; GILROY, 2002).

Os compostos mediadores da resposta pró-inflamatória são aqueles derivados do ácido araquidônico, conhecidos como eicosanoides e que englobam prostaglandinas e leucotrienos (LAWRENCE; WILLOUGHBY; GILROY, 2002). As prostaglandinas são biorreguladores essenciais e são encontradas praticamente em todos os tecidos do corpo humano, no entanto, não são armazenadas nestes locais, estando sua síntese ligada a distúrbios na membrana celular – ação de hormônios, estímulos inflamatórios, ionóforos de cálcio, luz ultravioleta, fatores pró-tumorais, dentre outros, responsáveis por liberar o ácido araquidônico de fontes de lipídeos esterificados (KUEHL; EGAN, 1980; SERHAN; SAVILL, 2005).

Uma vez liberado na célula, o ácido araquidônico é processado por uma classe de enzimas conhecida como ciclooxigenases, que realizam uma oxidação da molécula formando o intermediário PGG<sub>2</sub> – do inglês *endoperoxide prostaglandin G<sub>2</sub>*, seguida pela redução deste composto para formação do PGH<sub>2</sub> – do inglês *prostaglandin H<sub>2</sub>* – sendo este um ponto de partida para a síntese de diversos compostos cujo destino é determinado pelo tipo de enzima presente no tecido em questão (ROUZER; MARNETT, 2020). O mecanismo de ação destas enzimas depende de dois sítios, conhecidos como sítio da ciclooxigenase – onde ocorre a formação de PGH<sub>2</sub> – e sítio da peroxidase – onde é iniciada a reação e formada a PGG<sub>2</sub> (ROUZER; MARNETT, 2009). As estruturas do ácido araquidônico, PGG<sub>2</sub> e PGH<sub>2</sub> são mostradas na Figura 1.

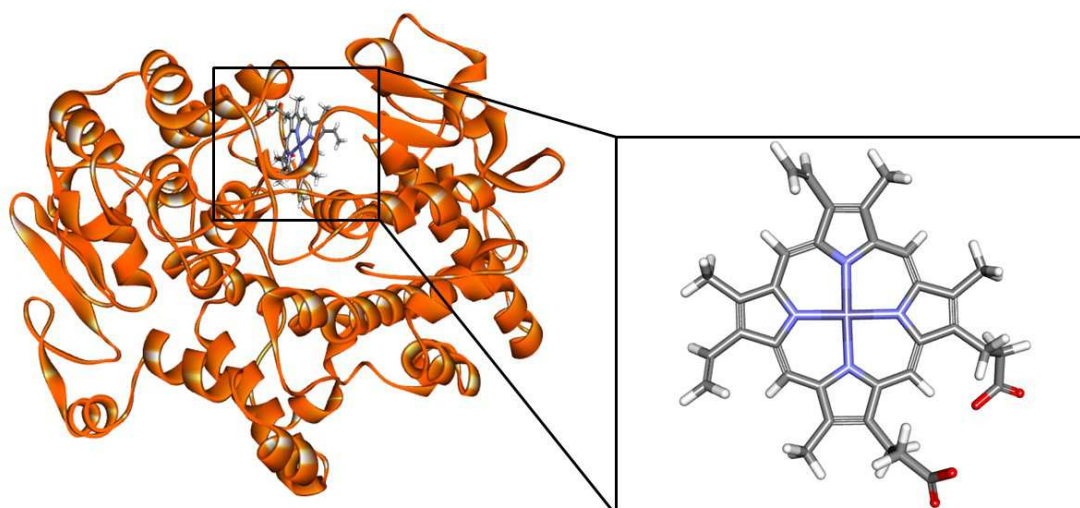


**Figura 1.** Estruturas do ácido araquidônico, PGG<sub>2</sub> e PGH<sub>2</sub>

Fonte: disponível em: <[http://homepage.ufp.pt/pedros/anim\\_jmol/cox.htm](http://homepage.ufp.pt/pedros/anim_jmol/cox.htm)>. Acesso em: 5 jan. 2021.

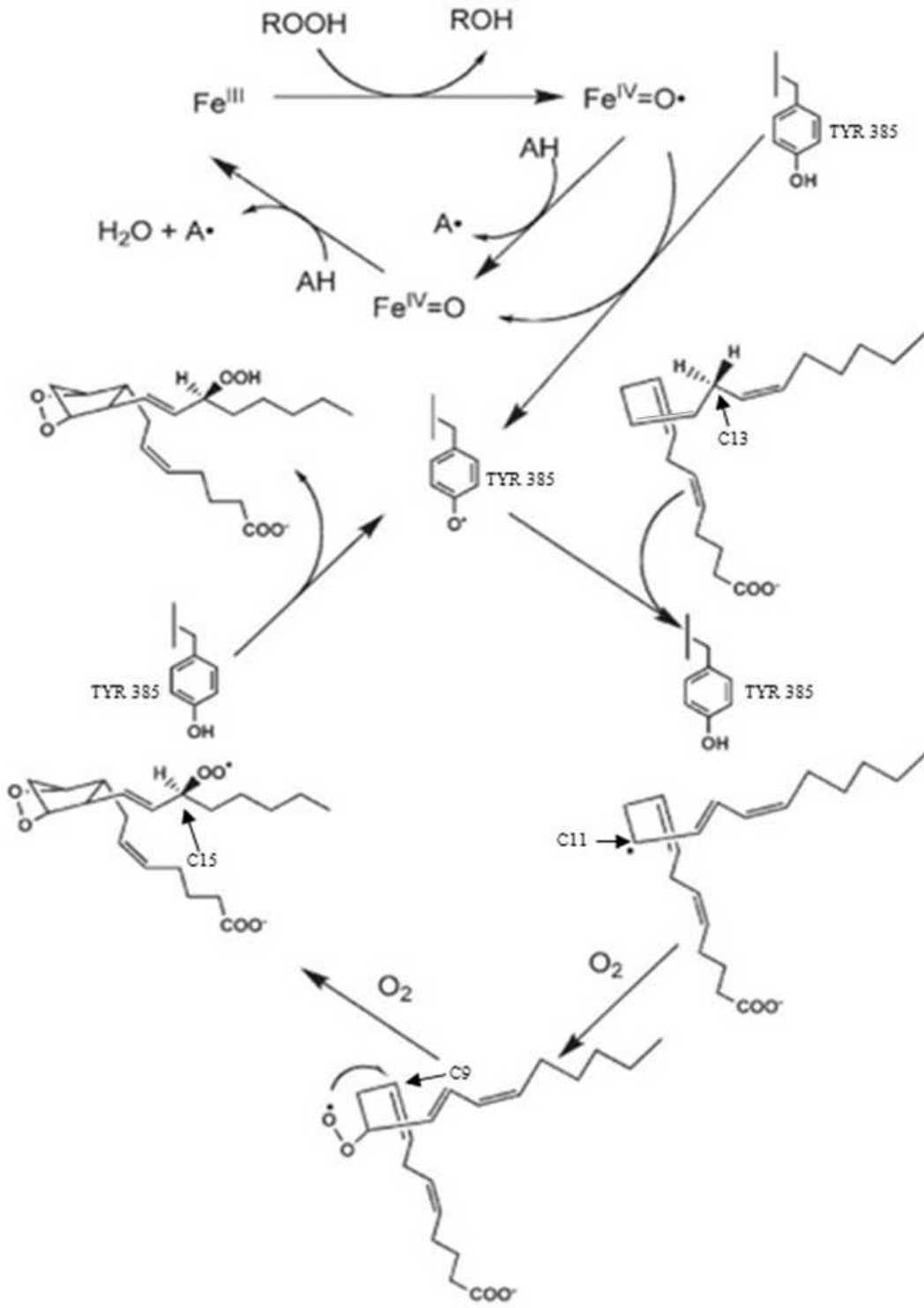
A reação sobre o ácido araquidônico inicia-se com a sua ligação no sítio da ciclooxigenase, em uma conformação conhecida como L estendida. Neste sítio, o composto forma um complexo por interações não covalentes com o grupo guanidil da arginina 120 (ARG120) e o oxigênio fenólico da tirosina 355 (TYR355). Outros resíduos que formam este sítio são a cadeia lateral da serina 530 (SER530), o oxigênio fenólico da tirosina 385 (TYR385) e as hélices  $\alpha$  6 – formada pelos resíduos 325-353- e hélice 17 – formada pelos resíduos 520-535 (MALKOWSKI *et al*, 2000).

O carbono 13 do ácido araquidônico no sítio da ciclooxigenase perde o hidrogênio alélico pela ação da TYR 385, sendo este formado em consequência de uma reação anterior no sítio da peroxidase. Neste sítio, ocorre a oxidação do ferro III presente no grupo heme (Figura 2) por ação de dois elétrons reduzidos do substrato peróxido. Esta reação forma um radical positivo na protoporfirina oxoferrílica, que recebe então um elétron da TYR385, formando o radical tirosil mencionado anteriormente (ROUZER; MARNETT, 2009).



**Figura 2.** Monômero de COX-2 com destaque para o grupo heme  
Fonte: desenvolvido pelo autor.

O ataque ao carbono 13 é seguido pela entrada de uma molécula de oxigênio sobre o radical migrado para o carbono 11 durante o processo, formando um radical 11 R-peroxil, que participa de um ataque sobre o carbono 9, culminando na formação de uma ponte endoperoxídica do tipo C9-C11, responsável por gerar a PGG2. Neste processo, há também a formação de um anel ciclopentano intermediário, cujo efeito sobre a molécula faz com que o carbono 15 se aproxime da TYR385, onde sofrerá a adição da segunda molécula de oxigênio e consequente retorno do radical para este resíduo, fazendo com que a ciclooxygenase possa repetir diversas vezes esta reação sem que haja uma nova etapa de ativação pela protoporfirina (ROUZER; MARNETT, 2009). A inserção desta segunda molécula de oxigênio ocorre no sítio da peroxidase e forma um grupo hidroperoxi, transformando PGG2 em PGH2 (Figura 3). Como se pode observar pela descrição anterior, estas reações ocorrem em sítios diferentes da enzima, todavia, estes se intercomunicam, permitindo o dinamismo do processo (MALKOWSKI *et al*, 2000; SMITH; MALKOWSKI, 2019).



**Figura 3.** Esquema da formação de prostaglandinas pela ação da ciclooxigenase  
 Fonte: adaptado pelo autor de Rouzer, C. A., & Marnett, L. J. (2009).

Em humanos há três tipos de ciclooxigenases, são elas ciclooxigenase 1(COX-1), ciclooxigenase 2(COX-2) e ciclooxigenase 3(COX-3) (CROFFORD, 1997; NAITHANI *et al*, 2003; PANNUZIO; COLUCCIA, 2018), sendo todas elas classificadas como proteínas de membrana localizadas na porção luminal do retículo endoplasmático e no

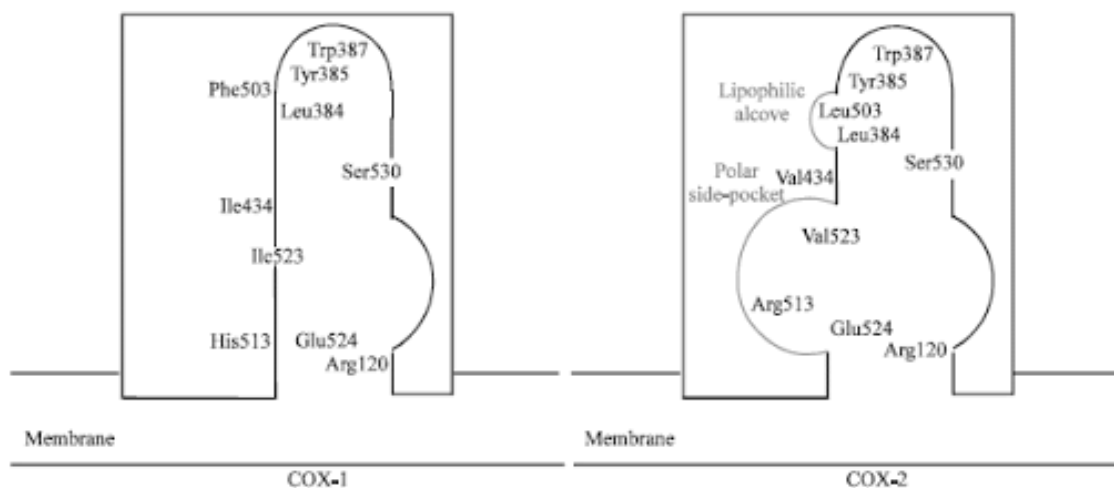
interior do envelope nuclear (SMITH; MALKOWSKI, 2019). A COX-1 é uma proteína constitutiva, posto que é expressa constantemente na maioria dos tecidos em resposta a estímulos hormonais, produzindo prostaglandinas. Estas serão convertidas em compostos que agem sobre a regulação da água e metabolismo de sódio nos rins, a secreção ácida no estômago e a homeostase como um todo; tudo isso mediado pela interação destas prostaglandinas com receptores ligados à proteína G (PAIRET; ENGELHARDT, 1996; VANE; BAKHLE; BOTTING, 1998; MORITA, 2002, ZIDAR *et al*, 2009).

A COX-2, por sua vez, geralmente não é expressa de forma constitutiva, sendo uma enzima indutiva pois surge predominantemente em resposta a fatores de crescimento, promotores de tumor ou citocinas, todos estes presentes no contexto da inflamação, bem como em patologias tais como artrite reumatoide, Alzheimer, doenças neurodegenerativas e até mesmo durante o surgimento de tumores (SEIBERT; MASFERRER, 1994; MORITA, 2002). Ainda já tem sido descritas funções de regulação constitutiva por esta enzima no miocárdio, nos pulmões, rins e no processo ovulatório (ASANO; LILLY; DRAZEN, 1996; HARRIS; BREYER, 2001; SIROIS *et al*, 2004). Ademais, deve ser destacado que, além de estar presente no retículo endoplasmático e na membrana nuclear, a COX-2 também é encontrada no Complexo de Golgi, uma vez que lá são produzidas prostaglandinas direcionadas para a síntese de PGE2 (SMITH; MALKOWSKI, 2019).

Por fim, a COX-3 é uma isoforma de *splicing* no gene de COX-1 caracterizada pela retenção do primeiro íntron, sendo esta expressa principalmente no cérebro e coração; no entanto ainda não se sabe ao certo qual seu papel específico. O que sim se sabe é que a atividade da COX-3 parece ser inibida seletivamente pelo acetoaminofeno (paracetamol) bem como alguns outros anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs) analgésicos e antipiréticos tais como dipirona e antipirina (WILLOUGHBY; MOORE; COLVILLE-NASH, 2000; CHANDRASEKHARAN *et al*, 2002).

Nos vertebrados, COX-1 e COX-2 são codificadas pelos genes *ptgs1* e *ptgs2* respectivamente e apresentam entre si cerca de 60% de identidade (TANABE; TOHNAI, 2002). O que diferencia estas proteínas, além do controle da expressão gênica, é o fato de o sítio ativo de COX-2 ser aproximadamente 25% maior que o de COX-1 em decorrência da substituição dos aminoácidos isoleucina 434 (ILE434), histidina 513 (HIS513) e isoleucina 523 (ILE 523) por valina 434 (VAL434), arginina

513 (ARG 513) e valina 523 (VAL 523) em COX-2 (Figura 4) (BENJAMIN; MALKOWSKI; MALKOWSKI, 2016). Estas alterações permitem que COX-2 seja capaz de oxigenar uma variedade maior de compostos que não são processados por COX-1, fazendo com que seja possível a identificação de substratos específicos para a primeira, tais como o 2-araquidonilglicerol (1) (2-AG) e a araquidonil etalonamida (AEA) (MALKOWSKI *et al*, 2000; LIU *et al*, 2016; SMITH; MALKOWSKI, 2019).



**Figura 4.** Comparação entre os sítios ativos de COX-1 e COX-2  
Fonte: retirado de Al-Turki *et al* (2010).

As enzimas em questão têm extrema importância farmacológica, uma vez que são alvo da classe de fármacos conhecidos como anti-inflamatórios não esteroidais (AINES) tais como a aspirina e o ibuprofeno (LUCIDO *et al*, 2016; ORLANDO; MALKOWSKI, 2016). As ações relacionadas com a inibição da ciclooxigenase por estes compostos são a redução dos sintomas de inflamação, dor e febre, bem como efeito anti-coagulatório, quando usados em baixas dosagens a longo prazo (CASHMAN, 1996; GREEN, 2001; ORCHROCH; MARDINI; GOTTSCHALK, 2003; CROFFORD, 2013). Mais ainda, estudos recentes também relacionam a administração destes fármacos com a redução do risco de desenvolvimento de câncer de cólon e doença de Alzheimer (MCGEER; MCGEER, 2007; DIN *et al*, 2010; GURPINAR; GRIZZLE; PIAZZA, 2014).

O mecanismo de inibição destes compostos depende de cada fármaco (MITCHENER *et al*, 2015). Os inibidores podem ser divididos em quatro categorias, sendo elas: independentes de tempo cujo mecanismo é baseado em uma inibição competitiva, sendo rapidamente reversível, de ligação forte e dependentes do tempo – inibidores ligam-se ao sítio ativo e são alterados para um complexo enzima-inibidor



(EI) que faz com que se desliguem mais vagarosamente -, inibidores mistos – inicialmente atuam como tempo-dependentes, sem inibir completamente a proteína – e inibidores covalentes – modificam quimicamente o sítio ativo (ORLANDO; LUCIDO; MALKOWSKI, 2015).

Apesar da ampla aplicabilidade terapêutica dos AINES diversos efeitos colaterais estão relacionados com seu uso, principalmente em decorrência da falta de especificidade para uma ou outra ciclooxigenase (VAN HECKEN *et al*, 2000; DAVIS; ROBSON, 2016). Isto é devido ao fato que fármacos prescritos para amenizar a inflamação e que, portanto, se baseariam no bloqueio do funcionamento da COX-2, por exemplo, também têm capacidade de se ligarem à COX-1, fazendo com que sua ação também seja impedida (HARRIS; BREYER, 2006) o que neste caso provoca a quebra da proteção gástrica mediada por COX-1 e cuja consequência é o surgimento de úlceras estomacais (WALLACE, 2000; LAPORTE *et al*, 2004; CASTELLSAGUE *et al*, 2012). Além deste, outros efeitos observados pela inibição não seletiva de ciclooxigenases são o desbalanço da homeostase renal e danos ao miocárdio (MOORE; POLLACK; BUTKERAIT, 2015).

Levando em conta os efeitos colaterais negativos da inibição não seletiva das ciclooxigenases, esforços vêm sendo direcionados para o desenvolvimento de fármacos seletivos para uma das enzimas. No caso específico da COX-2, existem diversos compostos disponíveis hoje no mercado, que foram desenvolvidos a partir de moléculas-mãe que apresentavam especificidade para o sítio ativo desta enzima (FLOWER, 2003; BEURA; CHETTI, 2020).

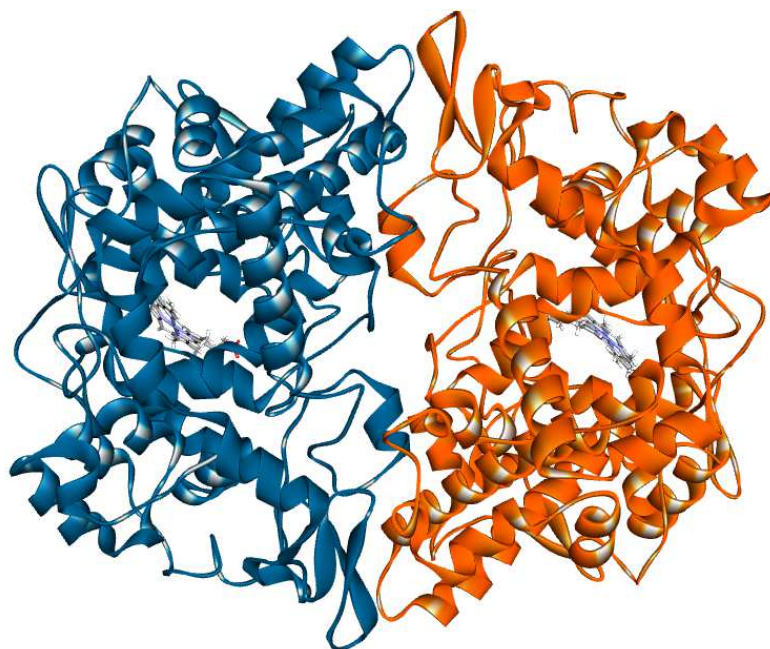
Como exemplo de inibidores seletivos de COX-2 pode-se citar celecoxibe e antipirina derivados de pirazóis, indometacina derivada de indol, etoricoxibe derivado de piridinas, benzoxazol e oxaprozin derivados de oxazóis e ketorolac derivado de pirrol (BEURA; CHETTI, 2020). Estudos clínicos com rofecoxibe e celecoxibe mostraram pouco ou nenhum efeito sobre a mucosa gástrica e ulceração (HAWKEY, 2001). Ainda, apesar desta variedade de compostos base, estudos computacionais recentes conduzidos por Hassan e colaboradores indicam que o caminho mais promissor para a inibição específica de COX-2 está nas moléculas derivadas de pirazóis (HASSAN *et al*, 2019).

Apesar do grande número de inibidores já desenvolvidos para COX-2, é ainda necessário que se continue buscando por novos compostos, posto que fármacos deste

gênero apresentaram complicações graves geradas pela alteração da homeostase, principalmente sobre os sistemas renal e cardiovascular (PATRONO, 2016). Além disso, é essencial que se busque por compostos cada vez mais seletivos, já que vários fármacos ditos específicos para COX-2 ainda apresentam certa afinidade por COX-1 (SMITH; MALKOWSKI, 2019).

## 1.2 ESTRUTURA DA COX-2

Estruturalmente, a ciclooxygenase 2 é um homodímero, ou seja que é formada por dois monômeros com sequências idênticas (Figura 5). No entanto, é considerada um heterodímero funcional, uma vez que cada um destes monômeros apresenta atividade distinta, sendo um deles a subunidade catalítica (Ecat), enquanto o outro é denominado subunidade alostérica (Eallo) (SMITH; MALKOWSKI, 2019). Neste caso, sabe-se que a ligação de alguns tipos de compostos à subunidade alostérica podem afetar a atividade da subunidade catalítica, como é o caso do naproxeno e flurbiprofeno. No entanto, é igualmente possível que a ligação de compostos neste sítio alostérico module de maneira positiva a ação do sítio catalítico, como é o caso de ácidos graxos com cadeias variando entre doze e vinte carbonos e o ácido araquidônico (DONG *et al*, 2016).



**Figura 5.** Estrutura do homodímero de COX-2

Fonte: desenvolvido pelo autor.

Cada monômero de COX-2 é dividido em três domínios sendo eles o domínio semelhante ao fator de crescimento epidermal, o domínio de ligação à membrana e o domínio catalítico, sendo este último portador do grupo heme, uma protoporfirina que

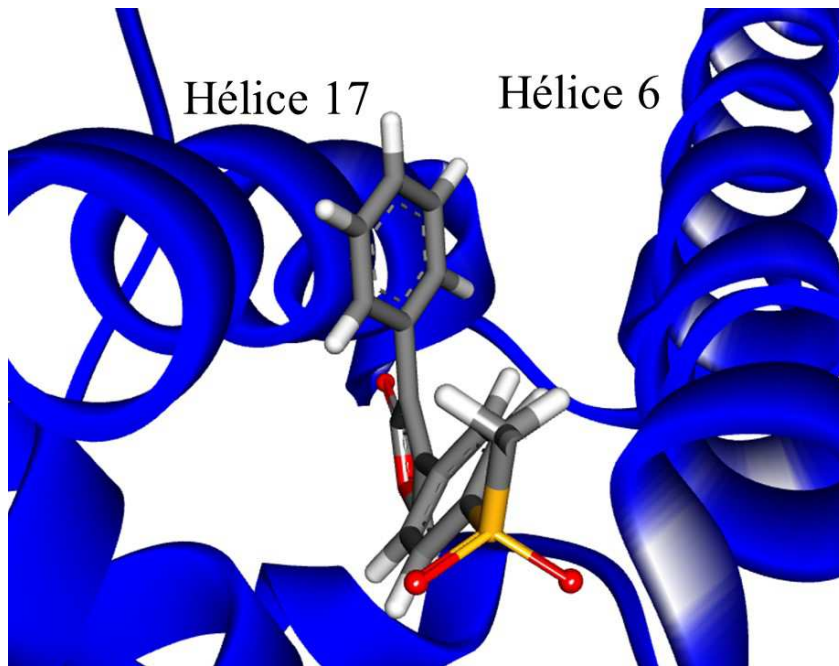
atua como modulador alostérico da enzima (PICOT; LOLL; GRAVITO, 1994). Ainda, a COX-2 com peso molecular de 68,996 Da e é formada por 604 aminoácidos sendo classificada como uma glicoproteína pelo fato de estar glicosilada ao longo da cadeia, (LUCIDO *et al*, 2016).

O sítio ativo da COX-2 é formado por aminoácidos carregados, polares e aromáticos, sendo eles: LYS211 e ASP213 carregados; GLN203, THR206, HIS207, THR212, HIE214, ASN222, GLN289, ASN382, HIE386 e HIE388 polares; TYR148, ALA199, PHE200, ALA202, PHE210, VAL291, TYR385, TRP387, LEU390, LEU391 e VAL447 hidrofóbicos (BEURA; CHETTI, 2020).

### 1.3 INIBIDORES DO TIPO COXIBE E A COX-2

Os inibidores seletivos para COX-2 são genericamente conhecidos como coxibes e interagem com o sítio da ciclooxigenase indisponibilizando-o para a catálise do substrato natural. Estes compostos são construídos a partir de um diaril-heterociclo e apresentam porções de sulfonamida ou metil-sulfona como forma de garantir especificidade à COX-2 pela interação com a VAL523, uma vez que em COX-1 esta posição é ocupada por uma isoleucina. Neste caso, a presença da valina permite que os ligantes acessem um canal hidrofílico derivado do canal principal e possam ser acomodados no sítio ativo (SMITH; DEWITT; GARAVITO, 2000; BENJAMIN; MALKOWSKI; MALKOWSKI, 2016).

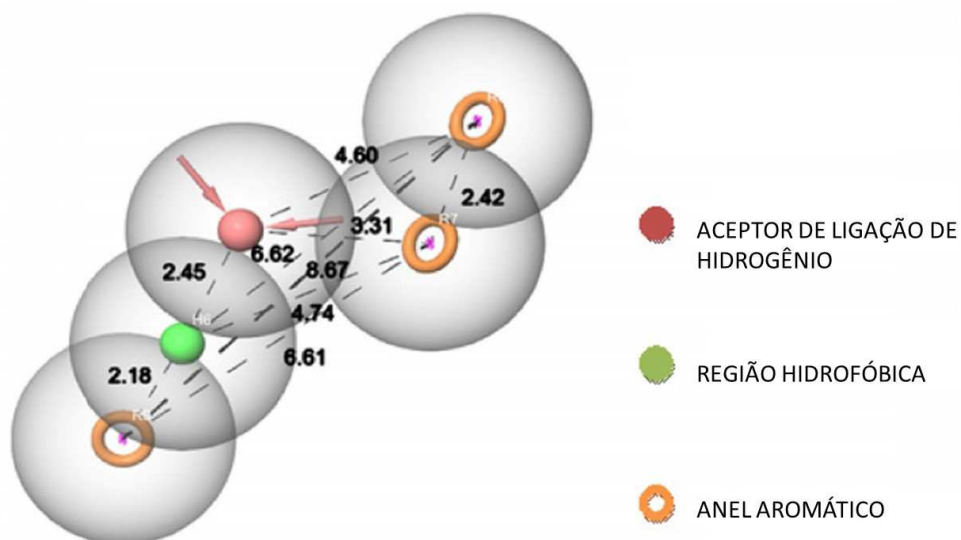
Uma vez alocados no sítio ativo, os inibidores do tipo coxibe fazem interações não covalentes apresentando um posicionamento comum com o anel fenílico estendido em direção à cadeia lateral da TYR385, entre as hélices  $\alpha$  17 e 6 (Figura 6) (BENJAMIN; MALKOWSKI; MALKOWSKI, 2016).



**Figura 6.** Rofecoxibe no sítio da ciclooxigenase em COX-2

Fonte: desenvolvido pelo autor.

Os resultados da análise in sílico de compostos capazes de inibir seletivamente COX-2 (BEURA; CHETTI, 2020) sugerem que bons inibidores da ciclooxigenase devem apresentar uma região aceptora de ligação de hidrogênio, uma porção hidrofóbica e três anéis aromáticos (Figura 7). Além disso, os autores sugerem que as ligações de hidrogênio responsáveis por manter estes ligantes ancorados na cavidade são estabelecidas com resíduos polares, bem como os anéis presentes nestes compostos fazem interações  $\pi$ - $\pi$  com os resíduos aromáticos da cavidade, também essenciais para sua fixação no sítio ativo.



**Figura 7.** Estrutura ideal proposta para inibidores seletivos de COX-2

Fonte: retirado de Beura, S., & Chetti, P. (2020).

## 1.4 INTERAÇÕES NÃO COVALENTES EM PROTEÍNAS

As proteínas apresentam quatro níveis na sua organização estrutural, o primeiro é a chamada estrutura primária que é determinada pelo tipo e sequência de aminoácidos, o segundo é a estrutura secundária, caracterizada pelas organizações locais em fitas  $\beta$  formando folhas  $\beta$ , hélices  $\alpha$  e *turns*. A estrutura terciária define a estruturação, o chamado enovelamento, geral da cadeia e finalmente a quaternária, que define a estrutura funcional da proteína, que pode ser monomérica ou no caso de proteínas com mais de uma cadeia, pela interação entre estas subunidades. No caso da estrutura primária, a ligação entre os aminoácidos é formada pelas ligações peptídicas. Por outro lado, para as demais estruturas o papel das interações não covalentes é determinante para o enovelamento proteico correto, sendo igualmente essenciais para determinação da flexibilidade e especificidade destas moléculas. Ainda deve ser lembrado que existe uma ligação covalente, a ligação dissulfeto, que contribui para o enovelamento das proteínas (CARACELLI; ZUKERMAN-SCHPECTOR, 2010).

O que se designa genericamente como interação não covalente engloba uma miríade de formas de interação entre átomos, dentre elas as ligações de hidrogênio, as ligações envolvendo sistemas  $\pi$  e as forças de *van der Waals* (CERNY; HOBZA, 2007). Estas interações são determinantes para a estruturação e funcionamento das proteínas, assim como para o estudo dos contatos estabelecidos entre ligantes e o sítio ativo de uma enzima, por exemplo. Apesar do fato de que alguns compostos fazem ligações covalentes com o sítio ativo das proteínas, em particular os inibidores que impedem a entrada permanente do substrato na proteína, a maioria dos ligantes, o que inclui os substratos naturais da proteína, interage com estas regiões via interações não covalentes (WANG *et al*, 2001; SMITH *et al*, 2009; JOHNSON *et al*, 2010). De forma que é possível compreender a importância da determinação e análise detalhada destes tipos de interações nos complexos ligante-proteína, principalmente no contexto de desenvolvimento de novos fármacos (ZHOU; HUANG; TIAN, 2012).

As ligações de hidrogênio são, por exemplo, as responsáveis pela formação da estrutura secundária em proteínas, formando a estrutura helicoidal das hélices  $\alpha$  e a formação das folhas  $\beta$  pregueadas unindo as fitas  $\beta$ . A ligação de hidrogênio é uma interação entre três centros e quatro elétrons, dois centros correspondem ao chamado doador (um átomo eletronegativo como F, O, N, C, S, Cl, Br, I) que está ligado

covalentemente ao segundo centro que é o átomo de hidrogênio, e o terceiro centro é o acceptor e carreador de um par solitário de elétrons, neste caso este pode ser um segundo átomo eletronegativo ou uma ligação múltipla, ou seja, uma ligação  $\pi$ . De forma que o acceptor da ligação de hidrogênio não é um átomo, mas um par de elétrons localizado sobre esse átomo ou pares de elétrons localizados sobre uma ligação múltipla ou ainda a densidade eletrônica delocalizada sobre um anel benzênico. Enfim, uma interação X-H...A é chamada de ligação de hidrogênio, se é uma ligação localizada e X-H é um doador de próton à A.

Dado o caráter direcional deste tipo de ligação, há limites para os ângulos e distâncias entre os átomos envolvidos, assim a distância entre o doador e o acceptor da ligação de hidrogênio deve ser menor que a soma dos raios de *van der Waals* dos átomos envolvidos e o ângulo ao redor do átomo de hidrogênio, D-H...A, deve estar no intervalo de 100–180° (GILLI; GILLI, 2010). O caráter direcional é evidenciado pelo ângulo ao redor do hidrogênio como pelo fato que a energia eletrostática é a maior contribuição para a energia total deste tipo de interação (ERMONDI; CARON, 2006).

Outra forma de interação não covalente é aquela envolvendo sistemas  $\pi$ , sendo extremamente variadas e dependentes tanto da natureza do doador quanto do sistema acceptor. Em proteínas, estas interações envolvem aminoácidos com cadeias laterais aromáticas, sendo eles: triptofano, histidina, fenilalanina e tirosina. Quando as interações são entre sistemas  $\pi$ , a energia de dispersão de London é o principal componente para a manutenção do sistema, sendo que o tipo de átomo presente nos anéis é extremamente importante para determinação do tipo de interação e da geometria observada (WHEELER; HOUK; KN, 2009). Ainda, os tipos de dipolo presentes podem determinar atração ou repulsão entre estes tipos de sistemas (MECOZZI; WEST; DOUGHERTY, 1996; WATERS, 2002; MEYER; CASTELLANO; DIEDERICH, 2003). Além das interações entre anéis, também se observa interações do tipo cátion- $\pi$ , que podem envolver aminoácidos positivamente carregados como arginina, lisina ou histidina em sua forma protonada (MAHADEVI; SASTRY, 2013) ou ainda cátions como Au (CARACELLI; ZUKERMAN-SCHPECTOR; TIEKINK, 2013). Finalmente, deve-se mencionar as interações do par isolado de elétrons-sistemas  $\pi$  envolvendo elementos de grande importância biológica como Sb e Se (CARACELLI; HAIDUC; ZUKERMAN-SCHPECTOR; TIEKINK, 2013; CARACELLI; ZUKERMAN-SCHPECTOR; TIEKINK, 2012).

Finalmente, mas não menos importantes, as interações de *van der Waals* que englobam vários tipos de contato envolvendo dipolos permanentes e induzidos, que criam forças atrativas capazes de aproximar átomos de um ligante e um determinado resíduo nas proteínas (ROTH; NEAL; LENHOFF, 1996). Dentro desta classe estão as forças de Keesom – que ocorrem entre dois dipolos permanentes – as forças de dispersão de London – que ocorrem entre dois dipolos induzidos – e as forças entre um dipolo induzido e um dipolo permanente (ROTH; LENHOFF, 1993; 1995).

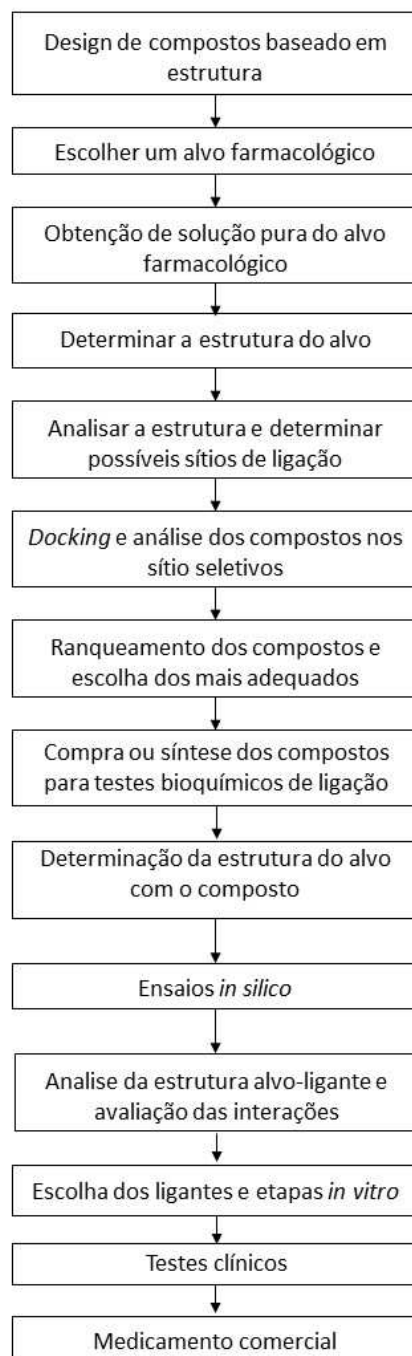
## 1.5 DESENHO DE FÁRMACOS BASEADO EM ESTRUTURA (STRUCTURE-BASED DRUG DESIGN)

Antes do desenvolvimento das técnicas modernas de difração de raio X e de biologia molecular em geral, parecia utópica a possibilidade de construção e aprimoramento de compostos específicos para um determinado alvo farmacológico. Na década de 1960, com o aparecimento da eletroforese de proteínas e, posteriormente, do sequenciamento de aminoácidos e em particular nas últimas décadas o desenvolvimento de técnicas e equipamentos sofisticados de difração de Raio X, houve maior entendimento das estruturas dos alvos abrindo assim os caminhos para que a especificidade dos fármacos começasse a ser trilhada. Todavia, foi somente com os dados do projeto genoma humano e a revolução das ômicas que esta ciência pode, de fato, se tornar realidade. Hoje, conhecemos como *structure-based drug design* (ou desenho de fármacos baseado em estrutura) um conjunto de ferramentas que permite que se identifiquem alvos específicos para determinado efeito, se conheça sua estrutura e sejam desenvolvidos compostos exclusivos e altamente seletivos para estas estruturas (BOHACEK; MCMARTIN; GUIDA, 1996; ANDERSON, 2003; MAK; PICHKA, 2019).

O processo de desenho de compostos baseado em estrutura é iterativo, ou seja, feito várias vezes até se obter um resultado otimizado. O passo inicial é a escolha do alvo farmacológico, seguido da obtenção deste alvo purificado e cristalizado para determinação de sua estrutura 3D por cristalografia de raio X ou na impossibilidade de obter um cristal utilizando NMR ou ainda por modelagem molecular. Obtida a estrutura tridimensional deve-se proceder a uma análise dos sítios de ligação deste alvo, o que pode ser feito por identificação de domínios homólogos com outros conhecidos ou em casos favoráveis pela existência da estrutura tridimensional do alvo com um ligante. A etapa seguinte envolve ensaios *in silico* começando com o *docking* molecular e

eventualmente se necessário estudos de dinâmica molecular entre o alvo e os compostos de interesse com o objetivo de analisar a estabilidade das interações entre eles e a enzima. Uma vez feita esta análise, serão escolhidos os ligantes com o maior número de interações específicas e seletivas, que poderão ser utilizados para a etapa de ensaios *in vitro*, em que deverão ser observados coeficientes de inibição, biodisponibilidade e potência. Caso estes estudos resultem em um composto com bons resultados, este é encaminhado para ensaios *in vivo* e eventualmente testes clínicos, podendo culminar em um fármaco comercial (ANDERSON, 2003). Este processo encontra-se esquematizado na Figura 8.





**Figura 8.** Esquema do processo de *structure-based drug design*  
 Fonte: retirado de Anderson, A. C. (2003).

## 1.6 DOCKING MOLECULAR

Docking molecular, ou simplesmente docking, é o processo de se encontrar o melhor ajuste para o encaixe entre duas moléculas. Inicialmente esta busca era realizada visualizando as moléculas em programas gráficos, onde se tentava manualmente obter o melhor ajuste para as duas formarem um complexo (VEJA-TEJIDO; CARACELLI;

ZUKERMAN-SCHPECTOR, 2006). Hoje em dia, há vários programas que permitem realizar essa busca de forma mais automatizada. Normalmente uma molécula é chamada de receptor (proteínas, enzimas, DNA, etc.) e a outra molécula é chamada de ligante (em geral, uma pequena molécula). O docking é um método de simulação computacional no qual se pretende avaliar a formação de complexos receptor-ligante. Cálculos de docking têm sido utilizados tendo como objetivos fazer *screening* virtual e/ou se entender mecanismos de reação (CUNHA et al., 2006; CARACELLI et al., 2018).

O processo de docking pode ser dividido em quatro etapas. A primeira delas é o planejamento do experimento *in silico*, ou seja, a escolha dos receptores e ligantes a serem empregados no estudo. A segunda etapa é a seleção do sítio de ligação e raio da esfera de trabalho, que serão essenciais para determinar a região específica em que a melhor colocação do ligante deverá ser buscada. A terceira etapa envolve a realização do experimento computacional com objetivo de formar complexos entre ligante e proteína. Para a validação do experimento, ou seja, para a determinação dos parâmetros a serem utilizados nos cálculos se realiza o procedimento conhecido como *redocking*, que é a reprodução da estrutura do complexo cristalográfico ligante-proteína utilizando o docking molecular. Por fim, na quarta etapa, avaliam-se os resultados obtidos no experimento, levando em conta as poses em tela gráfica, os escores resultantes dos cálculos, mas fundamentalmente o pesquisador deverá fazer uma análise detalhada das interações receptor-ligante, utilizando telas gráficas, e sua correlação com dados experimentais (KRUMRINE et al., 2003; CARACELLI et al., 2018).

O método de cálculo para a formação de um complexo receptor-ligante é chamado algoritmo de *docking* que em geral permite que se defina a flexibilidade tanto do ligante, quanto da proteína, explorando desta forma todas as formas de interação entre eles (JONES; WILLETT; GLEN, 1995). Cada programa possui um algoritmo diferente sendo possível separar os programas de *docking* de acordo com o algoritmo utilizado: programas de abordagem incremental a exemplo do Flex -, programas com algoritmos baseados em algoritmos geométricos como o DOCK, programas que utilizam algoritmos genéticos como o GOLD, programas de busca sistemática como o Glide e ainda os baseados em métodos de Monte Carlo a exemplo do LigandFit (PAGADALA; SYED; TUSZYNSKI, 2017).

Neste trabalho foi utilizado o programa GOLD (sigla do inglês para *Genetic Optimisation for Ligand Docking*) que utiliza um algoritmo genético para a realização de experimentos de *docking* molecular. Este tipo de algoritmo utiliza termos genéticos para a descrição dos cálculos, em que um gene representa os parâmetros de orientação e conformação do ligante no alvo, o cromossomo, chamado neste contexto de indivíduo, e o conjunto total de genes, enquanto a população é o conjunto de soluções obtidas (OSHIRO; KUNTZ; DIXON, 1995; GARDINER; WILLETT; ARTYMIUK, 2001; MAGALHÃES; BARBOSA; DARDENNE, 2004). Neste caso, inicia-se com uma população de  $n$  indivíduos, sendo que cada um representa uma forma do complexo proteína-ligante e carrega consigo uma medida de avaliação, conhecida como escore (resultado de uma função de ajuste). Estes indivíduos então são selecionados, de forma que quanto maior for o valor adaptativo ou neste caso escore maior será a chance de que seja propagado para as próximas gerações. Neste processo, ainda ocorrem as mutações, que aumentam a capacidade de exploração adaptativa pois geram alterações de maneira estocástica sobre os indivíduos (GARDINER; WILLETT; ARTYMIUK, 2001).

No GOLD, o algoritmo genético é baseado em um método de ajuste do ligante ao sítio a partir de uma função *fitness* base (função de ajuste), que pode ser o *GoldScore*, *ChemScore* ou outros. No caso do *GoldScore* a função de ajuste envolve a energia de ligação de hidrogênio do complexo receptor ligante, a energia de ligação de *van der Waals*, a energia de ligação de hidrogênio intramolecular do ligante e a energia de *van der Waals* interna do ligante (JONES; WILLETT; GLEN, 1995; JONES *et al*, 1997)

No nosso caso utilizamos a função *GoldScore*, na qual os quatro componentes mencionados acima são encontrados da seguinte forma:

$$\text{GoldScore Fitness} = S(\text{hb\_ext}) + 1,3750 * S(\text{vdw\_ext}) - S(\text{hb\_int}) - S(\text{vdw\_int})$$

S(hb\_ext): energia de ligação de hidrogênio do complexo proteína-ligante;

S(vdw\_ext): energia de *van der Waals* entre proteína-ligante;

S(vdw\_int): energia de *van der Waals* do ligante;

S(hb\_int): energia de ligação de hidrogênio intramolecular do ligante.

O resultado final é fornecido em kcal/mol e o campo de força utilizado no programa é o Tripos 5.2 *Force Field* (CLARK; CRAMER; VAN OPDENBOSCH, 1989).

## 2 OBJETIVOS

O objetivo do presente trabalho é estudar, por *docking* molecular, a formação de complexos da ciclooxigenase 2 e os inibidores seletivos celecoxibe (CEL), rofecoxibe (RCX) e *Korean 21* e compará-los com os de um novo composto de estrutura similar, o RJ4A, e assim verificar a possibilidade deste ser um inibidor desta enzima e assim propô-lo como candidato a estudos *in vitro* e *in vivo*.

## 3 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

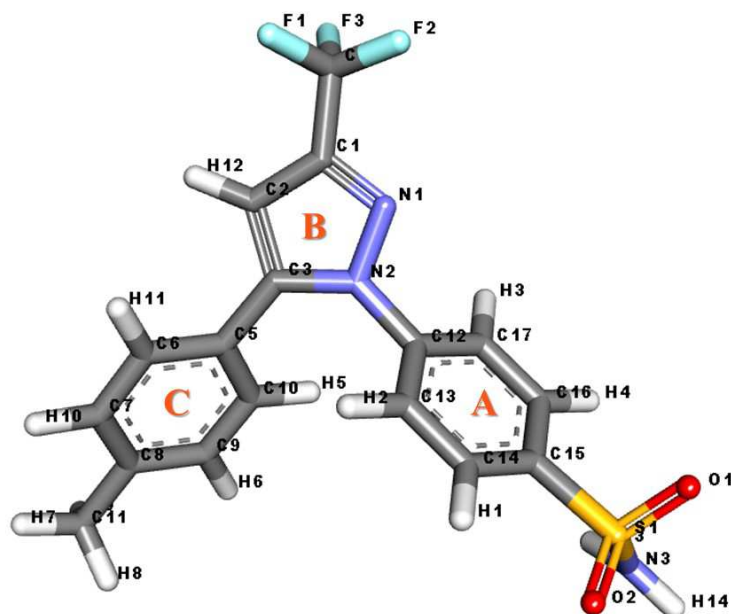
### 3.1 SELEÇÃO DA ESTRUTURA TRIDIMENSIONAL DA MOLÉCULA RECEPTORA

A busca por estruturas de COX-2 foi feita nos bancos de dados de proteínas PDB e PDBSum. A estrutura selecionada foi a de código PDB 5IKR (ORLANDO; MALKOWSKI, 2016) do organismo *Homo sapiens*, expressa pelo sistema *Spodoptera frugiperda*, sem mutações e com resolução de 2,34 Å. Esta estrutura foi escolhida pois a COX-2 está complexada com ácido mefenâmico (ácido (2-[(2,3-dimetilfenil)amino]benzoico) que é um inibidor seletivo da enzima. Ainda apresenta os dois monômeros na forma glicosilada por moléculas de 2-acetamido-2-deoxi-beta-D-glicopiranosose (código PDB: NAG) nos resíduos de asparagina 144 (ASN144) e 410 (ASN410) de cada monômero.

### 3.2 SELEÇÃO DOS LIGANTES

#### 3.2.1. Celecoxibe

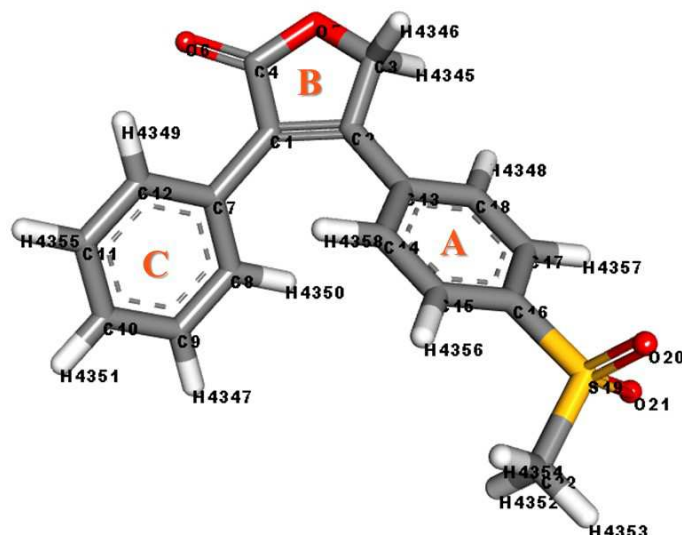
O celecoxibe ou 4-[5-(4-metilfenil)-3-(trifluorometil)-1h-pirazo-1-il]benzenosulfonamida é comercializado com os nomes Celebrex, Consensi, CeleXib, NuDroxiPAK, Onsenal, Capxib, LidoXib e variantes do nome celecoxibe. É indicado como antiinflamatório não esteroideal (AINE) com pouco risco de sangramento gastrointestinal quando comparado a outros AINES. A referência *PubChem* deste composto é 2662, a identificação no *DrugBank*, DB00482 e o código PDB, CEL. Sua estrutura tridimensional foi extraída da estrutura com código PDB 1OQ5 (WEBER et al, 2004) e é mostrada na Figura 9.



**Figura 9.** Estrutura do celecoxibe  
 Fonte: desenvolvido pelo autor.

### 3.2.2 Rofecoxibe

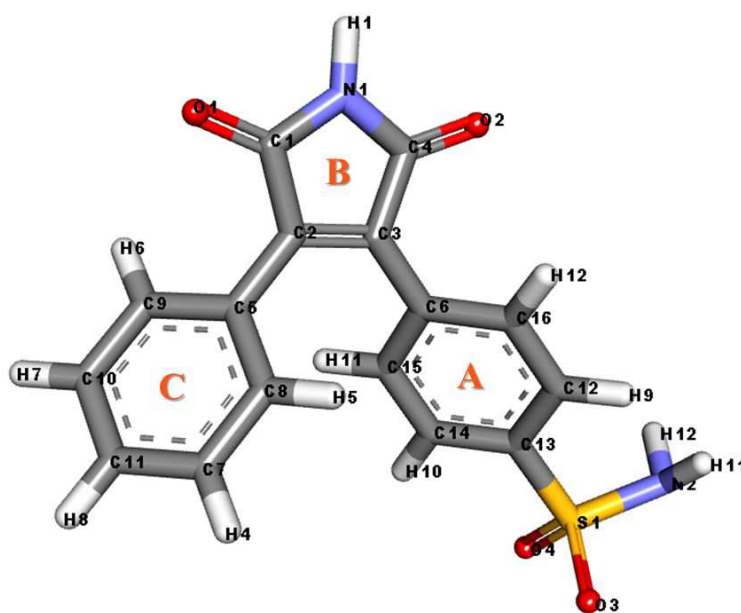
O rofecoxibe ou 3-(4-metilsulfonilfenil)-4-fenil-2H-furan-5-ona foi comercializado sob o nome de Vioxx, sendo retirado do mercado em 2004 devido a um estudo que mostrou que depois de 18 meses, aqueles que ingeriram 25 mg de Vioxx tiveram o risco de problemas cardiovasculares aumentado em comparação com aqueles que receberam o placebo (U.S. Food and Drug Administration. "Vioxx (rofecoxibe) Questions and Answers." September 30, 2004. [www.fda.gov](http://www.fda.gov)). A identificação deste composto no *DrugBank* é DB0533, sua referência *PubChem* é 5090 e o código PDB, RCX. A sua estrutura tridimensional foi extraída da estrutura de código PDB 5KIR (ORLANDO; MALKOWSKI, 2016) e pode ser vista na Figura 10.



**Figura 10.** Estrutura do rofecoxibe  
 Fonte: desenvolvido pelo autor.

### 3.2.3 Korean 21

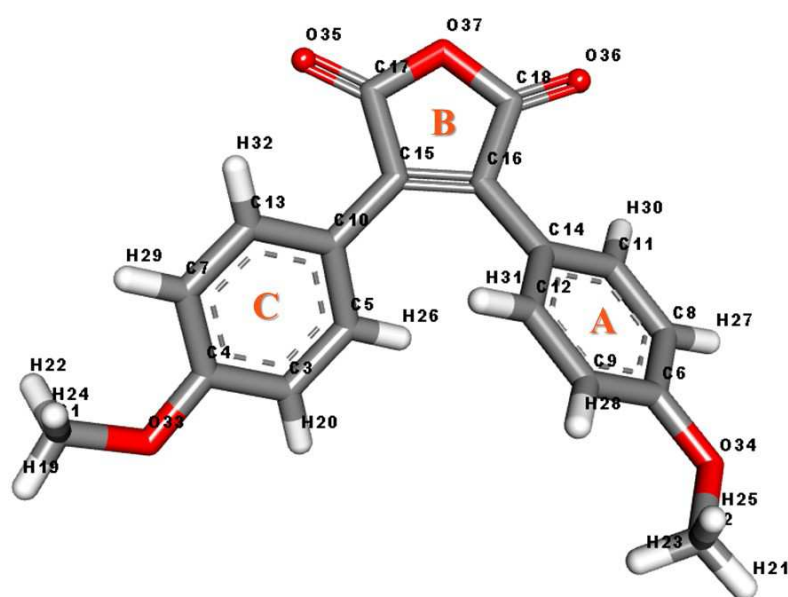
Denominado neste estudo como *Korean 21*, o composto 3-fenil-4-(4-sulfonamida)-1H-pirrol-2,5-diona foi sugerido por estudos de IC50 como um bom inibidor para COX-2 (PHAM *et al*, 2012). Sua estrutura foi modelada utilizando o programa *Discovery Studio* v3.5 (DISCOVERY STUDIO VISUALIZER® DSV v3.5) e mostrada na Figura 11.



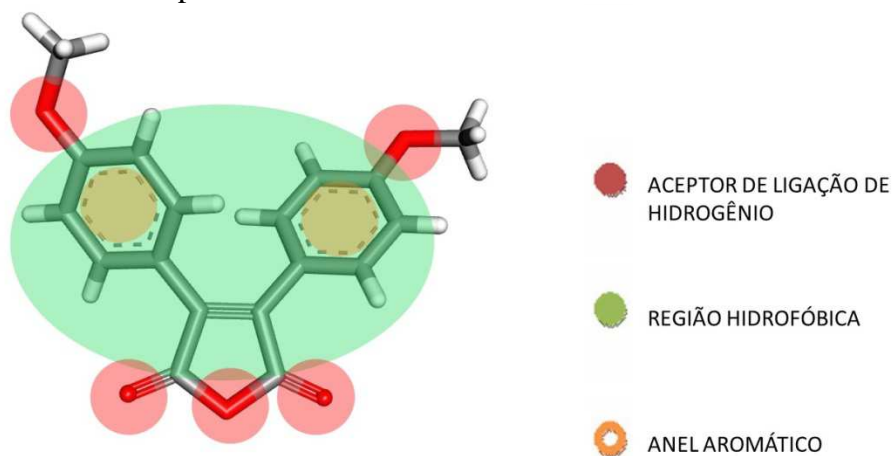
**Figura 11.** Estrutura do composto *Korean 21*  
 Fonte: desenvolvido pelo autor.

### 3.2.4 RJA4

Denominado neste estudo RJA4, o composto foi sintetizado pelo Dr. Ariel L. Llanes Garcia (GARCIA, 2008). A estrutura foi determinada por difração de Raio X (dados ainda não publicados) e está mostrada na Figura 12 com os átomos identificados bem como a nomenclatura dos anéis. O composto em questão foi avaliado no presente trabalho como possível inibidor de COX-2, uma vez que apresenta as características propostas por Beura e Chetti (2020) necessárias para ser um inibidor de esta enzima, ou seja, a presença de uma região aceptora de ligação de hidrogênio, uma porção hidrofóbica e dois anéis aromáticos (Figura 13).

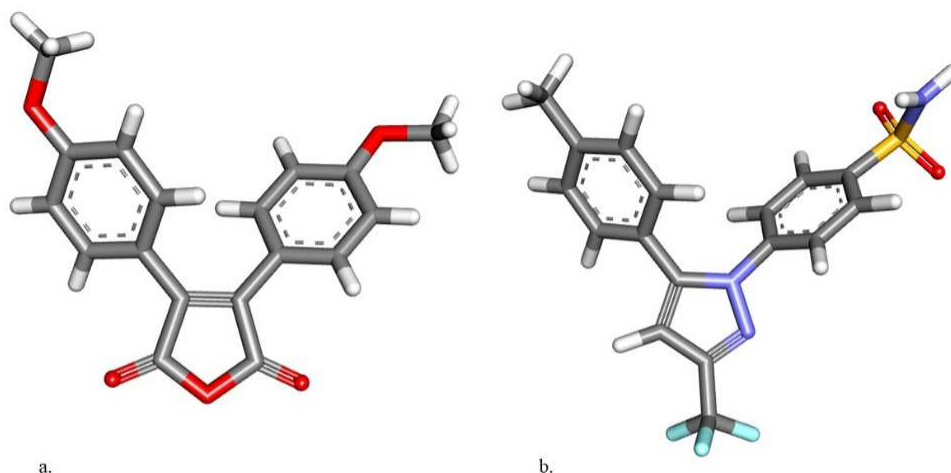


**Figura 12.** Estrutura de RJA4  
Fonte: desenvolvido pelo autor.



**Figura 13.** Estrutura do composto RJA4 com as regiões de Baura e Chetti destacadas  
Fonte: desenvolvido pelo autor.

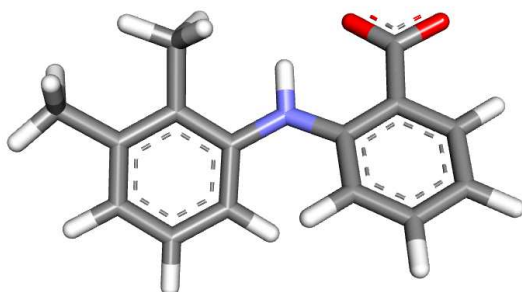
Além do fato de apresentar as características necessárias para ser um bom ligante de COX-2, o composto em questão também se assemelha muito em termos estruturais de outros coxibes disponíveis no mercado, como é o caso do celecoxibe. A comparação entre as duas estruturas pode ser vista na Figura 14. Ambos apresentam três anéis, sendo dois deles aromáticos substituídos, e um anel central de cinco átomos.



**Figura 14.** Estruturas do RJ4 (a) e do celecoxibe (b)  
Fonte: desenvolvido pelo autor.

### 3.2.5 Ligante extraído para redocking

Para o *redocking* utilizou-se o ligante cristalográfico extraído da estrutura de código PDB 5IKR denominado ácido 2-[(2,3-dimetilfenil)amino]benzoico (ORLANDO; MALKOWSKI, 2016). Sua identificação no *DrugBank* é DB00784, a referência no PubChem, 4044 e o código PDB ID8. A estrutura do ligante pode ser vista na Figura 15.



**Figura 15.** Estruturas do ligante cristalográfico extraído de 5IKR  
Fonte: desenvolvido pelo autor



### 3.3 PREPARAÇÃO DAS ESTRUTURAS PARA A REALIZAÇÃO DE CÁLCULOS DE DOCKING

O arquivo da estrutura obtido no PDB contém as coordenadas cristalográficas dos átomos exceto dos hidrogênios, os quais foram adicionados com o Programa GOLD (JONES et al., 1995; JONES *et al.*, 1997). Além disso, o arquivo com os dados cristalográficos da proteína encontrava-se no formato *.pdb*, sendo necessário convertê-lo para *.mol2* para ser utilizado pelo programa GOLD, o que foi feito utilizando o programa *Discovery Studio v3.5* (DISCOVERY STUDIO VISUALIZER® DSV v3.5).

### 3.4 REALIZAÇÃO DO EXPERIMENTO DE DOCKING

A primeira etapa foi a da validação dos parâmetros a serem empregados nas etapas posteriores de *docking*. Este processo chamado *redocking*, consiste em, utilizando o *docking*, reproduzir o complexo cristalográfico entre, neste caso, a proteína 5IKR e seu ligante ID8 que foi previamente extraído. Uma vez obtidos os parâmetros foram feitos os experimentos de *docking* com os ligantes coxibes, *Korean 21* e *RJA4*.

Para o experimento de *docking*, o tamanho de cavidade escolhido foi de 6Å com base nos parâmetros obtidos no *redocking*. Em todos os casos os ligantes foram mantidos flexíveis. Estes experimentos geraram uma série de poses para cada ligante dentro da cavidade, sendo estas agrupadas em clusters de acordo com a pose e analisadas em particular aqueles com maior número de repetições, e dentro de cada cluster aquela com maior valor de *score* foi selecionada para análise detalhada em tela gráfica.

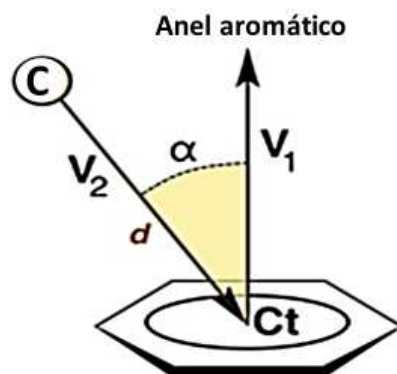
### 3.5 VISUALIZAÇÃO EM TELA GRÁFICA E ANÁLISE DE INTERAÇÕES

Os resultados dos experimentos de *docking*, que são as poses dos ligantes, ou seja a posição, orientação e conformação, no sítio receptor foram analisados. A análise por visualização gráfica é a parte fundamental do trabalho de *docking*, é nesta etapa que o pesquisador deve tomar as suas decisões na seleção das moléculas, baseado no estudo das interações, do padrão de poses dos ligantes, na comparação de moléculas e dos sítios de ligação.

Neste estudo, foram avaliadas as ligações de hidrogênio, as interações de *van der Waals* e as interações  $\pi$ . As análises foram feitas para cada ligante a fim de determinar

as interações responsáveis pela formação do complexo, permitindo assim comparar as interações estabelecidas pelo composto RJA4 com as dos outros compostos de atividade conhecida e desta forma avaliar seu potencial para a inibição de COX-2. Para confirmar os resultados das poses obtidas pelo *docking* e selecionadas para comparação com RJA4, utilizaram-se as poses cristalográficas dos ligantes valdecoxibe, celecoxibe e rofecoxibe das estruturas 3LN1 (WANG *et al.*, 2010) e 5KIR (ORLANDO; MALKOWSKI, 2016). Para análise da pose de *Korean 21*, utilizou-se os dados discutidos por Wang e seus colaboradores no mesmo trabalho que descrevem a estrutura 3LN1 (WANG *et al.*, 2010).

Para a análise em tela gráfica foi utilizado o *Discovery Studio* (DISCOVERY STUDIO VISUALIZER® DSV V3.5), que identifica ligações de hidrogênio e interações de *van der Waals*. No entanto, quando se trata de interações  $\pi$  com anéis aromáticos a situação é mais complexa, pois estas não estão ainda “embutidas” nos programas de visualização. Sendo assim, a detecção destas interações foi realizada utilizando o programa WIM (*Weak Interaction Mapping*) (WIM, 2017), que calcula e valida sua existência por meio de três variáveis: o vetor  $V_1$  que parte do centroide do anel aromático e é normal ao anel, o vetor  $V_2$  que une o átomo envolvido na interação  $\pi$  e o centroide e o ângulo  $\alpha$  formado entre estes dois vetores (Figura 16).



**Figura 16.** Parâmetros utilizados pelo WIN para análise das interações  $\pi$

Fonte: retirado de SILVA, R.F. et al., 2018 e adaptado pelo autor.

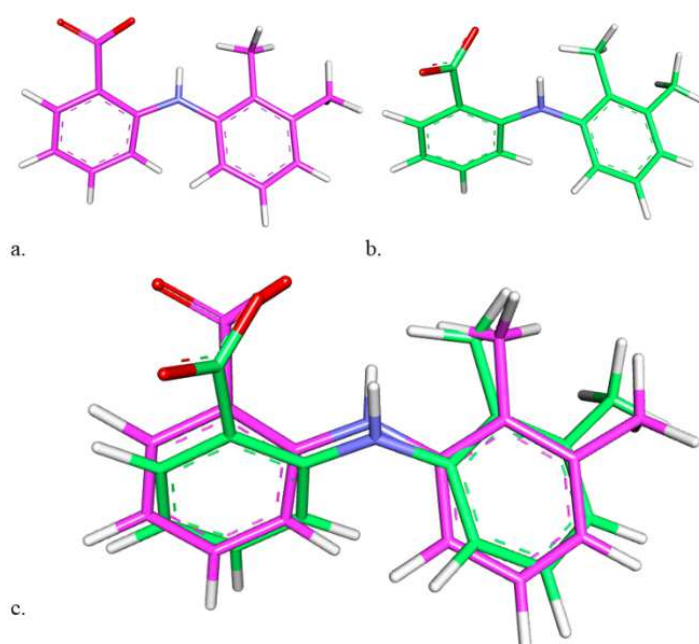
Para obter mais detalhes sobre a interação  $\pi$  dos quatro compostos e a valina 523 (VAL523), responsável por garantir especificidade de ligação à COX-2, foram realizados cálculos computacionais baseados em densidade eletrônica. Estes foram realizados com o programa NCIPlot (CONTRERAS-GARCIA et al., 2011), que fornece uma visualização desta interação não covalente utilizando um esquema de cores

vermelho-azul-verde, em que o vermelho é indicativo de uma forte interação repulsiva, o azul, de forte interação atraente, enquanto o verde, de uma interação atrativa fraca (JOHNSON *et al*, 2010).

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 REDOCKING

A etapa de *redocking* permitiu determinar os parâmetros que seriam utilizados para as etapas posteriores de *docking*, uma vez que a pose obtida ao final do experimento reproduziu o observado na estrutura cristalográfica, como apresentado na Figura 17.



**Figura 17.** Resultados da etapa de *redocking*. a. pose do ligante cristalográfico; b. pose do ligante obtida por *redocking*; c. a sobreposição da pose cristalográfica com a obtida por *redocking*

Fonte: desenvolvido pelo autor.

### 4.2 DOCKING

#### 4.2.1. Celecoxibe

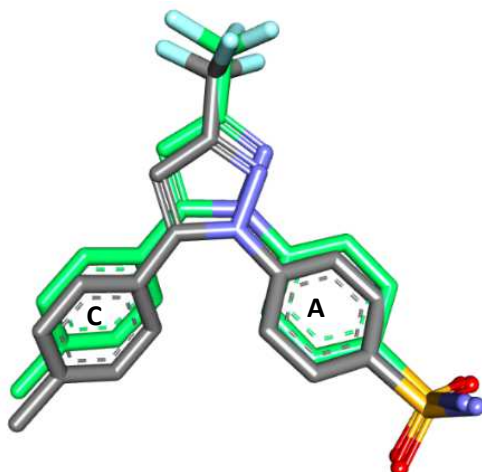
Os resultados de *docking* para o celecoxibe mostraram o composto inserido entre as hélices  $\alpha$  6 e 17, como esperado para o posicionamento de compostos coxibes. Foram identificadas ligações de hidrogênio com valina 116 (VAL116), leucina 352 (LEU352), tirosina 355 (TYR 355), leucina 359 (LEU 359), fenilalanina 518 (PHE 518) e leucina 531 (LEU 531) e interações de *van der Waals* com a histidina 90 (HIS90). Ademais,

foram encontradas três interações com os anéis aromáticos do celecoxibe, sendo todas elas do tipo CH... $\pi$  e realizadas pelos resíduos serina 353 (SER353), valina 523 (VAL523) e alanina 527 (ALA527). Estes resultados estão apresentados na Tabela 1, em que CtA e CtC se referem as centroides dos anéis A e C respectivamente.

Tipo de interação	Resíduos	Atomo ligante	Atomo resíduo	Distância (Å)	Ângulo (°)
LH	VAL116	F1	HG11	2,60	109
	LEU352	H13	O	1,85	168
	TYR355	H3	OH	2,15	163
		F3	HE2	2,55	119
	LEU359	F3	HD21	2,43	131
	PHE518	O1	HB1	2,64	158
	LEU531	F2	HD11	2,83	156
PI	SER353	CtA	HA	2,52	161
	VAL523	CtA	HG13	2,50	121
	ALA527	CtC	HA	2,73	128
VDW	HIS90	O2	NE2	2,52	-

**Tabela 1.** Interações observadas para celecoxibe no sítio ativo de COX-2.  
Fonte: desenvolvido pelo autor.

A pose obtida para este ligante corresponde com o esperado para celecoxibe, já que quando comparada com a pose cristalográfica deste composto na estrutura 3LN1, observou-se uma excelente sobreposição, como mostrado na Figura 18



**Figura 18.** Sobreposição entre a pose cristalográfica (cinza) e a de docking (verde) para celecoxibe  
Fonte: desenvolvido pelo autor.

#### 4.2.2. Rofecoxibe

Os resultados de docking para o rofecoxibe mostraram o composto inserido entre as hélices  $\alpha$  6 e 17, como esperado para o posicionamento de compostos coxibes. Foram

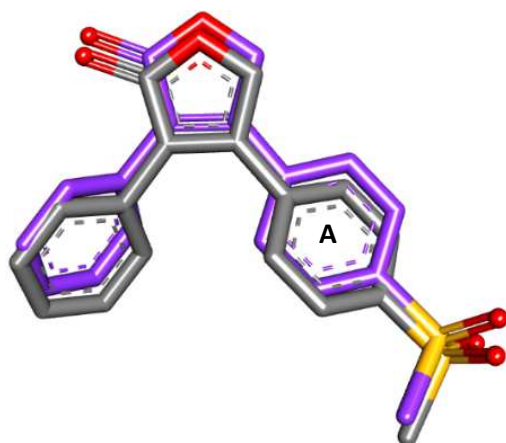
identificadas ligações de hidrogênio com leucina 352 (LEU352), tirosina 355 (TYR355), arginina 513 (ARG513), metionina 522 (MET522), valina 523 (VAL523) e leucina 531 (LEU531) e interações de *van der Waals* com histidina 90 (HIS90) e serina 353 (SER353). Ademais, foram encontradas duas interações com os anéis aromáticos do rofecoxibe, sendo elas do tipo CH... $\pi$  e realizadas pelos resíduos serina 353 (SER353) e valina 523 (VAL523). Estes resultados se encontram na Tabela 2, em que CtA se refere a centroide do anel A.

Tipo de interação	Resíduos	Atomo ligante	Atomo resíduo	Distância (Å)	Ângulo(°)
LH	LEU352	H4354	O	2,56	89
	TYR355	H4348	OH	2,20	149
	ARG513	O21	HH11	2,27	161
	MET522	H4347	O	2,44	161
	VAL523	H4350	O	2,49	114
	LEU531	HG	O6	2,50	133
PI	SER353	CtA	HA	2,46	157
	VAL523	CtA	HG13	2,54	125
VDW	HIS90	O21	NE2	2,95	-
		O20	NE2	2,91	-
	SER353	O20	O	2,48	-

**Tabela 2.** Interações observadas para rofecoxibe no sítio ativo de COX-2.

Fonte: desenvolvido pelo autor.

A pose obtida para este ligante corresponde com o esperado para rofecoxibe, posto que quando comparada com a pose cristalográfica deste composto na estrutura 5KIR, observou-se, mais uma vez, uma excelente sobreposição, como mostrado na Figura 19.

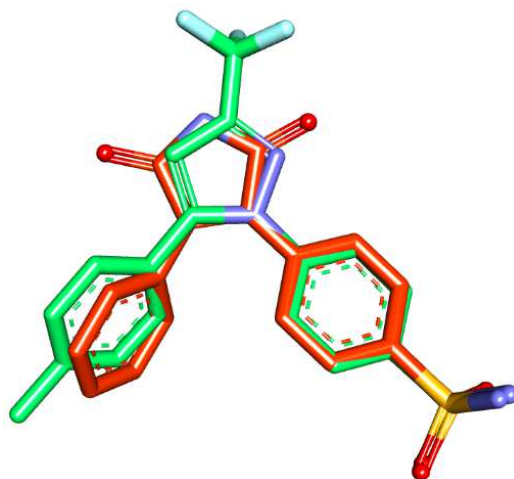


**Figura 19.** Sobreposição entre a pose cristalográfica (cinza) e a de docking (roxo) para rofecoxibe

Fonte: desenvolvido pelo autor.

### 4.2.3. Korean 21

Na Figura 20 é apresentado o resultado de docking do composto *Korean 21*, similar à do celecoxibe, conforme descrito por Wang e colaboradores (2010). As interações observadas para o *Korean 21*, ocorrem com os resíduos encontrados na análise das ligações do celecoxibe, descritas anteriormente, ou seja, posicionado entre as hélices  $\alpha$  6 e 17.



**Figura 20.** Sobreposição dos resultados de *Korean 21* (laranja) e celecoxibe (verde)  
Fonte: desenvolvido pelo autor.

As ligações de hidrogênio do *Korean 21* são com a leucina 352 (LEU352), serina 353 (SER 353), tirosina 355 (TYR355), arginina 513 (ARG513), fenilalanina 518 (PHE518), metionina 522 (MET522), valina 523 (VAL523) e alanina 527 (ALA527). As interações de *van der Waals* são com o ácido glutâmico 192 (GLN192) e tirosina 355 (TYR355). Ainda, foram encontradas duas interações do tipo CH... $\pi$  com os anéis aromáticos e realizadas com os resíduos serina 343 (SER343) e valina 523 (VAL523). As interações estão mostradas na Tabela 3, em que CtA se refere a centroide do anel A.

Tipo de interação	Resíduos	Atomo ligante	Atomo resíduo	Distância (Å)	Ângulo(°)
LH	LEU352	H11	O	2,01	166
	SER353	H12	O	1,94	134
	TYR355	H11	OH	2,21	159
		O2	HE2	2,62	93
	ARG513	O4	HH11	2,38	166
	PHE518	O3	HB1	2,54	159
	MET522	H7	O	2,44	171
	VAL523	H6	O	2,29	124
		O4	HG21	2,60	161
ALA527	O1	HB1	2,60	114	
PI	SER353	CtA	HA	2,49	158
	VAL523	CtA	HG13	2,51	124
VDW	GLN192	N2	OE1	3,22	-
	TYR 355	O2	OH	2,99	-

**Tabela 3.** Interações observadas para *Korean 2l* no sítio ativo de COX-2.

Fonte: desenvolvido pelo autor.

#### 4.2.4. RJA4

Na análise do resultado de docking para RJA4, identificaram-se ligações de hidrogênio com a tirosina 355 (TYR 355), a valina 523 (VAL523) e a leucina 531 (LEU531). Ademais, foram encontradas duas interações com os anéis aromáticos, sendo elas do tipo CH... $\pi$  e realizadas com os resíduos serina 353 (SER353) e valina 523 (VAL523). Não foram encontradas interações de *van der Waals* para este composto. As interações podem ser observadas na Tabela 4, em que CtA e CtB correspondem as centroides dos anéis A e B respectivamente.

Tipo de interação	Resíduos	Atomo ligante	Atomo resíduo	Distância (Å)	Ângulo(°)
LH	TYR355	OH	H30	2,10	133
		OH	H27	2,61	110
	VAL523	O34	HG21	2,62	135
	LEU531	O35	HG	2,55	141
PI	SER353	CtA	HA	2,73	147
	VAL 523	CtA	HG13	2,39	124
	ALA527	CtB	HB1	2,92	108

**Tabela 4.** Interações observadas para RJA4 no sítio ativo de COX-2.

Fonte: desenvolvido pelo autor.

Quando comparado com os demais compostos utilizados no presente estudo, RJA4 apresenta um número menor de ligações de hidrogênio (Tabela 5), no entanto, os resíduos com os quais interage são comuns aos demais ligantes, em particular deve ser destacada a ligação com TYR355.

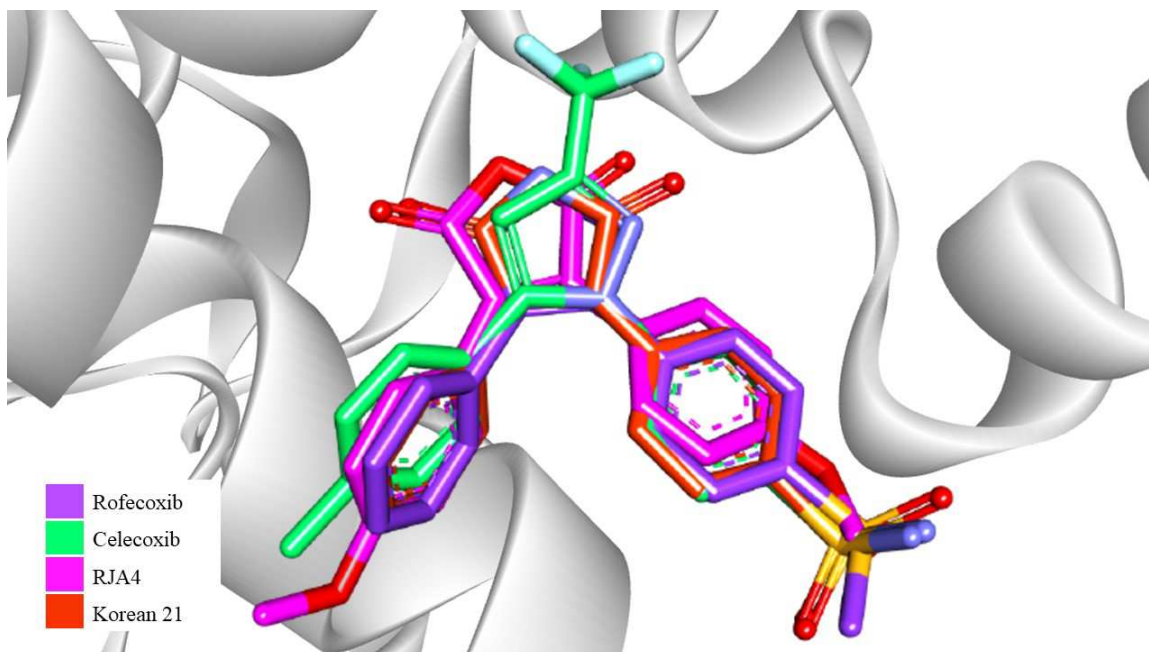
Ligante	Resíduos	Atomo ligante	Atomo resíduo	Distância (Å)	Ângulo (°)
Celecoxib	VAL116	F1	HG11	2,60	109
	LEU352	H13	O	1,85	168
	TYR355	H2	OH	2,15	163
		F2	HE2	2,55	119
	LEU359	F3	HD21	2,43	131
	PHE518	O1	HB1	2,64	158
	LEU531	F2	HD11	2,83	156
Rofecoxib	LEU352	H4354	O	2,56	89
	TYR355	H4348	OH	2,20	149
	ARG513	O21	HH11	2,27	161
	MET522	H4347	O	2,44	161
	VAL523	H4350	O	2,49	114
	LEU531	HG	O6	2,50	133
Korean 21	LEU352	H11	O	2,01	166
	SER353	H12	O	1,94	134
	TYR355	H11	OH	2,21	159
		O2	HE2	2,62	93
	ARG513	O4	HH11	2,38	166
	PHE518	O3	HB1	2,54	159
	MET522	H7	O	2,44	171
	VAL523	H6	O	2,29	124
		O4	HG21	2,60	161
ALA527	O1	HB1	2,60	114	
RJA4	TYR355	H30	OH	2,10	133
		H27	OH	2,61	110
	VAL523	O34	HG21	2,62	135
	LEU531	O35	HG	2,55	141

**Tabela 5.** Ligações de hidrogênio realizadas pelos quatro ligantes estudados e o sítio ativo.

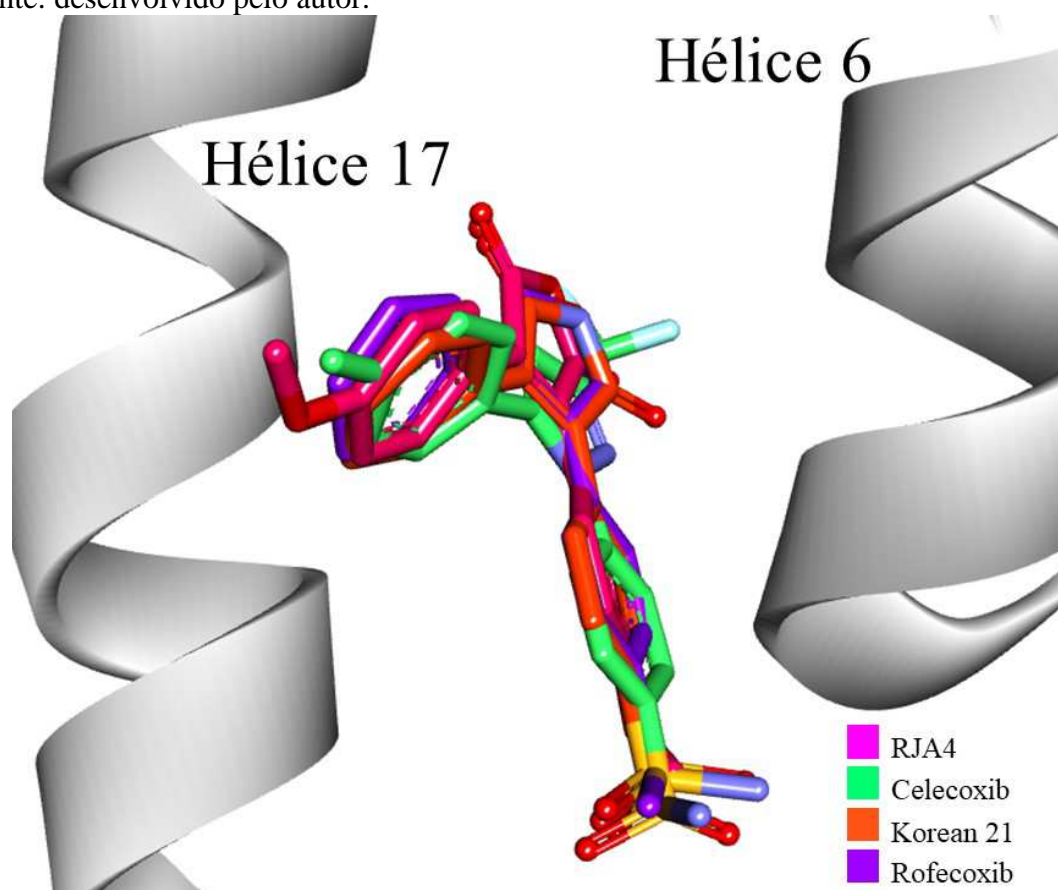
Fonte: desenvolvido pelo autor

Como o princípio para avaliação do potencial inibitório deste composto foi compará-lo com compostos inibidores de COX-2, realizou-se uma sobreposição entre as poses de *docking* obtidas. O resultado é mostrado na Figura 21 e revela que RJA4 se comporta da mesma forma como os demais compostos estudados, posicionando-se entre as hélices  $\alpha$  17 e 6 (Figura 22).





**Figura 21.** Sobreposição das poses de *docking* para os quatro ligantes estudados  
 Fonte: desenvolvido pelo autor.



**Figura 22.** Posicionamento dos ligantes com extremidade voltada para TYR385  
 Fonte: desenvolvido pelo autor.

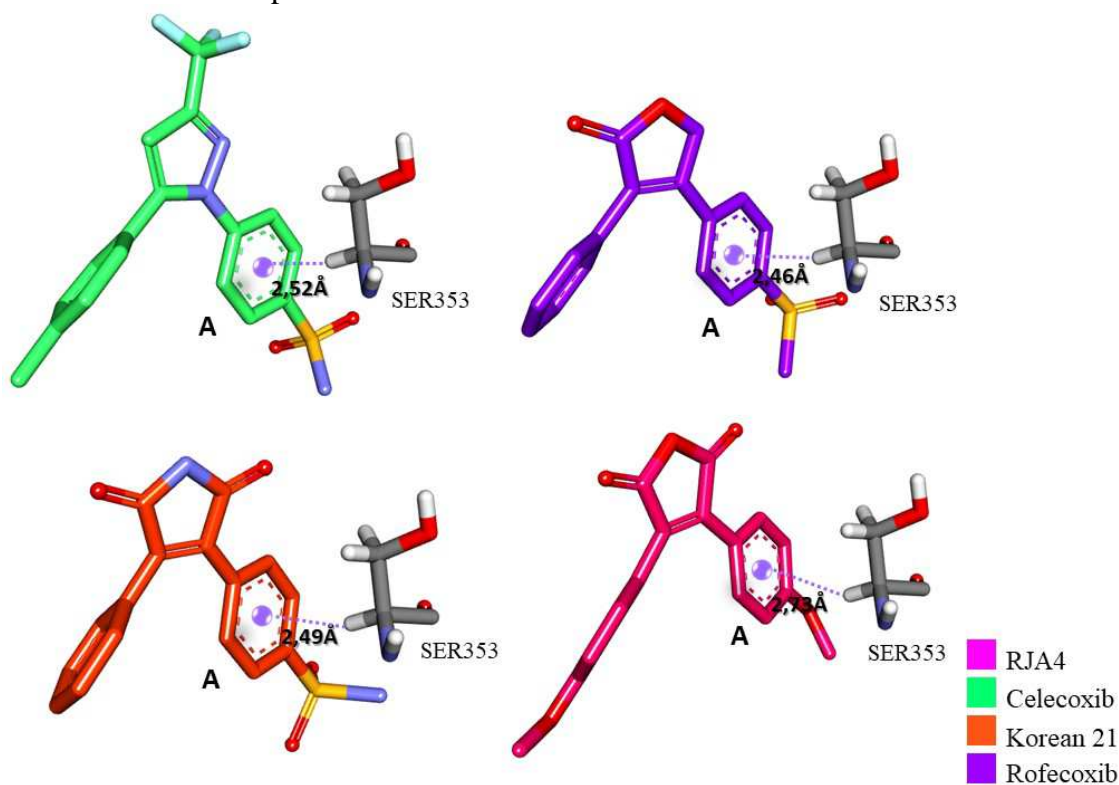
Ainda, uma análise das interações  $\pi$  feitas pelos compostos estudados mostra que o RJA4 faz as duas interações  $\pi$  envolvendo a SER353 (Figura 23) e a VAL523

(Figura 24) que como demais inibidores de COX-2 aqui estudados, como mostrado na Tabela 6. Destaca-se que um fator importante capaz de garantir especificidade com o sítio ativo de COX-2 é a interação com VAL523, resíduo este que na COX-1 é uma isoleucina, sendo assim, no caso do RJA4, as interações com VAL523 em comum com outros fármacos sabidamente capazes de se ligarem especificamente a COX-2 indicariam também uma possível especificidade do composto para COX-2.

Ligante	Resíduos	Atomo ligante	Atomo resíduo	Distância (Å)	Ângulo (°)
Celecoxib	SER353	CtA	HA	2,52	161
	VAL523	CtA	HG13	2,45	121
	ALA527	CtB	HA	2,73	128
Rofecoxib	SER353	CtA	HA	2,46	157
	VAL523	CtA	HG13	2,54	125
Korean 21	SER353	CtA	HA	2,45	158
	VAL523	CtA	HG13	2,51	124
RJA4	SER353	CtA	HA	2,73	147
	VAL523	CtA	HG13	2,39	124
	ALA527	CtB	HB1	2,92	108

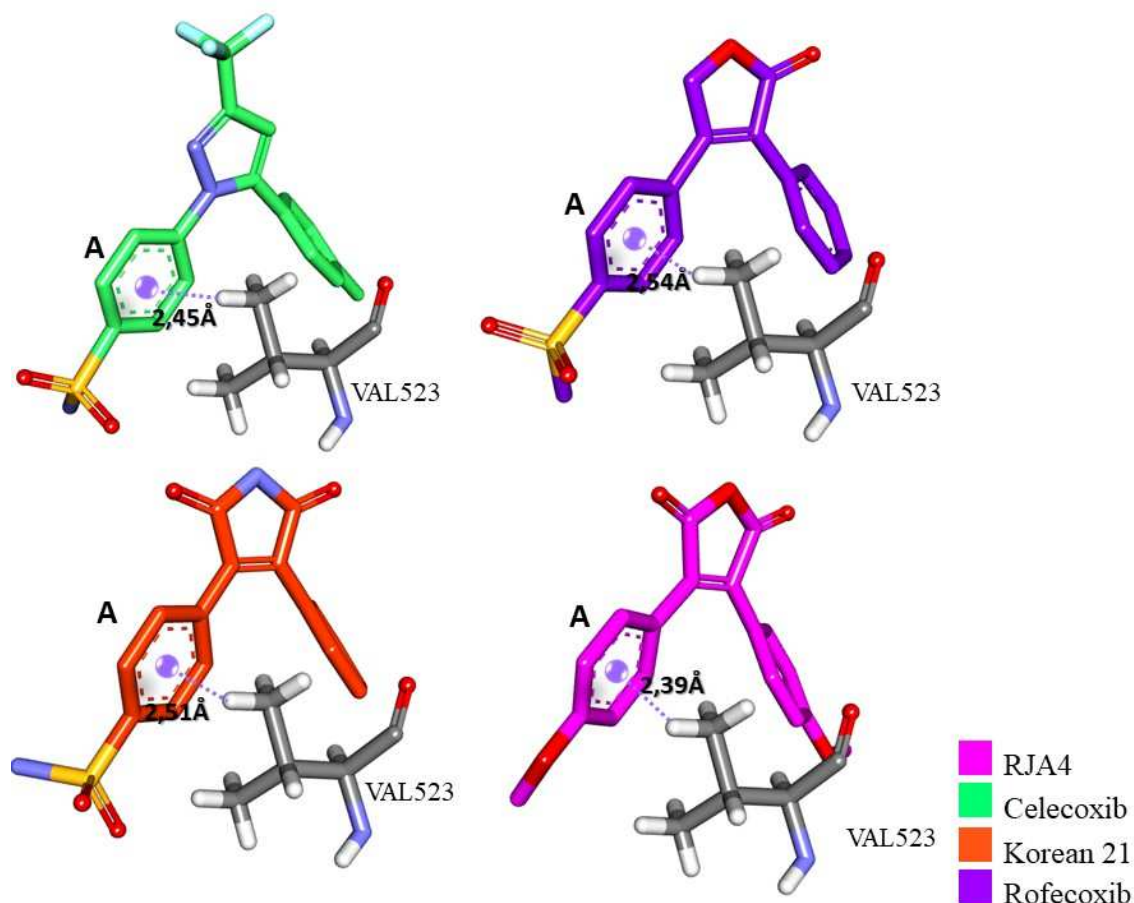
**Tabela 6.** Interações  $\pi$  para os quatro ligantes estudados.

Fonte: desenvolvido pelo autor.



**Figura 23.** Interações  $\pi$  com SER353

Fonte: desenvolvido pelo autor.



**Figura 24.** Interações  $\pi$  com VAL523  
 Fonte: desenvolvido pelo autor.

Como já mencionado a interação  $\pi$  com a VAL523 foi estudada utilizando o sistema NCIPlot para todos os quatro ligantes estudados neste trabalho. Os parâmetros geométricos estão dados na Tabela 7.

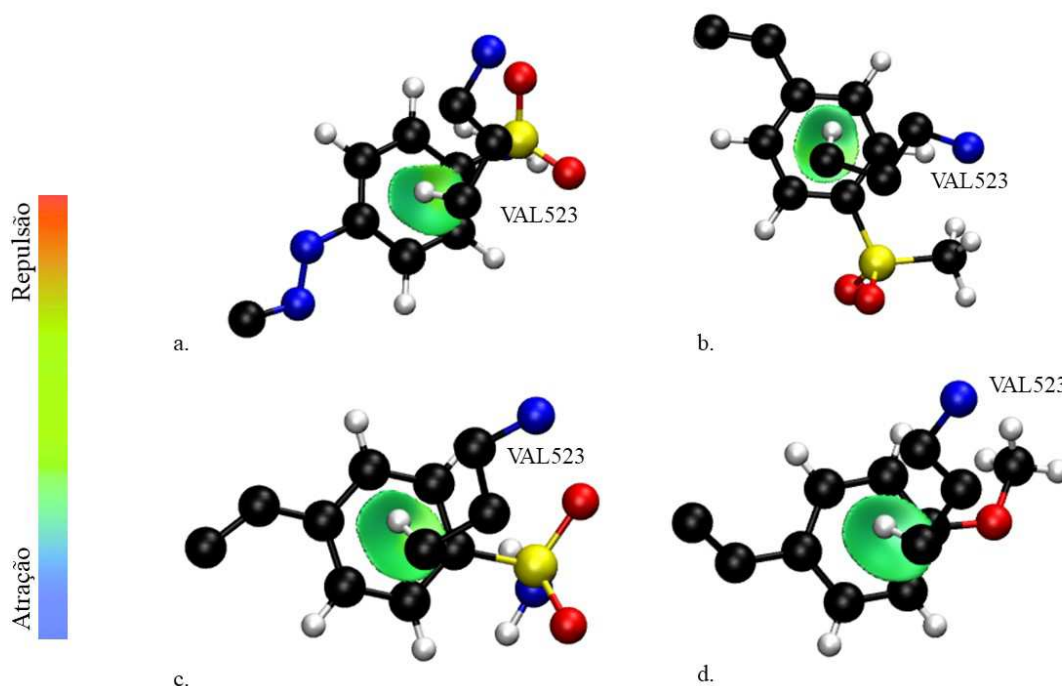
Ligante	Atomo ligante	Atomo resíduo	Distância (Å)	Ângulo (°)
Celecoxib	CtA	HG13	2,49	121
Rofecoxib	CtA	HG13	2,54	125
Korean 21	CtA	HG13	2,51	124
RJA4	CtA	HG13	2,39	124

**Tabela 7.** Parâmetros para a ligação CH... $\pi$  com VAL523 para todos os coxibes, Korean 21 e RJA4

Fonte: desenvolvido pelo autor

Os resultados do NCIPlot (Figura 25) indicam que as interações observadas entre os coxibes, Korean 21 e RJA4 e VAL523 são atrativas, confirmando o que foi observado durante a análise em tela gráfica com relação à interação C-H... $\pi$  com a

VAL523, o que indicaria uma possível especificidade do ligante RJ4 para o sítio de COX-2.



**Figura 25.** Resultados de NCIPlot para a. celecoxibe; b. rofecoxibe; c. Korean 21; d. RJ4  
Fonte: desenvolvido pelo autor.

## 5 CONCLUSÕES

Os estudos aqui descritos mostraram o docking do RJ4 no sítio da ciclooxigenase 2 da mesma forma como ocorre com os inibidores celecoxibe, rofecoxibe e *Korean 21*, ou seja, entre as hélices  $\alpha$  6 e 17, além da interação CH... $\pi$  com SER353 e VAL 523, resíduo este específico do sítio ativo da ciclooxigenase 2 e responsável pela formação de um bolsão na cavidade de ligação para compostos do tipo coxibe e que não é encontrado em COX-1.

Assim, em vista da necessidade de desenvolvimento de novos fármacos capazes de inibirem especificamente a enzima COX-2, os estudos *in silico* descritos no presente trabalho permitem propor o composto RJ4 como candidato para estudos posteriores. Como perspectiva futura do presente estudo, pode-se citar a realização de estudos de dinâmica molecular a fim de se estudar a estabilidade do complexo RJ4-proteína e a realização de estudos *in vitro* da seletividade do RJ4 pela COX-2 com relação à COX-1, da sua atividade inibitória e dependendo dos resultados ensaios *in vivo*.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Anderson, A. C. (2003). The process of structure-based drug design. *Chemistry & biology*, 10(9), 787-797.
- Asano, K. O. I. C. H. I. R. O., Lilly, C. M., & Drazen, J. M. (1996). Prostaglandin G/H synthase-2 is the constitutive and dominant isoform in cultured human lung epithelial cells. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, 271(1), L126-L131.
- Benjamin, J., Malskowski, O., Malkowski, M. G. (2016). Crystal structure of rofecoxib bound to human cyclooxygenase-2. *Acta cryst. Structural biology communications*. F72, 772-776.
- Beura, S., & Chetti, P. (2020). Identification of potential human COX-2 inhibitors using computational modeling and molecular dynamics simulations. *Journal of Molecular Structure*, 128271.
- Bohacek, R. S., McMartin, C., & Guida, W. C. (1996). The art and practice of structure-based drug design: a molecular modeling perspective. *Medicinal research reviews*, 16(1), 3-50.
- Caracelli, I., Maganhi, S. H., de Oliveira Cardoso, J., Cunha, R. L., Vega-Tejido, M. A., Zukerman-Schpector, J., & Tiekink, E. R. (2018). Crystallographic and docking (Cathepsins B, K, L and S) studies on bioactive halotelluroxetanes. *Zeitschrift für Kristallographie-Crystalline Materials*, 233(2), 113-124.
- Caracelli, I., Zukerman-Schpector, J. (2018). Introdução à Biofísica Estrutural. EdUFSCar, ISBN: 978-85-7600-065-5.
- Caracelli, I., Haiduc, I., Zukerman-Schpector, J., Tiekink, E.R.T. (2013). Delocalised antimony(lone pair)- and bismuth-(lone pair)... $\pi$ (arene) interactions: Supramolecular assembly and other considerations. *Coordination Chemistry Reviews* 257, 2863– 2879.
- Caracelli, I., Zukerman-Schpector, J., Tiekink, E.R.T. (2012). Supramolecular aggregation patterns based on the bio-inspired Se(lone pair)... $\pi$ (aryl) synthon. *Coordination Chemistry Reviews* 256, 412– 438..
- Caracelli, I., Zukerman-Schpector, J., Tiekink, E.R.T. (2013). Supra-molecular synthons based on gold... $\pi$ (arene) interactions. *Gold Bulletin*, 46, 81-89.
- Cashman, J.N. (1996) The mechanisms of action of NSAIDs in analgesia. *Drugs*. Nov 1;52(5):13-23.
- Castellsague J., Riera-Guardia N., Calingaert B., Varas-Lorenzo C., Fourrier-Reglat A., Nicotra F., Sturkenboom M., Perez-Gutthann S. (2012) Safety of Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs (SOS) Project. Individual NSAIDs and upper gastrointestinal complications. *Drug safety*. Dec 1;35(12):1127-46.
- Chandrasekharan, N. V., Dai, H., Roos, K. L. T., Evanson, N. K., Tomsik, J., Elton, T. S., & Simmons, D. L. (2002). COX-3, a cyclooxygenase-1 variant inhibited by

- acetaminophen and other analgesic/antipyretic drugs: cloning, structure, and expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(21), 13926-13931.
- Clark, M., Cramer III, R.D., Van Opdenbosch, N.(1989) *J. Comput. Chem*, 10, 982-1012.
- Contreras-García, J., Johnson, E. R., Keinan, S., Chaudret, R., Piquemal, J. P., Beratan, D. N., Yang, W. (2011). NCIPLOT: a program for plotting noncovalent interaction regions. *Journal of chemical theory and computation*, 7(3), 625-632.
- Crofford, L. J. (2013). Use of NSAIDs in treating patients with arthritis. *Arthritis research & therapy*. Jul 1;15(S3):S2.
- Crofford, L. J. (1997). COX-1 and COX-2 tissue expression: implications and predictions. *The Journal of Rheumatology. Supplement*, 49, 15.
- Cunha, R. L., Zukerman-Schpector, J., Caracelli, I., Comasseto, J. V. (2006). Revisiting the addition reaction of TeCl<sub>4</sub> to alkynes: The crystal structure and docking studies of 1-chloro-2-trichlorotelluro-3-phenyl-propen-2-ol. *Journal of organometallic chemistry*, 691(23), 4807-4815.
- Davis, A., Robson, J. (2016). The dangers of NSAIDs: look both ways.
- Di Fiore, A., Pedone, C., D'Ambrosio, K., Scozzafava, A., De Simone, G., Supuran, C. T. (2006). Carbonic anhydrase inhibitors: valdecoxibe binds to a different active site region of the human isoform II as compared to the structurally related cyclooxygenase II 'selective' inhibitor celecoxibe. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, 16(2), 437-442.
- Din, F.V., Theodoratou, E., Farrington, S.M., Tenesa, A., Barnetson, R.A., Cetnarskyj, R., Stark, L., Porteous, M.E., Campbell, H., Dunlop, M.G. (2010). Effect of aspirin and NSAIDs on risk and survival from colorectal cancer. *Gut*. Dec 1;59(12):1670-9.
- DISCOVERY STUDIO 3.5 - Accelrys Software Inc., Discovery Studio Modeling Environment, Release 3.5, San Diego: Accelrys Software Inc., 2012.  
<http://accelrys.com/products/discovery-studio>.
- Dong, L., Zou, H., Yuan, C., Hong, Y. H., Uhlson, C. L., Murphy, R. C., Smith, W. L. (2016). Interactions of 2-O-arachidonylglycerol ether and ibuprofen with the allosteric and catalytic subunits of human COX-2. *Journal of lipid research*, 57(6), 1043-1050.
- Ermondi, G., Caron, G. (2006). Recognition forces in ligand-protein complexes: Blending information from different sources. *biochemical pharmacology*, 72(12), 1633-1645.
- Flower, R. J. (2003). The development of COX2 inhibitors. *Nature Reviews Drug Discovery*, 2(3), 179-191.
- Garcia, A. L. L. (2008). PhD thesis, Universidade Estadual de Campinas, UNICAMP, Campinas, SP, Brazil.
- Gardiner, E. J., Willett, P., Artymiuk, P. J. (2001). Protein docking using a genetic algorithm. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 44(1), 44-56.

- Gilli, P., Gilli, G. (2010). Hydrogen bond models and theories: The dual hydrogen bond model and its consequences. *Journal of Molecular Structure*, 972, 2-10.
- Green, G.A. (2001) Understanding NSAIDs: from aspirin to COX-2. *Clinical cornerstone*. Jan 1;3(5):50-9.
- Gurpinar, E., Grizzle, W.E., Piazza, G.A. (2014). NSAIDs inhibit tumorigenesis, but how?. *Clinical cancer research*. Mar 1;20(5):1104-13.
- Harris, R. C., Breyer, M. D. (2001). Physiological regulation of cyclooxygenase-2 in the kidney. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*, 281(1), F1-F11.
- Harris, R. C., Breyer, M. D. (2006). Update on cyclooxygenase-2 inhibitors. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*, 1(2), 236-245.
- Hassan, G. S., Rahman, D. E. A., Abdelmajeed, E. A., Refaey, R. H., Salem, M. A., Nissan, Y. M. (2019). New pyrazole derivatives: Synthesis, anti-inflammatory activity, cyclooxygenase inhibition assay and evaluation of mPGES. *European journal of medicinal chemistry*, 171, 332-342.
- Hawkey, C. J. (2001). COX-1 and COX-2 inhibitors. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*, 15(5), 801-820.
- Johnson, E. R., Keinan, S., Mori-Sánchez, P., Contreras-García, J., Cohen, A. J., Yang, W. (2010). Revealing noncovalent interactions. *Journal of the American Chemical Society*, 132(18), 6498-6506.
- Jones, G., Willett, P., Glen, R. C. (1995). Molecular recognition of receptor sites using a genetic algorithm with a description of desolvation. *Journal of molecular biology*, 245(1), 43-53.
- Krumrine, J., Raubacher, F., Brooijmans, N., Kuntz, I. (2003). Principles and methods of docking and ligand design. *Methods of Biochemical Analysis*, 44, 443-476.
- Kuehl, F. A., Egan, R. W. (1980). Prostaglandins, arachidonic acid, and inflammation. *Science*, 210(4473), 978-984.
- Laporte, J.R., Ibanez, L., Vidal, X., Vendrell, L., Leone, R. (2004). Upper gastrointestinal bleeding associated with the use of NSAIDs. *Drug safety*. May 1;27(6):411-20.
- Lawrence, T., Willoughby, D. A., Gilroy, D. W. (2002). Anti-inflammatory lipid mediators and insights into the resolution of inflammation. *Nature Reviews Immunology*, 2(10), 787-795.
- Liu, X., Moon, S. H., Jenkins, C. M., Sims, H. F., Gross, R. W. (2016) Cyclooxygenase-2 Mediated Oxidation of 2-Arachidonoyl-Lysophospholipids Identifies Unknown Lipid Signaling Pathways. *Cell Chem. Biol.* 23, 1217–1227.
- Lucido, M. J., Orlando, B. J., Vecchio, A. J., Malkowski, M. G. (2016). Crystal structure of aspirin-acetylated human cyclooxygenase-2: insight into the formation of products with reversed stereochemistry. *Biochemistry*, 55(8), 1226-1238.

- Luong, C., Miller, A., Barnett, J., Chow, J., Ramesha, C., Browner, M. F. (1996). Flexibility of the NSAID binding site in the structure of human cyclooxygenase-2. *Nature structural biology*, 3(11), 927-933.
- Magalhães, C. S. D., Barbosa, H. J., Dardenne, L. E. (2004). A genetic algorithm for the ligand-protein docking problem. *Genetics and Molecular Biology*, 27(4), 605-610.
- Mahadevi, A. S., Sastry, G. N. (2013). Cation– $\pi$  interaction: Its role and relevance in chemistry, biology, and material science. *Chemical reviews*, 113(3), 2100-2138.
- Mak, K., Pichika, M. (2019) Artificial intelligence in drug development: present status and future prospects. *Drug Discovery Today*, 24(3), 773-780.
- Malkowski, M. G., Ginell, S. L., Smith, W. L., Garavito, R. M. (2000). The productive conformation of arachidonic acid bound to prostaglandin synthase. *Science*, 289(5486), 1933-1937.
- McGeer, P.L., McGeer, E.G. (2007). NSAIDs and Alzheimer disease: epidemiological, animal model and clinical studies. *Neurobiology of aging*. May 1;28(5):639-47.
- Mecozzi, S., West, A. P., Dougherty, D. A. (1996). Cation-pi interactions in aromatics of biological and medicinal interest: electrostatic potential surfaces as a useful qualitative guide. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93(20), 10566-10571.
- Meyer, E. A., Castellano, R. K., Diederich, F. (2003). Interactions with aromatic rings in chemical and biological recognition. *Angewandte Chemie International Edition*, 42(11), 1210-1250.
- Mitchener, M. M., Hermanson, D. J., Shockley, E. M., Brown, H. A., Lindsley, C. W., Reese, J., Rouzer, C. A., Lopez, C. F., Marnett, L. J. (2015). Competition and Allostery Govern Substrate Selectivity of Cyclooxygenase-2. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 112, 12366– 12371.
- Moore, N., Pollack, C., Butkerait, P. (2015). Adverse drug reactions and drug–drug interactions with over-the-counter NSAIDs. *Therapeutics and clinical risk management*, 11, 1061.
- Morita, I. (2002). Distinct functions of COX-1 and COX-2. *Prostaglandins & other lipid mediators*, 68, 165-175.
- Naithani, S., Saracco, S. A., Butler, C. A., Fox, T. D. (2003). Interactions among COX1, COX2, and COX3 mRNA-specific translational activator proteins on the inner surface of the mitochondrial inner membrane of *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular biology of the cell*, 14(1), 324-333.
- Ochroch E.A., Mardini I.A., Gottschalk A. (2003). What is the role of NSAIDs in preemptive analgesia?. *Drugs*. Dec 1;63(24):2709-23.
- Orlando, B. J., Malkowski, M. G. (2016). Crystal structure of rofecoxibe bound to human cyclooxygenase-2. *Acta Crystallographica Section F: Structural Biology Communications*, 72(10), 772-776.



- Orlando, B. J., Malkowski, M. G. (2016). Substrate-selective inhibition of cyclooxygenase-2 by fenamic acid derivatives is dependent on peroxide tone. *Journal of Biological Chemistry*, 291(29), 15069-15081.
- Orlando, B. J., Lucido, M. J., Malkowski, M. G. (2015). The structure of ibuprofen bound to cyclooxygenase-2. *Journal of structural biology*, 189(1), 62-66.
- Oshiro, C. M., Kuntz, I. D., Dixon, J. S. (1995). Flexible ligand docking using a genetic algorithm. *Journal of computer-aided molecular design*, 9(2), 113-130.
- Pagadala, N. S., Syed, K., Tuszynski, J. (2017). Software for molecular docking: a review. *Biophysical reviews*, 9(2), 91-102.
- Pairet, M., Engelhardt, G. (1996). Distinct isoforms (COX-1 and COX-2) of cyclooxygenase: possible physiological and therapeutic implications. *Fundamental & clinical pharmacology*, 10(1), 1-15.
- Pannunzio, A., Coluccia, M. (2018). Cyclooxygenase-1 (COX-1) and COX-1 inhibitors in cancer: a review of oncology and medicinal chemistry literature. *Pharmaceuticals*, 11(4), 101.
- Patrono, C. (2016). Cardiovascular effects of cyclooxygenase-2 inhibitors: a mechanistic and clinical perspective. *British journal of clinical pharmacology*, 82(4), 957-964.
- Pham, V. C., Shin, J. S., Choi, M. J., Kim, T. W., Lee, K. J., Kim, K. J., Lee, J. Y. (2012). Biological evaluation and molecular docking study of 3-(4-sulfamoylphenyl)-4-phenyl-1H-pyrrole-2, 5-dione as COX-2 inhibitor. *Bulletin of the Korean Chemical Society*, 33(2), 721-724.
- Picot, D., Loll, P. J., Garavito, R. M. (1994). The X-ray crystal structure of the membrane protein prostaglandin H2 synthase-1. *Nature*, 367(6460), 243-249.
- Rankin, J. A. (2004). Biological mediators of acute inflammation. *AACN Advanced Critical Care*, 15(1), 3-17.
- Roth, C. M., Lenhoff, A. M. (1993). Electrostatic and *van der Waals* contributions to protein adsorption: computation of equilibrium constants. *Langmuir*, 9(4), 962-972.
- Roth, C. M., Lenhoff, A. M. (1995). Electrostatic and *van der Waals* contributions to protein adsorption: comparison of theory and experiment. *Langmuir*, 11(9), 3500-3509.
- Roth, C. M., Neal, B. L., Lenhoff, A. M. (1996). *Van der Waals* interactions involving proteins. *Biophysical journal*, 70(2), 977-987.
- Rouzer, C. A., Marnett, L. J. (2020). Structural and Chemical Biology of the Interaction of Cyclooxygenase with Substrates and Non-steroidal anti-inflammatory drugs. *Chemical Reviews*, 120(15), 7592-7641.
- Seibert, K., Masferrer, J. L. (1994). Role of inducible cyclooxygenase (COX-2) in inflammation. *Receptor*, 4(1), 17.
- Serhan, C. N., Savill, J. (2005). Resolution of inflammation: the beginning programs the end. *Nature immunology*, 6(12), 1191-1197.

- Sharma, J. N., Jawad, N. M. (2005). Adverse effects of COX-2 inhibitors. *TheScientificWorldJOURNAL*, 5.
- Silva, R. F., Sacco, A. C. S., Caracelli, I., Zukerman-Schpector, J., Tiekink, E. R. (2018). Sulphur (lone pair)...  $\pi$  interactions with FAD in flavoenzymes. *Zeitschrift fur Kristallographie*, 233(8), 531-537.
- Smith, A. J., Zhang, X., Leach, A. G., Houk, K. N. (2009). Beyond picomolar affinities: quantitative aspects of noncovalent and covalent binding of drugs to proteins. *Journal of medicinal chemistry*, 52(2), 225-233.
- Smith, W. L., DeWitt, D. L., Garavito, R. M. (2000). Cyclooxygenases: structural, cellular, and molecular biology. *Annual review of biochemistry*, 69(1), 145-182.
- Tanabe, T., & Tohnai, N. (2002). Cyclooxygenase isozymes and their gene structures and expression. *Prostaglandins & other lipid mediators*, 68, 95-114.
- Van Hecken, A., Schwartz, J. I., Depré, M., De Lepeleire, I., Dallob, A., Tanaka, W., Ebel, D. L. (2000). Comparative inhibitory activity of rofecoxibe, meloxicam, diclofenac, ibuprofen, and naproxen on COX $\square$ 2 versus COX $\square$ 1 in healthy volunteers. *The Journal of Clinical Pharmacology*, 40(10), 1109-1120.
- Vane, J. R., Bakhle, Y. S., Botting, R. M. (1998). CYCLOOXYGENASES 1 AND 2. *Annual review of pharmacology and toxicology*, 38(1), 97-120.
- Veja-Tejido, M., Caracelli, I., Zukerman-Schpector, J. (2006). Conformational analyses and docking studies of a series of 5-nitrofuranyl- and 5-nitrothiophenyl-semicarbazone derivatives in three possible binding sites of trypanothione and glutathione reductases. *Journal of Molecular Graphics and Modelling*, 24(5), 349-355.
- Wallace, J.L. (2000). How do NSAIDs cause ulcer disease?. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*. Feb 1;14(1):147-59.
- Wang, J. L., Limburg, D., Graneto, M. J., Springer, J., Hamper, J. R. B., Liao, S., Kiefer, J. R. (2010). The novel benzopyran class of selective cyclooxygenase-2 inhibitors. Part 2: the second clinical candidate having a shorter and favorable human half-life. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, 20(23), 7159-7163.
- Wang, W., Donini, O., Reyes, C. M., Kollman, P. A. (2001). Biomolecular simulations: recent developments in force fields, simulations of enzyme catalysis, protein-ligand, protein-protein, and protein-nucleic acid noncovalent interactions. *Annual review of biophysics and biomolecular structure*, 30(1), 211-243.
- Waters, M. L. (2002). Aromatic interactions in model systems. *Current opinion in chemical biology*, 6(6), 736-741.
- Weber, A., Casini, A., Heine, A., Kuhn, D., Supuran, C. T., Scozzafava, A., Klebe, G. (2004). Unexpected nanomolar inhibition of carbonic anhydrase by COX-2-selective celecoxibe: new pharmacological opportunities due to related binding site recognition. *Journal of medicinal chemistry*, 47(3), 550-557.
- Wheeler, S.E., Houk, K.N. (2009) Origin of substituent effects in edge-to-face aryl-aryl interactions. *Molecular Physics*, 107(8-12), 749-760.

Willoughby, D. A., Moore, A. R., Colville-Nash, P. R. (2000). COX-1, COX-2, and COX-3 and the future treatment of chronic inflammatory disease. *The Lancet*, 355(9204), 646-648.

WIM: Weak Interaction Mapping. A. C. S. Sacco, I. Caracelli, J. Zukerman-Schpector, L. M. De Souza. Software em processo de registro: Processo PC 2017/004 – Agencia de Inovação - UFSCar.

Zhou, P., Huang, J., Tian, F. (2012). Specific noncovalent interactions at protein-ligand interface: implications for rational drug design. *Current medicinal chemistry*, 19(2), 226-238.

Zidar, N., Odar, K., Glavac, D., Jerse, M., Zupanc, T., Stajer, D. (2009). Cyclooxygenase in normal human tissues—is COX $\square$ 1 really a constitutive isoform, and COX $\square$ 2 an inducible isoform?. *Journal of cellular and molecular medicine*, 13(9b), 3753-3763.