



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

**DOCKING MOLECULAR APLICADO AO ESTUDO DA FORMAÇÃO
DE COMPLEXOS ENTRE ANÁLOGOS DE RESVERATROL E
DERIVADOS DE 1,2,3-TRIAZOL E A ENZIMA COX-2**

LUIS NELSON PRADO CASTILHO

São Carlos
2011



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

LUIS NELSON PRADO CASTILHO

**DOCKING MOLECULAR APLICADO AO ESTUDO DA FORMAÇÃO
DE COMPLEXOS ENTRE ANÁLOGOS DE RESVERATROL E
DERIVADOS DE 1,2,3-TRIAZOL E A ENZIMA COX-2**

Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal de São Carlos como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Orientadores: Profa. Dra. Ignez Caracelli
Prof. Dr. Julio Zukerman-Schpector

São Carlos
2011

**Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da
Biblioteca Comunitária da UFSCar**

C352dm

Castilho, Luis Nelson Prado.

Docking molecular aplicado ao estudo da formação de complexos entre análogos de resveratrol e derivados de 1,2,3-triazol e a enzima COX-2 / Luis Nelson Prado Castilho. -- São Carlos : UFSCar, 2012.
143 f.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2011.

1. Biotecnologia. 2. Docking. 3. Ciclooxigenase (COX-2). 4. Drogas antiinflamatórias não esteróides (AINEs). 5. Resveratrol. 6. Triazol. I. Título.


CDD: 660.6 (20^a)

Luis Nelson Prado Castilho


Dissertação de Mestrado submetida
à Coordenação do Programa de
Pós-Graduação em Biotecnologia,
da Universidade Federal de São
Carlos, como requisito parcial para
a obtenção do título de Mestre em
Biotecnologia

Aprovado em: 14/12/2011

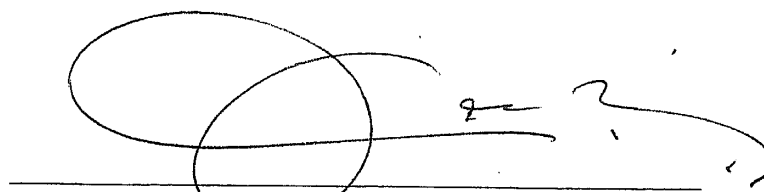
BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. Julio Zukerman Schpector
(Orientador-UFSCar)



Prof. Dr. Fernando M. Araújo Moreira
(DF-UFSCar)



Prof. Dr. Carlos Alberto de Simone
(IQB-UFAL)

A Deus.

À minha mãe e meu pai.

À minha esposa Ana Paula.

E ao meu filho Luis Eduardo.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por tudo.

Aos meus pais, Luiz Agostinho e Umari, pela oportunidade da vida, pelo amor, pelo exemplo, pela dedicação.

À minha esposa, Ana Paula, e meu filho, Luis Eduardo, pela paciência, compreensão, companheirismo e, principalmente, pela oportunidade de tê-los em minha vida.

À Profa. Dra. Ignez Caracelli e ao Prof. Dr. Julio Zukerman Schpector, pela orientação e amizade.

Ao Prof. Dr. Fernando Manuel Araújo Moreira.

A todos os professores do PPG-Biotecnologia.

Às secretárias do PPG-Biotecnologia.

Aos companheiros do BioMat e do LaCrEMM.

E, a todos aqueles que, de alguma forma, colaboraram para que eu chegasse até este momento.

Meus sinceros agradecimentos.

Castilho, Luis Nelson Prado. **DOCKING MOLECULAR APLICADO AO ESTUDO DA FORMAÇÃO DE COMPLEXOS ENTRE ANÁLOGOS DE RESVERATROL E DERIVADOS DE 1,2,3-TRIAZOL E A ENZIMA COX-2**. 2011. Dissertação (Programa de Pós-graduação em Biotecnologia) - UFSCar, São Carlos, 2011.

RESUMO

Prostaglandinas H sintases (PGHS), ou ciclooxigenases (COX), existem em pelo menos duas isoformas, COX-1 e COX-2, codificadas por genes diferentes. A COX desempenha um papel central no processo inflamatório através da conversão do ácido araquidônico, liberado a partir dos fosfolipídios da membrana, em prostanóides bioativos. Anti-inflamatórios não esteroides (AINEs) representam uma importante categoria terapêutica relacionada à redução de inflamação, dor, e febre, no entanto, podem causar insuficiência renal e gástrica. A inibição seletiva da COX-2 pelos AINEs conhecidos como coxibs leva a uma redução significativa desses efeitos colaterais, além de reduzir eventos trombóticos fatais e agir no controle de alguns tipos de câncer e na progressão do mal de Alzheimer, quando utilizados de forma prolongada. Este estudo, baseado em docking molecular, descreve a busca das poses mais favoráveis para a formação dos complexos entre a COX-2 e ligantes análogos do resveratrol e derivados de 1,2,3-triazol. A estrutura tridimensional da enzima 1cx2 foi obtida do Protein Data Bank (PDB). As estruturas dos ligantes foram obtidas por modelagem molecular. Os cálculos de docking foram realizados utilizando o programa GOLD 4.1.2. As análises dos resultados de docking mostram que as interações com os resíduos do bolso lateral presente na COX são importantes para a estabilização dos complexos, especialmente, His90, Arg120, Ser353, Tyr355 e Arg513. Os ligantes estudados se localizam, preferencialmente, entre as α -hélices 13 e 26 da isoenzima, sendo que a interação com o resíduo serina 353 demonstra estar relacionada com a atividade apresentada por ligantes com baixos valores de IC_{50} , característica que pode ser explorada racionalmente no desenho de novas moléculas líderes ou na otimização de ligantes seletivos que ocupem o bolso lateral do sítio ativo ciclooxigenase da COX-2.

Palavras-chave: PGHS. COX. Docking. AINE. Resveratrol. 1,2,3-triazol.

Castilho, Luis Nelson Prado. **MOLECULAR DOCKING APPLIED TO THE STUDY OF COMPLEXES FORMATION BETWEEN RESVERATROL ANALOGUES AND 1,2,3-TRIAZOLE DERIVATIVES AND THE COX-2 ENZYME**. 2011. Dissertação (Programa de Pós-graduação em Biotecnologia) - UFSCar, São Carlos, 2011.

ABSTRACT

Prostaglandin H synthases (PGHS), or cyclooxygenases (COX), are known to exist in at least two isoforms, COX-1 and COX-2, encoded by different genes. COX's play a central role in the inflammatory cascade by converting arachidonic acid, released from membrane phospholipids, into bioactive prostanoids. Non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) represent an important therapeutic category related to the reduction of inflammation, pain and fever, however, can cause gastric and kidney failure. Selective inhibition of COX-2 by NSAIDs known as coxibs leads to a significant reduction of these side effects in addition reduce fatal thrombotic events and act in controlling some types of cancer and progression of Alzheimer's disease, when used for a long period. This study, based on molecular docking, describes the search for the most favorable poses in the formation of complexes between COX-2 and resveratrol analogues and 1,2,3-triazole derivatives. The three dimensional structure of the enzyme, 1cx2, was obtained from the Protein Data Bank (PDB). The structures of the ligands were obtained by molecular modeling. The docking calculations were carried out with the program GOLD 4.1.2. Analyses of the docking results show that interactions with residues of the side pocket of COX are important for the stabilization of the complexes, in particular His90, Arg120, Ser353, Tyr355 and Arg513 should be mentioned. The ligands studied locate, preferably, between α -helices 13 and 26 of the isoenzyme, and the interaction with the serine 353 residue seems to be related to the activity presented by ligands with low IC₅₀ values, a characteristics that can be exploited in rational design of new leader molecules or in the optimization of selective ligands that should occupy the side pocket of the cyclooxygenase active site of COX-2.

Keywords: PGHS. COX. Docking. NSAID. Resveratrol. 1,2,3-triazole.

LISTA DE FIGURAS

1 INTRODUÇÃO

Figura 1.1	(A) As duas reações realizadas pelas ciclooxigenases: a conversão do ácido araquidônico em prostaglandina G ₂ pela ação do sítio ciclooxigenase e a conversão da prostaglandina G ₂ a prostaglandina H ₂ pela ação do sítio peroxidase. (B) As sintases específicas que estão envolvidas na conversão da prostaglandina H ₂ para as cinco principais prostaglandinas.....	22
Figura 1.2	Vista superior da sobreposição das cadeias de carbonos alfa das estruturas oCOX-1 (pdb:3n8z em azul) e mCOX-2 (pdb:3ln1 em amarelo), (A) em <i>stick</i> , (B) em <i>solid ribbon</i> . Embaixo, a sequência alinhada dos resíduos das duas estruturas.....	23
Figura 1.3	Estrutura do dímero da mCOX-2 destacando a simetria que relaciona as duas subunidades e os domínios de dobramento.....	24
Figura 1.4	Resíduos que revestem o sítio ciclooxigenase. (A) Em destaque os resíduos inseridos nas α -hélices que delimitam o sítio Cox. (B) Estrutura em destaque do sítio Cox inserido na estrutura globular do monômero A da mCOX-2.....	26
Figura 1.5	Comparação entre a estrutura do domínio catalítico da mCOX-2 e da oCOX-1.....	27
Figura 1.6	O mecanismo de cadeia ramificada da COX.....	29
Figura 1.7	Resíduos que participam da reação de acetilação do resíduo Ser530 (rosa) no sítio ciclooxigenase da COX-1.....	30
Figura 1.8	Mecanismo de ação proposto para a acetilação do resíduo Ser530 do sítio catalítico ciclooxigenase da COX.....	31
Figura 1.9	Exemplos de fármacos anti-inflamatórios de segunda geração, inibidores seletivos de COX-2.....	35
Figura 1.10	Crescimento anual do número de estruturas depositadas no <i>Protein Data Bank</i> desde o ano de 1972 até 8 de março de 2011.....	36
Figura 1.11	Funcionamento básico de um algoritmo genético.....	39
Figura 1.12	Parâmetros geométricos utilizados para identificar as interações X-H... π	46
Figura 1.13	Representações de interações entre anéis de benzeno.....	47

2 MATERIAIS E MÉTODOS

Figura 2.1	Representação esquemática das etapas do trabalho.....	51
Figura 2.2	Estruturas modelo obtidas no banco de dados <i>PubChem Compound</i>	53
Figura 2.3	Estruturas dos ligantes do grupo 10.....	54
Figura 2.4	Estruturas dos ligantes do grupo 11.....	54

Figura 2.5	A molécula do Resveratrol, apresenta a numeração adotada para os átomos dos ligantes do grupo R e os centroides (A-B) dos anéis da estrutura.....	56
Figura 2.6	Ligantes modelados a partir do composto Resveratrol.....	56
Figura 2.7	Representação esquemática do procedimento de validação dos parâmetros para os cálculos de docking.....	58

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Figura 3.1	Sobreposição das estruturas dos ligantes, SC-558 (em azul), 11a (em amarelo) e 10a (em laranja).....	64
Figura 3.2	Representação em <i>solid ribbon</i> da estrutura do monômero A, com as α -hélices identificadas, da entrada 1cx2.....	65
Figura 3.3	Ligantes modelados dos grupos 10 e 11.....	66
Figura 3.4	Ligantes modelados a partir do composto Resveratrol.....	67
Figura 3.5	Visualização dos saídas (azul) obtidas no redocking do ligante SC-558 (laranja). Ao lado, os valores de RMSD obtidos usando o ligante cristalográfico como referência.....	68
Figura 3.6	Posicionamento dos coxibs: celecoxib, rofecoxib e valdecoxib, e do ligante SC-558 no sítio ciclooxygenase da COX-2.....	69
Figura 3.7	Visualização da sobreposição das poses do grupo 10 selecionadas para avaliação das interações intermoleculares.....	70
Figura 3.8	Posicionamento dos ligantes do grupo 10 no sítio ciclooxygenase da COX-2.....	71
Figura 3.9	Visualização das poses dos ligantes do grupo 10 no sítio de ligação...	73
Figura 3.10	Visualização da sobreposição das poses do grupo 11 selecionadas para avaliação das interações intermoleculares.....	74
Figura 3.11	Posicionamento dos ligantes do grupo 11 no sítio ciclooxygenase da COX-2.....	76
Figura 3.12	Visualização das poses dos ligantes do grupo 11 no sítio de ligação...	78
Figura 3.13	Visualização da sobreposição das poses do grupo R selecionadas para avaliação das interações intermoleculares.....	79
Figura 3.14	Posicionamento dos ligantes do grupo R no sítio ciclooxygenase da COX-2. (B) ligantes 1H6 e 6H14. (A) demais ligantes do grupo.....	80
Figura 3.15	Principais interações entre o resveratrol e os resíduos do sítio ciclooxygenase da COX-2.....	83
Figura 3.16	Principais interações entre o ligante 1M_CL3 e os resíduos do sítio ciclooxygenase da COX-2.....	86
Figura 3.17	Principais interações entre o ligante 1M_SM e os resíduos do sítio ciclooxygenase da COX-2.....	88
Figura 3.18	Principais interações entre o ligante 1H_CL3 e os resíduos do sítio ciclooxygenase da COX-2.....	89

Figura 3.19 Principais interações entre o ligante 1H_SM e os resíduos do sítio ciclooxygenase da COX-2.....	89
Figura 3.20 Visualização das poses dos ligantes do grupo R no sítio de ligação.....	90

APÊNDICE A - REDOCKING

Figura A.1 Principais interações entre o ligante SC 558 e o sítio ciclooxygenase no complexo 1cx2.....	110
Figura A.2 Principais interações do redocking do ligante SC 558.....	111

APÊNDICE B - INTERAÇÕES 1CX2/LIGANTE 10

Figura B.1 Principais interações entre o ligante 10a e os resíduos do sítio ciclooxygenase da COX-2.....	113
Figura B.2 Principais interações entre o ligante 10b e os resíduos do sítio ciclooxygenase da COX-2.....	114
Figura B.3 Principais interações entre o ligante 10c e os resíduos do sítio ciclooxygenase da COX-2.....	115
Figura B.4 Principais interações entre o ligante 10d e os resíduos do sítio ciclooxygenase da COX-2.....	116
Figura B.5 Principais interações entre o ligante 10e e os resíduos do sítio ciclooxygenase da COX-2.....	117
Figura B.6 Principais interações entre o ligante 10f e os resíduos do sítio ciclooxygenase da COX-2.....	118

APÊNDICE C - INTERAÇÕES 1CX2/LIGANTE 11

Figura C.1 Principais interações entre o ligante 11a e os resíduos do sítio ciclooxygenase da COX-2.....	120
Figura C.2 Principais interações entre o ligante 11b e os resíduos do sítio ciclooxygenase da COX-2.....	121
Figura C.3 Principais interações entre o ligante 11c e os resíduos do sítio ciclooxygenase da COX-2.....	122
Figura C.4 Principais interações entre o ligante 11d e os resíduos do sítio ciclooxygenase da COX-2.....	123
Figura C.5 Principais interações entre o ligante 11e e os resíduos do sítio ciclooxygenase da COX-2.....	124
Figura C.6 Principais interações entre o ligante 11f e os resíduos do sítio ciclooxygenase da COX-2.....	125

APÊNDICE D - INTERAÇÕES 1CX2/ LIGANTE R

Figura D.1 Principais interações entre o Resveratrol e os resíduos do sítio ciclooxygenase da COX-2.....	127
Figura D.2 Principais interações entre o ligante 1H6 e os resíduos do sítio ciclooxygenase da COX-2.....	128
Figura D.3 Principais interações entre o ligante 2H5 e os resíduos do sítio	129

	ciclooxigenase da COX-2.....	
Figura D.4	Principais interações entre o ligante 2H7 e os resíduos do sítio ciclooxigenase da COX-2.....	130
Figura D.5	Principais interações entre o ligante 2H14 e os resíduos do sítio ciclooxigenase da COX-2.....	131
Figura D.6	Principais interações entre o ligante 6H14 e os resíduos do sítio ciclooxigenase da COX-2.....	132
Figura D.7	Principais interações entre o ligante 1M2 e os resíduos do sítio ciclooxigenase da COX-2.....	133
Figura D.8	Principais interações entre o ligante 1M13 e os resíduos do sítio ciclooxigenase da COX-2.....	134
Figura D.9	Principais interações entre o ligante 2M1 e os resíduos do sítio ciclooxigenase da COX-2.....	135
Figura D.10	Principais interações entre o ligante 2M7 e os resíduos do sítio ciclooxigenase da COX-2.....	136
Figura D.11	Principais interações entre o ligante 2M16 e os resíduos do sítio ciclooxigenase da COX-2.....	137
Figura D.12	Principais interações entre o ligante 5M2 e os resíduos do sítio ciclooxigenase da COX-2.....	138
Figura D.13	Principais interações entre o ligante 10M2 e os resíduos do sítio ciclooxigenase da COX-2.....	139
Figura D.14	Principais interações entre o ligante 2E16 e os resíduos do sítio ciclooxigenase da COX-2.....	140
Figura D.15	Principais interações entre o ligante 10E2 e os resíduos do sítio ciclooxigenase da COX-2.....	141
Figura D.16	Principais interações entre o ligante 15E2 e os resíduos do sítio ciclooxigenase da COX-2.....	142
Figura D.17	Principais interações entre o ligante 16E2 e os resíduos do sítio ciclooxigenase da COX-2.....	143

LISTA DE TABELAS

1 INTRODUÇÃO

Tabela 1.1	Interações eletrostáticas.....	44
-------------------	--------------------------------	----

2 MATERIAIS E MÉTODOS

Tabela 2.1	Identificação dos substituintes que compõem a estrutura dos ligantes do grupo R.....	55
-------------------	--	----

Tabela 2.2	Dados de inibição* da atividade da COX-2 pelos compostos estudados.....	60
-------------------	---	----

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Tabela 3.1	Estruturas tridimensionais da COX-2, obtidas por difração de raios X, depositadas no PDB.....	62
-------------------	---	----

Tabela 3.2	Estruturas avaliadas e os resíduos de aminoácidos mais frequentemente envolvidos em interações com os compostos/fármacos no sítio ciclooxigenase da COX-2.....	63
-------------------	--	----

Tabela 3.3	Fórmula estrutural dos compostos complexados nas estruturas selecionadas da COX-2.....	64
-------------------	--	----

Tabela 3.4	Escores obtidos pelos coxibs e pelo ligante SC-558.....	69
-------------------	---	----

Tabela 3.5	Escores obtidos pelos ligantes do grupo 10.....	71
-------------------	---	----

Tabela 3.6	Ligantes do grupo 10 e os resíduos de aminoácidos mais frequentemente envolvidos em interações no sítio ciclooxigenase da COX-2 com seus respectivos valores de escore.....	72
-------------------	---	----

Tabela 3.7	Escores obtidos pelos ligantes do grupo 11.....	75
-------------------	---	----

Tabela 3.8	Ligantes do grupo 11 e os resíduos de aminoácidos mais frequentemente envolvidos em interações no sítio ciclooxigenase da COX-2 com seus respectivos valores de escore.....	77
-------------------	---	----

Tabela 3.9	Escores obtidos pelos ligantes do grupo R.....	81
-------------------	--	----

Tabela 3.10	Ligantes do grupo R e os resíduos de aminoácidos mais frequentemente envolvidos em interações no sítio ciclooxigenase da COX-2 com seus respectivos valores de escore.....	85
--------------------	--	----

Tabela 3.11	Comparação entre valores de escore dos ligantes teste e do ligante 1M13.....	88
--------------------	--	----

APÊNDICE A - REDOCKING

Tabela A.1	Interações do ligante SC 558 no complexo pdb 1cx2.....	109
-------------------	--	-----

Tabela A.2	Interações do ligante SC 558 no redocking.....	110
-------------------	--	-----

APÊNDICE B - INTERAÇÕES 1CX2/ LIGANTES DO GRUPO 10

Tabela B.1	Interações do ligante 10a.....	113
-------------------	--------------------------------	-----

Tabela B.2	Interações do ligante 10b.....	114
-------------------	--------------------------------	-----

Tabela B.3	Interações do ligante 10c.....	115
Tabela B.4	Interações do ligante 10d.....	116
Tabela B.5	Interações do ligante 10e.....	117
Tabela B.6	Interações do ligante 10f.....	118

APÊNDICE C - INTERAÇÕES 1CX2/ LIGANTES DO GRUPO 11

Tabela C.1	Interações do ligante 11a.....	120
Tabela C.2	Interações do ligante 11b.....	121
Tabela C.3	Interações do ligante 11c.....	122
Tabela C.4	Interações do ligante 11d.....	123
Tabela C.5	Interações do ligante 11e.....	124
Tabela C.6	Interações do ligante 11f.....	125

APÊNDICE D - INTERAÇÕES 1CX2/ LIGANTES DO GRUPO R

Tabela D.1	Interações do Resveratrol.....	127
Tabela D.2	Interações do ligante 1H6.....	128
Tabela D.3	Interações do ligante 2H5.....	129
Tabela D.4	Interações do ligante 2H7.....	130
Tabela D.5	Interações do ligante 2H14.....	131
Tabela D.6	Interações do ligante 6H14.....	132
Tabela D.7	Interações do ligante 1M2.....	133
Tabela D.8	Interações do ligante 1M13.....	134
Tabela D.9	Interações do ligante 2M1.....	135
Tabela D.10	Interações do ligante 2M7.....	136
Tabela D.11	Interações do ligante 2M16.....	137
Tabela D.12	Interações do ligante 5M2.....	138
Tabela D.13	Interações do ligante 10M2.....	139
Tabela D.14	Interações do ligante 2E16.....	140
Tabela D.15	Interações do ligante 10E2.....	141
Tabela D.16	Interações do ligante 15E2.....	142
Tabela D.17	Interações do ligante 16E2.....	143

SUMÁRIO

APRESENTAÇÃO.....	15
CAPÍTULO 1. INTRODUÇÃO.....	18
1.1 AS CICLOOXIGENASES.....	19
1.1.1 <i>Localização e função</i>	21
1.1.2 <i>A base estrutural da COX-1 e COX-2</i>	23
1.1.3 <i>O domínio catalítico</i>	25
1.1.4 <i>Mecanismo do ciclo catalítico na COX</i>	28
1.1.5 <i>Mecanismo molecular da inibição da COX-1 e 2 pelo AAS</i>	30
1.2 ANTI-INFLAMATÓRIOS NÃO ESTEROIDES - AINES	32
1.2.1 <i>Coxibs</i>	33
1.3 PLANEJAMENTO RACIONAL DE FÁRMACOS.....	36
1.3.1 <i>Docking molecular</i>	38
1.4 OBJETIVOS	48
CAPÍTULO 2. MATERIAIS E MÉTODOS	50
2.1 A ESTRUTURA TRIDIMENSIONAL DA COX-2	52
2.2 A ESTRUTURA TRIDIMENSIONAL DOS LIGANTES	52
2.2.1 <i>Obtenção das coordenadas da estrutura modelo</i>	52
2.2.2 <i>Modelagem dos ligantes</i>	53
2.2.3 <i>Otimização da geometria dos ligantes</i>	57
2.3 CÁLCULOS DE <i>DOCKING</i>	57
2.4 VALIDAÇÃO DOS PARÂMETROS PARA O <i>DOCKING</i>	58
2.5 VISUALIZAÇÃO MOLECULAR.....	59
2.6 ANÁLISE DOS RESULTADOS	59
CAPÍTULO 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	61
3.1 A ESTRUTURA DA PROTEÍNA	62
3.2 OS LIGANTES.....	65
3.3 OS ESTUDOS DE DOCKING	68
3.3.1 <i>Redocking</i>	68
3.3.2 <i>Resultados para o Grupo 10</i>	70
3.3.3 <i>Resultados do Grupo 11</i>	74

3.3.4	<i>Resultados para o Grupo R</i>	79
3.3.5	<i>Resultados para o Resveratrol</i>	86
3.3.6	<i>A interação CH...π com a serina 353</i>	87
CAPÍTULO 4. CONCLUSÕES		92
REFERÊNCIAS		95
APÊNDICES		107

Apresentação

Este trabalho se insere dentro das linhas de pesquisa do BioMat - Grupo de Física Teórica de Materiais e Biomoléculas do Departamento de Física e foi desenvolvido em conjunto com o LaCrEMM – Laboratório de Cristalografia, Estereodinâmica e Modelagem Molecular do Departamento de Química, ambos da Universidade Federal de São Carlos – UFSCar.

O docking molecular tem sido, nos dois grupos, uma das ferramentas utilizadas para estudar a formação de complexos receptor-ligante, sendo, a análise dos mesmos, realizada sob o ponto de vista da química supramolecular (CARACELLI et al., 2010, SENG et al., 2010, SENG et al. 2008-Top 25 Science Direct, CUNHA et al., 2006-Top 25 Science Direct).

Os estudos envolvendo a enzima ciclooxigenase (COX), iniciaram-se no BioMat, em 2008, com um trabalho de Iniciação Científica (Natalia Baptistini, Bolsa FAPESP; prêmio de melhor trabalho na área de saúde – UNESP/Bauru, 2010) e em seguida com um mestrado em Biotecnologia-UFSCar (ARMELIN, P. R. G., 2010; bolsa CAPES).

Duas isoformas de COX são normalmente encontradas: COX-1, considerada como isoforma constitutiva, e COX-2, considerada como isoforma induzida, as duas proteínas são estruturalmente distintas.

COX-1 e COX-2 são de particular interesse por serem os principais alvos dos compostos anti-inflamatórios não esteroides (AINEs), sendo que, os inibidores seletivos de COX-2, conhecidos por coxibs, representam uma importante categoria terapêutica relacionada à redução de inflamação, dor, e febre, além de reduzir eventos trombóticos fatais, ter ação no controle de alguns tipos de câncer e na progressão do mal de Alzheimer, quando utilizados de forma prolongada. No entanto, vários destes medicamentos apresentam efeitos cardiovasculares adversos e o uso terapêutico deles tem sido restringido por várias agências reguladoras, no Brasil e no mundo.

Efeitos colaterais estão, normalmente, relacionados a atuação do fármaco em sítios receptores diferentes daquele que deve ser o alvo terapêutico. Poder antecipar esse tipo de situação é uma possibilidade cada vez mais concreta, graças ao crescente desenvolvimento da capacidade de processamento dos meios computacionais, que aliados à diminuição dos custos dos mesmos, têm proporcionado diferentes tecnologias *in silico* e permitido o uso de ferramentas valiosas no desenvolvimento e melhoramento de moléculas candidatas a fármaco.

O docking molecular é uma dessas ferramentas, e tem se mostrado muito eficaz para a compreensão e otimização das interações entre fármaco (ligante) e o sítio receptor das macromoléculas alvo (proteínas, DNA e outras). A predição da orientação e conformação do ligante em seu sítio receptor pode possibilitar o planejamento de mudanças estruturais no composto levando a interações mais eficazes, aumentando a especificidade para o sítio receptor, reduzindo a dosagem necessária para os efeitos terapêuticos e provavelmente reduzindo efeitos adversos.

Entretanto, mesmo diante dos avanços sem precedentes na descoberta e melhoramento de compostos candidatos a fármacos, o desenvolvimento de uma terapia segura, eficaz e econômica para o tratamento de algumas condições terapêuticas ainda representa um grande desafio. Nos dias atuais, interpretar dados e compreender modelos de sistemas cada vez mais dinâmicos e complexos parecem ser o paradigma presente e o papel primordial a ser desempenhado pelo pesquisador contemporâneo na busca das soluções para grande parte desse desafio.

Nesse sentido, foi realizada minuciosa busca na bibliografia disponível para obtenção dos dados e conceitos descritos no Capítulo 1, acreditando que possam dar o apoio e os meios que facilitem a compreensão do estudo proposto. Deve ser ressaltado que foi dada ênfase às características estruturais da proteína estudada, bem como aos parâmetros geométricos que permitem identificar os tipos de interações intermoleculares envolvidas no reconhecimento molecular entre enzima e ligante. Neste capítulo são apresentados também os objetivos do trabalho.

No Capítulo 2, os materiais e métodos utilizados são descritos de forma a qualificar a importância relativa dos mesmos em cada etapa do estudo, e os resultados obtidos são discutidos no Capítulo 3 e Apêndices, de modo a encontrar justificativas, em nível molecular para os efeitos inibitórios apresentados pelas moléculas dos ligantes.

No Capítulo 4, são apresentadas as conclusões do trabalho, onde as implicações das discussões do capítulo anterior estão sintetizadas, com o fim de permitir a compreensão global dos resultados obtidos no trabalho e, posteriormente, as referências.

CAPÍTULO 1

Introdução

A enzima prostaglandina endoperoxídeo sintase ou prostaglandina H sintase (PGHS), normalmente denominada ciclooxigenase (COX), é uma hemoproteína glicosilada homodimérica bifuncional ligada à membrana e encontrada predominantemente no retículo endoplasmático e envelope nuclear. Apresenta-se, normalmente, sob duas isoformas: COX-1, considerada como isoforma constitutiva, e COX-2, considerada como isoforma induzida, contudo, são duas proteínas estruturalmente distintas.

COX-1 é expressa constitutivamente em muitas células e está diretamente ligada a síntese de prostanóides envolvidos em processos fisiológicos que contribuem para a manutenção da homeostasia no rim, trato gastrointestinal e plaquetas. Considera-se também que tenha papel importante na manutenção de uma gravidez saudável.

Embora seja expressa constitutivamente no cérebro e nos rins, COX-2 está normalmente associada a processos inflamatórios, aumentando sua expressão em resposta a presença de endotoxinas, citocinas pró-inflamatórias, fatores de crescimento, hormônios, promotores de tumor e carcinomas, sendo por isso, considerada uma isoforma induzida de COX.

Uma terceira isoforma de COX, aparentemente constitutiva, denominada COX-3/PGHS-3, tem sido objeto de estudos nos últimos anos. Sabe-se que é uma variante da COX-1 que manteve o intron-1 durante a tradução e que é encontrada em tecidos humanos na forma poliadenilada, entretanto, pouco se conhece a respeito de seu papel fisiológico (CHANDRASEKHARAN et al., 2002).

A principal diferença estrutural entre COX-2 e COX-1 é a presença de um bolso lateral no sítio ativo ciclooxigenase devido a substituição do resíduo Ile (isoleucina) da COX-1 pelo resíduo Val (valina) na COX-2 na posição 523 de ambas as isoformas, o que faz com que o sítio de ligação para o substrato das isoenzimas apresentem diferente conformação quando comparados, permitindo a seleção de ligantes com alta especificidade para COX-2.

1.1 As ciclooxigenases

Ciclooxigenases (COX), também conhecidas como prostaglandina endoperoxídeo sintase ou prostaglandina H sintase (PGHS), são oxigenases (EC 1.14.99.1) de ácidos graxos da superfamília mieloperoxidase estreitamente relacionadas com as oxidases

patógeno induzíveis e a síntese do linoleato diol de plantas e fungos (CHANDRASEKHARAN; SIMMONS, 2004).

O principal substrato para a COX é o ácido araquidônico, um ácido graxo poli-insaturado de vinte carbonos que é convertido a prostaglandina H_2 pela ação dos sítios catalíticos da enzima.

Por muitos anos, desde a primeira purificação da COX a partir de vesículas seminais ovinas e bovinas em 1976, passando pela clonagem do gene responsável por sua produção, realizada por Merlie et al., (1988) e DeWitt; Smith, (1988), acreditou-se que existisse apenas uma forma de COX. Porém, em 1991, Xie et al., (1991) e Kujubu et al., (1991) descobriram mRNAs cuja expressão foi induzida em fibroblastos de galinha e de rato em resposta a proteína pp60^{c-src} e ao 12-*O*-tetradecanoilforbol-13-acetato (TPA), respectivamente. As proteínas codificadas apresentaram em torno de 60% de identidade para a sequência de aminoácidos, quando comparadas com a COX-1, até então conhecida apenas por COX ou PGHS. Trabalhos posteriores demonstraram que a nova proteína, agora chamada de COX-2, PGHS-2 ou uma isoforma, é muito semelhante a COX-1 ou PGHS-1 em estrutura, mas difere substancialmente da mesma em relação ao seu padrão de expressão e sua biologia (SMITH; GARAVITO; DeWITT, 1996).

Todos os vertebrados, incluindo os peixes cartilaginosos, peixes ósseos, aves e mamíferos, e ainda, as ascídias e corais do filo Cnidaria, têm dois genes para codificar COX: um para a COX-1 e outro para a COX-2. Embora, esses genes não estejam presentes em insetos, em organismos unicelulares ou em plantas, prostaglandinas foram encontradas em alguns destes organismos, o que sugere a existência de caminhos evolutivos alternativos para a síntese de prostanóides (CHANDRASEKHARAN; SIMMONS, 2004).

Evidenciando o raciocínio descrito acima, em 2003, uma enzima que catalisa a síntese de prostaglandina E_2 a partir do ácido araquidônico, ainda que, sem apresentar nítida semelhança estrutural com nenhuma das isoformas da COX, foi clonada a partir do protozoário *Entamoeba histolytica* (DEY et al., 2003).

COX-1 e COX-2 são codificadas por genes separados localizados em diferentes cromossomos. Em humanos, o gene que codifica para a COX-1 está localizado no cromossomo 9, tem 22 kb de comprimento, contém 11 exons e 10 introns e é transcrito em um mRNA de 2,8 kb. O gene para COX-2 está presente no cromossomo 1, tem 8,3 kb de comprimento, contém 10 exons e 9 introns e é transcrito em mRNA de 2,8, 4,0 e 4,6 kb,

dependendo do sítio de poliadenilação para a região 3' não traduzida (KOSAKA et al., 1994; TANABE; TOHNAI, 2002).

Inicialmente, a tradução para COX gera proteínas, com 599 aminoácidos, incluindo a sequência sinal de 23 aminoácidos, para a COX-1 e, 604 aminoácidos, incluindo a sequência sinal de 17 aminoácidos, para a COX-2. Nas duas isoformas, a sequência sinal é removida no processamento da proteína madura (KOSAKA et al., 1994).

1.1.1 Localização e função

COXs são enzimas bifuncionais com duas atividades catalíticas distintas: ciclooxigenase (ou bis-dioxigenase) e peroxidase. No sítio da atividade ciclooxigenase, o ácido araquidônico (AA) é oxidado ao hidroperóxido prostaglandina G₂ (PGG₂). Posteriormente, no sítio da atividade peroxidase, o PGG₂ é reduzido ao álcool correspondente prostaglandina H₂ (PGH₂), composto precursor de vários outros prostanóides, entre os quais, prostaglandina D₂, prostaglandina E₂, prostaglandina F_{2α}, prostaciclina e tromboxana.

COX-1 é expressa constitutivamente em, praticamente, todos os tecidos de mamíferos e apresenta papel essencial nos processos homeostáticos, como a agregação plaquetária, proteção gastrointestinal e função renal. Em algumas células, sua expressão pode ser aumentada, de duas a quatro vezes mais, como resposta a alguns hormônios e fatores de crescimento (SMITH; GARAVITO; DeWITT, 1996).

Em contrapartida, COX-2 somente é encontrada em níveis muito baixos em tecidos de mamíferos, entretanto, o aumento da sua expressão pode ser induzido rapidamente como resposta à presença de fatores de crescimento, promotores de tumor, hormônios, endotoxina bacteriana e citocinas, participando na síntese de prostanóides que fazem a mediação de processos patofisiológicos, tais como, dor, inflamação, febre e carcinogênese (GAJRAJ, 2003; WU et al., 2010). Ainda que reconhecida como a isoforma induzida das ciclooxigenases, COX-2 tem sido detectada constitutivamente em tecidos de mamíferos, principalmente no cérebro, testículos, rins e traqueia (SMITH; GARAVITO; DeWITT, 1996; GAJRAJ, 2003).

Dados publicados nos últimos anos têm ajudado a entender melhor o papel da COX-2 e demonstrado que a ideia da existência de uma isoforma *constitutiva* relacionada a processos homeostáticos atribuída a COX-1, e de uma outra isoforma *induzida* relacionada o

processos inflamatórios atribuída a COX-2, pode ser uma "generalização" que não se aplica a todos os tecidos de mamíferos.

Em processos neurodegenerativos, por exemplo, essa visão parece não se aplicar adequadamente. Os trabalhos de Aid, Langenbach; Bosetti (2008); Dargahi et al., (2010); Aid; Bosetti (2011), demonstram que a COX-1 pode estar ativamente envolvida na lesão cerebral, ao ser induzida por estímulos pró-inflamatórios, e a atividade da COX-2, ao contrário, estaria relacionada com ações neuroprotetoras ao participar da geração de novos mediadores com propriedades pró-resolução.

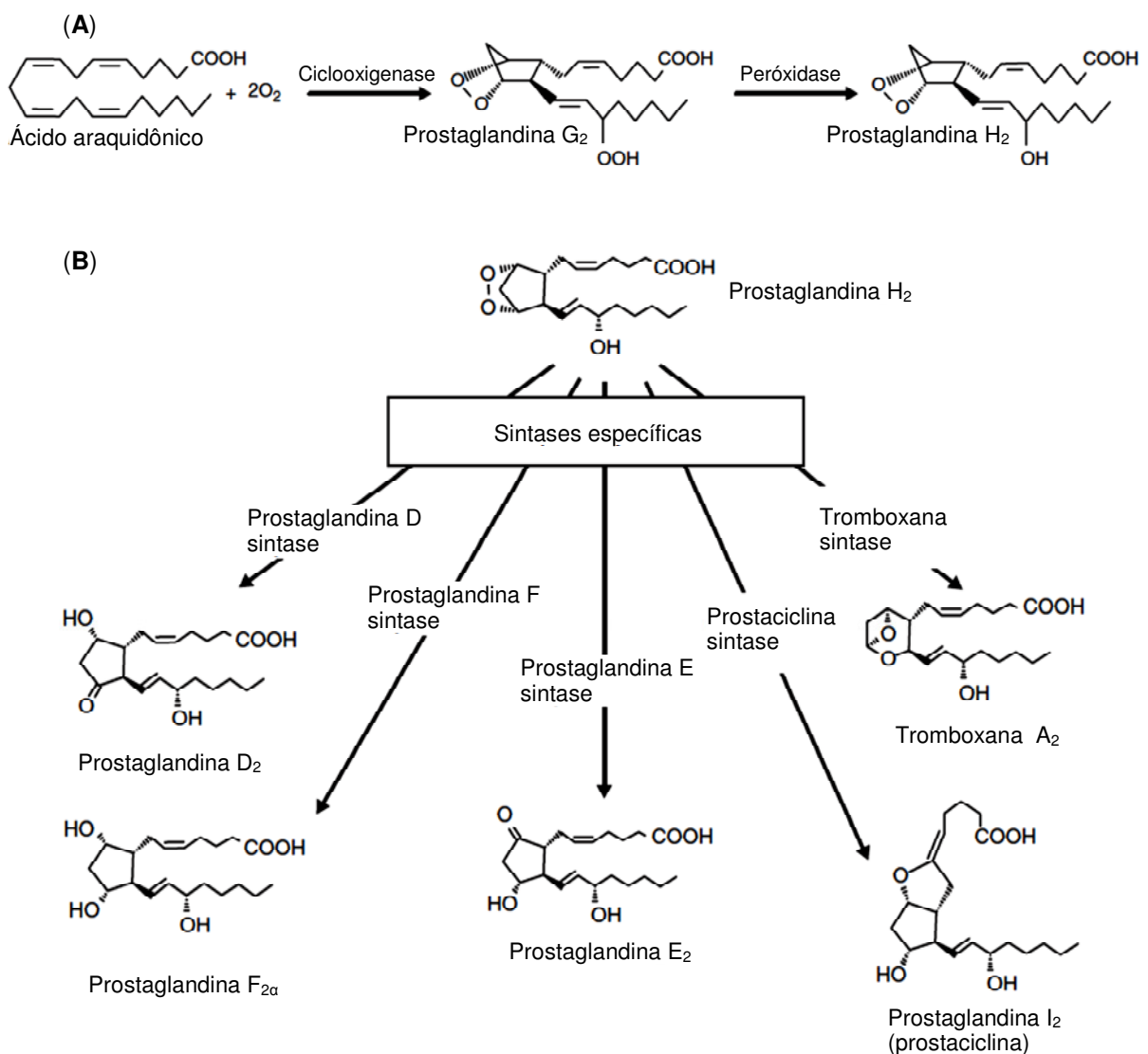


Figura 1.1 (A) As duas reações realizadas pelas ciclooxigenases: a conversão do ácido araquidônico em prostaglandina G₂ pela ação do sítio ciclooxigenase e a conversão da prostaglandina G₂ a prostaglandina H₂ pela ação do sítio peroxidase. (B) As sintases específicas que estão envolvidas na conversão da prostaglandina H₂ para as cinco principais prostaglandinas. Adaptado de Chandrasekharan e Simmons (2004).

A Figura 1.1, mostra esquematicamente as principais etapas da conversão do ácido araquidônico a PGG₂ e os principais prostanóides obtidos a partir da PGH₂.

COX-1 e COX-2 estão normalmente localizadas no lado luminal da membrana do retículo endoplasmático (RE) e no envelope nuclear, embora, em algumas situações, também tenham sido detectadas em corpos lipídicos, mitocôndrias, estruturas filamentosas, vesículas e no núcleo (CHANDRASEKHARAM; SIMMONS, 2004).

1.1.2 A base estrutural da COX-1 e COX-2

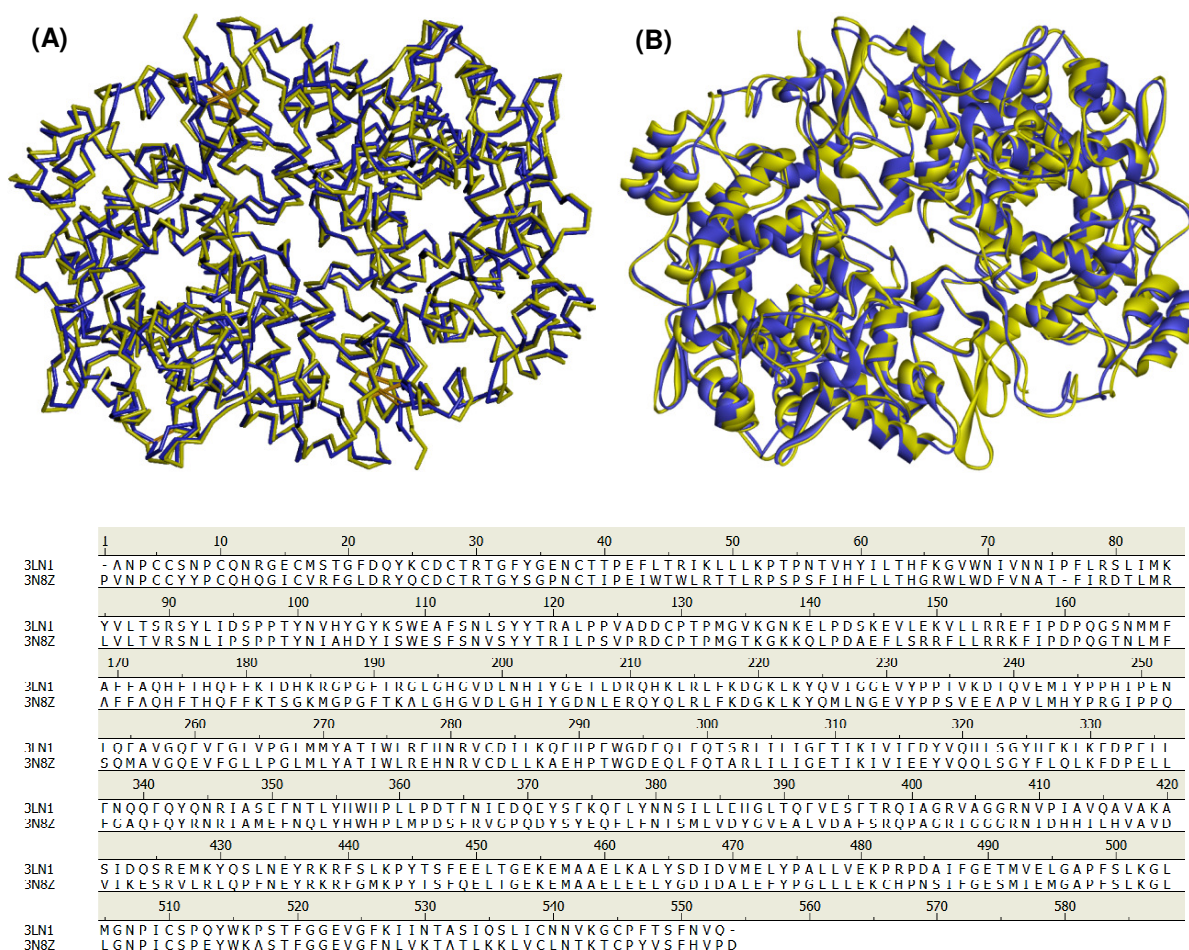


Figura 1.2 Vista superior da sobreposição das cadeias de carbonos alfa das estruturas oCOX-1 (pdb:3n8z em azul) e mCOX-2 (pdb:3ln1 em amarelo), (A) em *stick*, (B) em *solid ribbon*. Embaixo, a sequencia alinhada dos resíduos das duas estruturas. Cálculos realizados pelo software *Discovery Studio 3.0 Visualizer* indicam 64,4% de identidade entre as duas estruturas.

COX-1 e 2 são muito semelhantes estruturalmente (Figura 1.2). Ambas são proteínas homodiméricas que contém o cofator heme e possuem peso molecular aproximado de 71 kDa. Quanto a sequencia de aminoácidos, apresentam uma identidade de 60% a 65%

quando comparados para uma mesma espécie e de 85% a 90% de identidade quando as isoformas individuais são comparadas entre diferentes espécies (SMITH; DeWITT; GARAVITO, 2000).

As maiores diferenças entre as sequências de aminoácidos das duas isoformas estão presentes nas estruturas responsáveis pela inserção das mesmas na camada fosfolipídica da membrana celular (SPENCER et al., 1999). Outra diferenciação está relacionada à inserção de 18 aminoácidos na extremidade carboxi terminal da isoforma 2, não presentes na isoforma 1, e a inserção de 8 aminoácidos na extremidade amino terminal da isoforma 1, não presentes na isoforma 2 (SMITH; DeWITT; GARAVITO, 2000; MIFFLIN; POWEL, 2001).

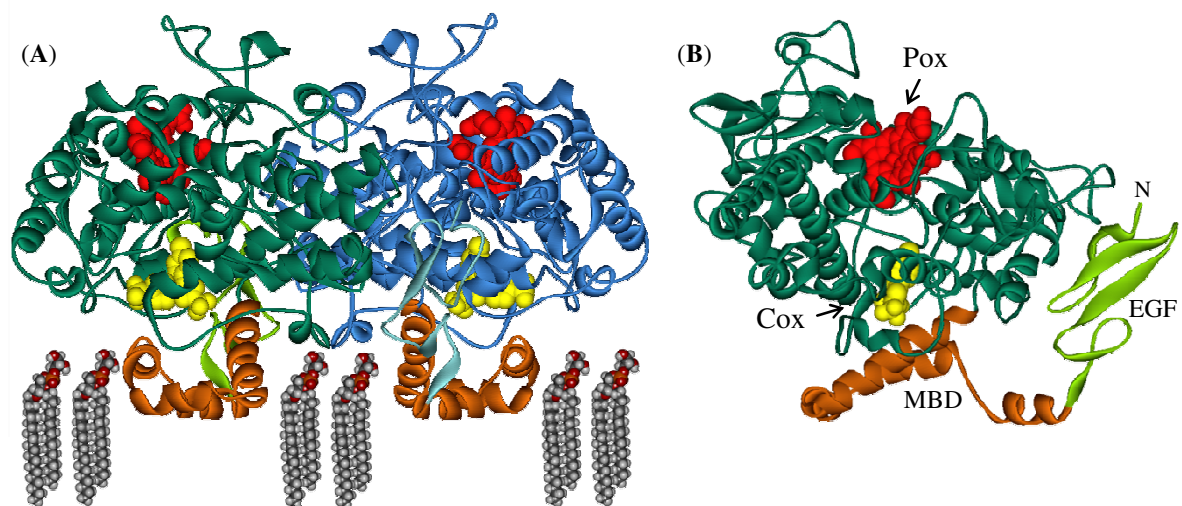


Figura 1.3 Estrutura do dímero da mCOX-2 destacando a simetria que relaciona as duas subunidades e os domínios de dobramento. (A) Diagrama em fita do homodímero com o inibidor seletivo Celoxib (amarelo) ligado no sitio ativo da enzima, interdigitados em uma face da superfície luminal da bicamada lipídica da membrana. As posições dos três principais domínios de dobramento são representadas: fator de crescimento epidérmico (EGF; verde claro para o monômero A e azul claro para o monômero B), domínio de ligação à membrana (MBD; laranja) e o domínio catalítico (verde para o monômero A e azul para o monômero B), bem como os sítios ativos peroxidase (Pox) e ciclooxigenase (Cox). O heme é mostrado em vermelho. (B) Representação em fita do monômero A complexado com Celoxib mostrando a interface com o monômero B, indicando os locais dos sítios Pox e Cox, e os domínios EGF e MBD. O esquema de cores é o mesmo utilizado em (A).

As proteínas maduras contêm, em cada monômero, três domínios estruturais distintos (Figura 1.3): um fator de crescimento epidérmico (EGF-like) constituído por cerca de 40 aminoácidos na extremidade N-terminal; outro, também com cerca de 40 aminoácidos, definido como o domínio de ligação à membrana (MBD); e em terceiro, com cerca de 460 aminoácidos, que constitui um grande domínio globular C-terminal, dividido em dois

distintos sítios catalíticos, ciclooxigenase (Cox) e peroxidase (Pox) (SMITH; DeWITT; GARAVITO, 2000; MIFFIN; POWEL, 2001; ROUZER; MARNETT, 2003).

O domínio EGF constitui uma parte da interface do dímero e acredita-se que esteja envolvido nas interações proteína-membrana, além de ter um papel destacado para o dobramento correto da proteína (SMITH; DeWITT; GARAVITO, 2000; ROUZER; MARNETT, 2003). O domínio MBD contém quatro α -hélices anfipáticas curtas (hélices A-D) consecutivas, sendo que a última delas, a hélice D, funde-se com o domínio catalítico da proteína. Essas hélices ancoram a proteína em apenas, uma das faces da dupla camada lipídica da membrana (PICOT; GARAVITO, 1994). Este tipo de inserção na membrana foi encontrado apenas para a COX e outras poucas proteínas, tais como esqualeno ciclase e *S*-mandelato desidrogenase (SMITH; DeWITT; GARAVITO, 2000; CHANDRASEKHARAM; SIMMONS, 2004).

A conformação das α -hélices do domínio MDB, além de ancorarem a enzima na membrana, forma a entrada para o canal da COX, permitindo o acesso do substrato ao sítio ativo a partir do interior da bicamada fosfolipídica.

1.1.3 O domínio catalítico

O domínio catalítico globular compreende a maior estrutura das isoformas de COX. Cada monômero da COX-1 e 2 contém um canal hidrofóbico com cerca de 25 Å que se origina no domínio de ligação à membrana (MBD) e estende-se até o núcleo do domínio globular (KURUMBAIL et al., 1996) que define o sítio ciclooxigenase da COX (Figura 1.4). Esse canal contém vários bolsos laterais (GARAVITO; MALKOWSKI; DeWITT, 2002), bem como um canal ramificado de água (SEIBOLD et al., 2000) que se estende das proximidades da Gly533, no sítio ciclooxigenase, para a interface do dímero.

A primeira metade do canal, ligeiramente mais larga, é formada pelas hélices do MBD que formam a entrada por onde o ácido araquidônico e O₂ (oxigênio molecular) entram diretamente no sítio ciclooxigenase a partir do compartimento apolar da bicamada lipídica. Acredita-se que todos os substratos de ácidos graxos e os anti-inflamatórios não esteroides (AINEs) entrem no sítio da atividade ciclooxigenase através do MBD.

No topo dessa primeira metade, o canal estreita-se em uma constrição formada pelos resíduos Arg120, Tyr355 e Glu524, antes de formar o sítio ciclooxigenase. Para que os

substratos e AINEs possam adentrar ou sair do sítio ciclooxigenase, é necessário que essa constrição se movimente de modo similar a uma porta de acesso. E realmente, esta região parece ter mobilidade suficiente nas estruturas disponíveis da COX para permitir que o movimento da hélice D possa desestabilizar as ligações de hidrogênio entre os resíduos de constrição e facilitar a abertura e fechamento da mesma, o que leva a percepção de que o MBD pode sofrer significativas alterações conformacionais durante a entrada do substrato e saída do produto (GARAVITO; MALKOWSKI; DeWITT, 2002; ROUZER; MARNETT, 2003).

Sítio da atividade ciclooxigenase

O centro catalítico ciclooxigenase (Cox) abrange a metade superior do canal que se estende desde a Arg120 até a Tyr385, o resíduo diretamente envolvido na catálise do AA a PGG₂ (SHIMOKAWA et al., 1990).

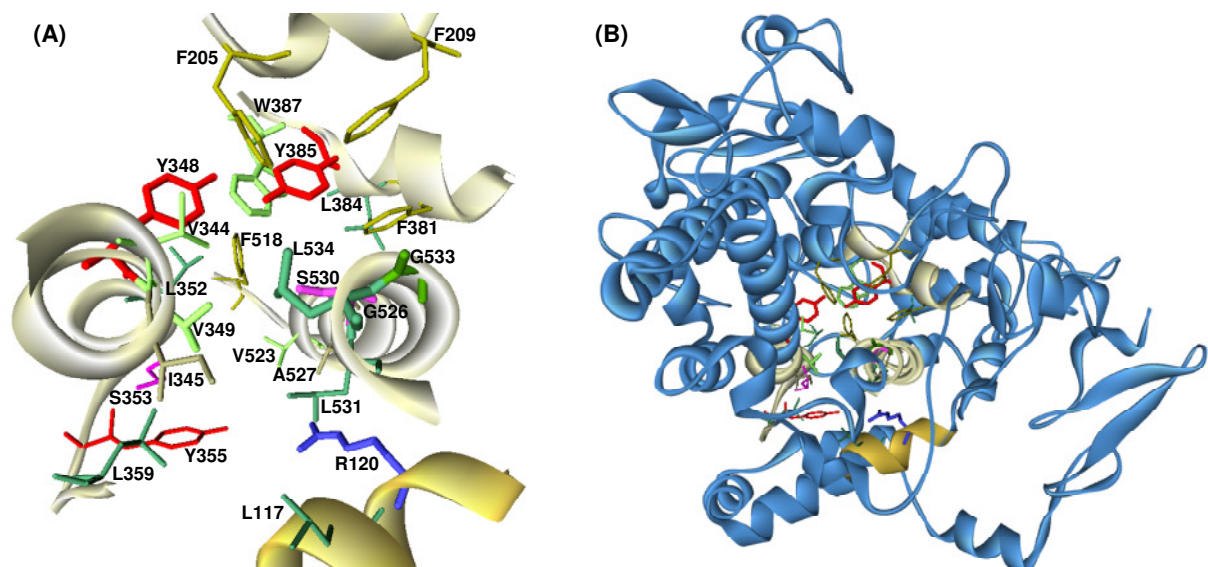


Figura 1.4 Resíduos que revestem o sítio ciclooxigenase. (A) Em destaque os resíduos inseridos nas α -hélices que delimitam o sítio Cox. (B) Estrutura em destaque do sítio Cox inserido na estrutura globular do monômero A da mCOX-2.

Vinte e quatro resíduos alinhados (Leu117, Arg120, Phe205, Phe209, Val344, Ile345, Tyr348, Val349, Leu352, Ser353, Tyr355, Leu359, Phe381, Leu384, Tyr385, Trp387, Phe518, Ile/Val523, Gly526, Ala527, Ser530, Leu531, Gly533, Leu534) compõem o sítio hidrofóbico da atividade ciclooxigenase na COX (Figura 1.4), apresentando apenas uma única diferença entre as isoformas da enzima - Ile na posição 523 para a COX-1 e Val na posição

523 para a COX-2, sendo que, dentre os aminoácidos que revestem o canal do sítio, somente três resíduos são polares: Arg120, Ser353, e Ser530 (SMITH; DeWITT; GARAVITO, 2000). Thuresson et al. (2001), simplificadamente, categorizou os resíduos do sítio da atividade ciclooxigenase em cinco grupos funcionais: (a) resíduos diretamente envolvidos na abstração do hidrogênio pro(*S*) do C-13 do AA (Tyr385); (b) resíduos essenciais para o posicionamento do C13 do AA (Gly533 e Tyr348); (c) resíduos críticos para a alta afinidade de ligação com o AA (Arg120); (d) resíduos críticos para o posicionamento do AA de forma a facilitar a produção da PGG₂ depois da abstração do Hidrogênio (Val349, Trp387 e Leu534); e (e) todos os outros que individualmente tem pouca contribuição.

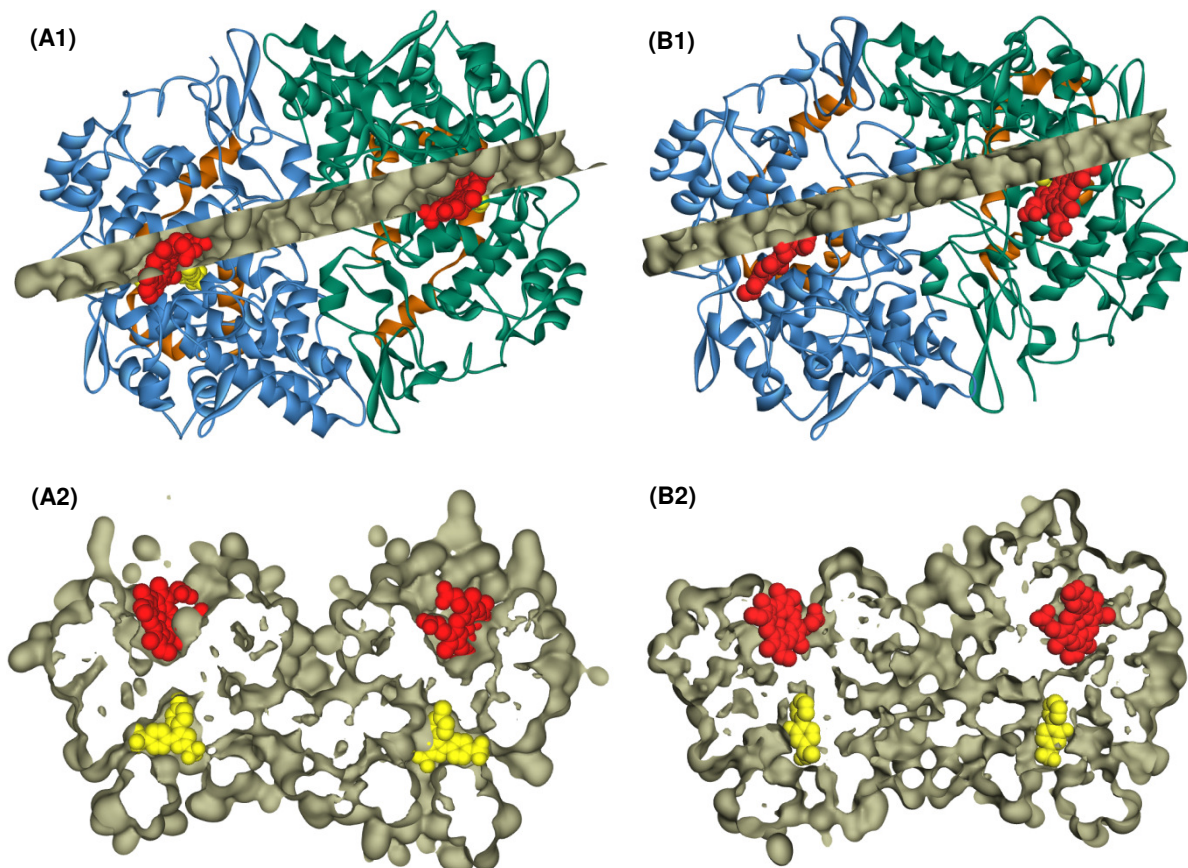


Figura 1.5 Comparação entre a estrutura do domínio catalítico da mCOX-2 e da oCOX-1. **(A1)** e **(B1)** Diagrama em fita da vista superior dos homodímeros mCOX-2 (A1) e oCOX-1 (B1) com a representação do recorte transversal (cinza) realizado na superfície dos sítios peroxidase (Pox) e ciclooxigenase (Cox); o inibidor seletivo Celoxib (A1; amarelo) e o inibidor Flurbiprofen (B1; amarelo) ligados no sítio Cox das isoenzimas; o cofator heme (vermelho) ligado no sítio Pox das isoenzimas; o domínio de ligação à membrana (MBD; laranja); e o domínio catalítico (verde para o monômero A e azul para o monômero B). **(A2)** e **(B2)** Vista lateral do recorte representado em (A1) e (B1), demonstrando as diferenças no formato dos sítios Cox das isoenzimas; a localização do heme em relação à superfície das isoenzimas; a constrição do canal pela presença dos resíduos Arg120, Tyr355 e Glu524 logo abaixo do sítio Cox e a separação entre os sítios Cox e Pox, em ambas as isoenzimas. O esquema de cores é o mesmo que em (A1).

O sítio ativo ciclooxygenase da COX-2 é cerca de 20% maior e tem um formato ligeiramente diferente do da COX-1 (Figura 1.5). Esta diferença no volume do sítio ativo e na forma é devido à variação em três aminoácidos da COX-1 para a COX-2: Ile523 para Val523 na primeira camada do sítio ativo, e Ile 434 para Val434 e His513 para Arg513 na segunda camada ao redor (LUONG et al.¹, 1996 apud SMITH; DeWITT; GARAVITO, 2000). Essas diferenças fornecem maior flexibilidade para o substrato no sítio ciclooxygenase da COX-2, permitindo que essa isoforma consiga oxidar uma variedade maior de substratos em comparação com a COX-1, como por exemplo, os endocanabinóides 2-araquidonilglicerol, araquidonilglicina e *N*-araquidonilglicina (KOZAK et al, 2001; ROUZER; MARNETT, 2003; VECCHIO; SIMMONS; MALKOWSKI, 2010).

1.1.4 Mecanismo do ciclo catalítico na COX

Resumidamente, a atividade catalítica da COX pode ser descrita por uma sequencia composta por uma reação onde um ácido graxo, normalmente o ácido araquidônico ou outro ácido 20:4, é oxigenado pela atividade ciclooxygenase levando a produção do hidroperóxido prostaglandina G₂, e uma outra reação, onde a atividade peroxidase reduz o hidroperóxido formando a prostaglandina H₂.

Embora os sítios onde ocorram as duas reações sejam fisicamente distintos, as duas reações estão funcionalmente ligadas entre si e são fundamentais para a ativação da função catalítica na COX.

A melhor explicação para esse fato baseia-se em evidências de que as duas atividades da COX estão interligadas mecanicamente através de um mecanismo de cadeia ramificada (DIETZ; NASTAINCZYK; RUF, 1998; DONK; TSAI; KULMACZ, 2002; ROUZER; MARNETT, 2003), onde um único ciclo da reação peroxidase sustentaria muitos ciclos da reação ciclooxygenase (Figura 1.6).

Conforme mostrado na Figura 1.6, para que a COX realize suas funções, a recém-sintetizada enzima precisa ser ativada pela produção de um radical tirosil a partir do resíduo Tyr385, processo que envolve a ativação do heme (Fe(III)PPIX) no sitio peroxidase. A seguir, o radical tirosil converte o ácido araquidônico em um radical araquidonil, que reage

¹ LUONG C. et al. *Nat. Struct. Biol.* v. 3, p. 927-33, 1996.

com duas moléculas de oxigênio para produzir prostaglandina G_2 , que então, difunde-se para o sítio Pox e é reduzido a prostaglandina H_2 pela atividade peroxidase.

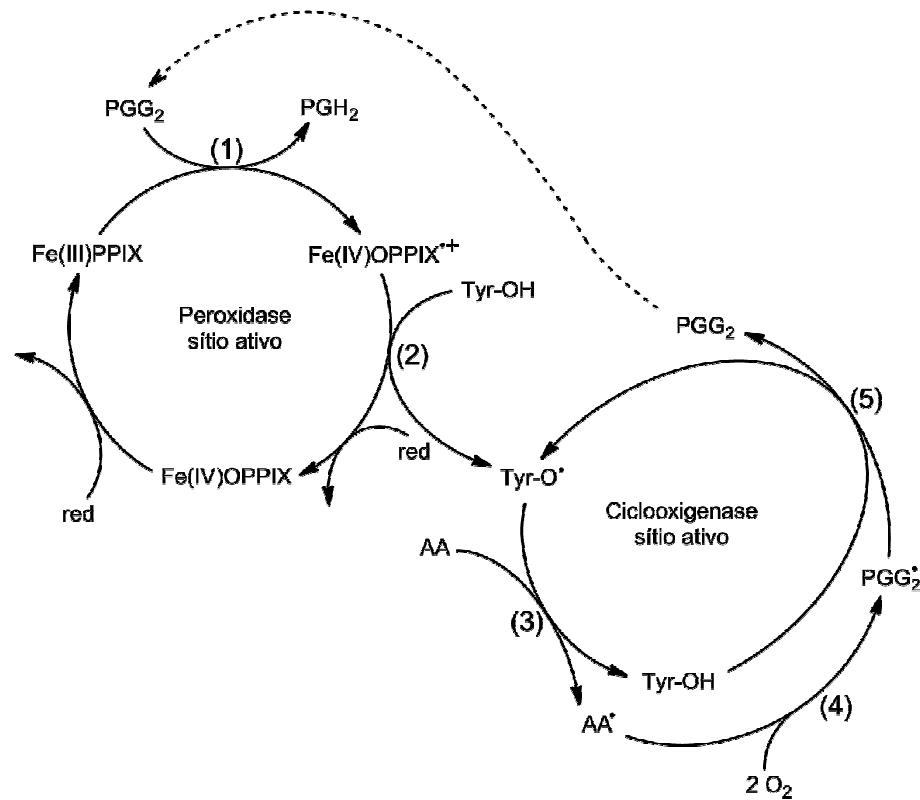


Figura 1.6 O mecanismo de cadeia ramificada da COX. (1) Ativação do ciclo peroxidase pela ação de um oxidante endógeno, na representação o PGG_2 , que oxida em dois elétrons o íon $Fe(III)$ da protoporfirina IX para formar o radical protoporfirina IX ferro-oxo (IV). (2) O sítio Cox é ativado através de uma reação de redução de um elétron entre o radical protoporfirina IX ferro-oxo (IV) e o resíduo Tyr385 para produzir o radical tirosil. (3) O hidrogênio pro(S) do C13 do ácido araquidônico presente no sítio Cox é abstraído pelo radical tirosil para produzir o radical araquidonil. (4) Reação do radical araquidonil com duas moléculas de oxigênio para a produção do radical peroxil prostaglandina G_2 . (5) A redução do radical peroxil leva a regeneração do radical tirosil e a produção de Prostaglandina G_2 . Na representação do ciclo peroxidase, *red* é a abreviação de composto redutor.

O ciclo catalítico completo da atividade peroxidase consiste de uma oxidação de dois elétrons do íon $Fe(III)$ da protoporfirina IX formando o radical protoporfirina IX ferro-oxo (IV), ($Fe(IV)OPPIX^{\bullet+}$) - Composto I, o qual é reduzido à forma catalítica inicial através de duas etapas sucessivas. Na primeira, o Composto I aceita um elétron do co-substrato para formar o segundo intermediário, o Composto II, que é convertido ao composto inicial por outra redução (DONK; TSAI; KULMACZ, 2002)

Embora a atividade ciclooxygenase seja dependente da oxidação do heme para gerar o radical tirosil, ela não necessita de sua participação contínua, pois o radical tirosil é regenerado em cada ciclo catalítico (KOSHKIN; DUNFOR, 1999; DONK; TSAI; KULMACZ, 2002).

1.1.5 Mecanismo molecular da inibição da COX-1 e 2 pelo AAS

O ácido acetilsalicílico (AAS) pertence a uma grande e importante classe de medicamentos conhecidos como anti-inflamatórios não esteroides (AINEs), cujas atividades anti-inflamatória e antipirética são alcançadas pelo bloqueio da biossíntese dos hormônios prostanóides ligados a processos inflamatórios. Esse bloqueio está diretamente ligado a inibição da atividade catalítica das isoformas da COX (VANE; BOTTING, 2003).

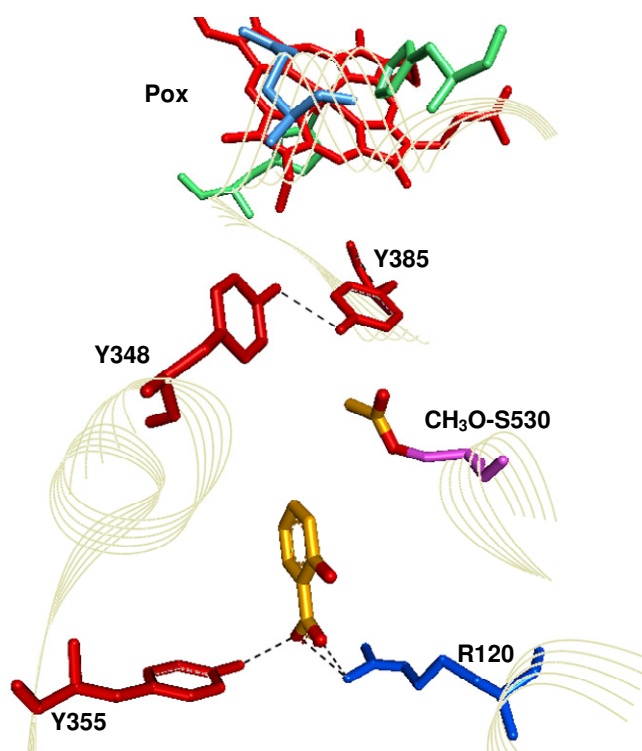


Figura 1.7 Resíduos que participam da reação de acetilação do resíduo Ser530 (rosa) no sítio ciclooxygenase da COX-1. Em destaque as interações do grupo carboxilato do ácido salicílico (ouro) com os resíduos Arg120 (azul) e Tyr355 (vermelho). As linhas tracejadas indicam ligações de hidrogênio ou pares de íons formados.

A inibição da COX-1 pelo AAS envolve a formação de uma ligação covalente com o resíduo Ser530 (Figura 1.7), que impossibilita ao substrato uma conformação produtiva dentro do sítio Cox (LOLL; PICOT; GARAVITO, 1995; KALGUTKAR et al., 1998). Esta inibição é classificada como inibição tempo dependente, pois a ligação covalente sofre hidrólise com o passar do tempo regenerando o sítio catalítico da COX a sua forma original (BARREIRO; FRAGA, 2008).

Na isoforma COX-1 a reação de transacetilação da Ser530 (Figura 1.8), ocorre com a participação de dois resíduos tirosina, Tyr385 e Tyr348, que funcionam como ativadores *push-pull* de uma reação de adição nucleofílica do resíduo Ser530 ao grupo acetila do AAS, que inativa a atividade ciclooxygenase da enzima (BARREIRO; FRAGA, 2008).

Bala et al. (2008), demonstrou que a acetilação da COX pela aspirina é regulada pela atividade catalítica peroxidase da COX. Os resultados dos experimentos sugerem que a acetilação ocorre de forma mais eficiente quando a concentração de hidroperóxidos, substrato da atividade peroxidase, é baixa. Demonstrou ainda, que em altas concentrações de peróxido, a formação do cátion radical ferril-oxo protoporfirina pode inibir a acetilação do radical Ser530.

Esses resultados sugerem que o estado protonado do resíduo Tyr385 é importante para que se estabeleça a rede de ligações de hidrogênio Tyr348-Tyr385 que facilita a reação de acetilação (Figura 1.8), posicionando o grupo acetil antes do ataque nucleofílico.

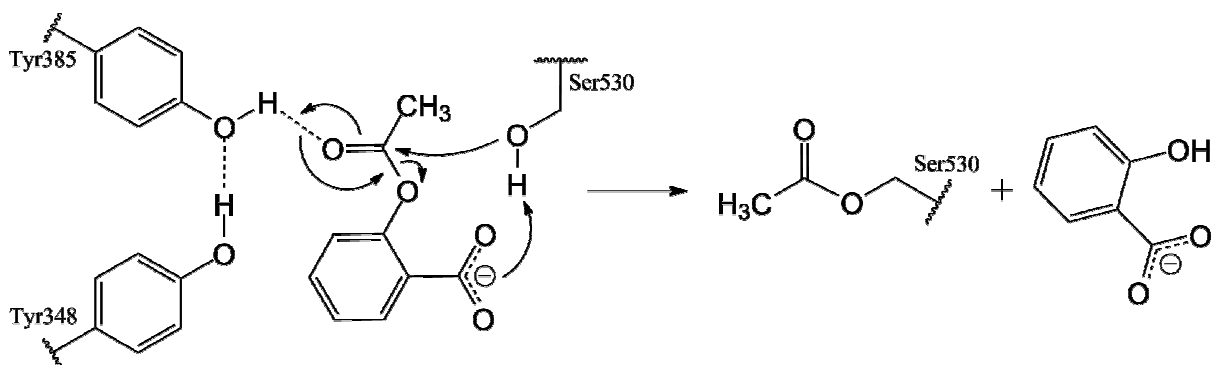


Figura 1.8 Mecanismo de ação proposto para a acetilação do resíduo Ser530 do sítio catalítico ciclooxigenase da COX (BARREIRO; FRAGA, 2008).

Na isoforma COX-2, também ocorre a acetilação da enzima, no entanto, em contraste com a isoforma COX-1, seu sítio Cox, mais volumoso, ainda é capaz de reconhecer o ácido araquidônico como substrato, mas deixa de sintetizar prostaglandinas e muda a

especificidade da reação quase que totalmente para a formação de 15*R*-HETE (XIAO et al., 1997; SCHNEIDER et al., 2002).

Schneider; Brash (2000), sugerem como explicação para essa especificidade, a possibilidade de que o grupo serina acetil force o realinhamento da extremidade omega da cadeia de carbonos do ácido araquidônico e provoque a racionalização da abstração do hidrogênio pro(*S*) do carbono C13, o que levaria ao bloqueio da síntese de prostaglandinas, e a formação de 15*R*-HETE como único produto enzimático.

1.2 Anti-inflamatórios não esteroides - AINEs

AINEs constituem uma importante classe de fármacos com várias aplicações terapêuticas. Seus efeitos anti-inflamatório, analgésico e antipirético são conhecidos há muitos séculos. Há cerca de 3.500 anos, os assírios usavam instruções deixadas em pedra pelos sumérios para tratar inflamações e aliviar a dor com extratos a base de folhas do salgueiro. Anotações deixadas pelos egípcios, datadas de cerca de 1500 a.C., conhecidas como papiro de Ebers, recomendavam o uso da infusão de folhas secas de murta e do salgueiro para o alívio de dores reumáticas. Hipócrates, na Grécia antiga, prescrevia extratos da casca do salgueiro para aliviar as dores do parto, para diminuir a febre e para aliviar processos inflamatórios (BAYER, 2010).

Todos esses fitoterápicos, preparados a partir de folhas de murta, casca e folhas do salgueiro, tem em comum a presença do ácido salicílico, composto responsável pelo efeito terapêutico dos mesmos.

A determinação da estrutura química do ácido salicílico, em 1859, e a sua síntese pelo professor Hermann Kolbe, no mesmo ano, abriu o caminho para que a sua produção em escala industrial possibilitasse a um maior número de pessoas o acesso aos seus benefícios terapêuticos. Seu preço de venda chegou a ser igual a um décimo do preço do material extraído a partir da casca do salgueiro (JACK, 1997; RINSEMA, 1999).

Anos depois, Felix Hoffmann, preocupado em diminuir os efeitos colaterais desagradáveis no trato gastrointestinal, provocados pela administração do ácido salicílico como medicamento, conseguiu em 1897, nos laboratórios de pesquisa da Bayer, a acetilação do grupo fenol do ácido salicílico obtendo o ácido acetilsalicílico em uma forma pura e estável (JACK, 1997; RINSEMA, 1999). Estava dado o primeiro passo para que em 1º de

fevereiro de 1899, o novo composto fosse registrado sob o nome de Aspirina[®] pela Bayer e se tornasse o precursor das novas gerações de medicamentos anti-inflamatórios não esteroides.

No entanto, mesmo sendo comercializada como um medicamento com propriedades analgésicas, antitérmicas e anti-inflamatórias, o mecanismo de ação da Aspirina[®] só viria a se tornar conhecido 74 anos depois da data de sua síntese.

Antes disso, Hart; Boardman (1963) divulgaram ao mundo a descoberta de um novo composto, a indometacina, que, segundo os autores, seria o primeiro medicamento não esteroide a apresentar resultados previsíveis e mensuráveis de redução no inchaço comum a casos de artrite reumatoide.

No início da década de 70, Vane (1971), avaliando a produção de prostaglandinas por uma preparação enzimática *in vitro* de células livres, concluiu que os medicamentos AINEs como a Aspirina[®] e a indometacina diminuem a formação de prostaglandinas e, propôs que o mecanismo de ação terapêutica desses medicamentos, bem como seus efeitos colaterais, estava relacionado à inibição da atividade da enzima COX.

Entretanto, mesmo com aumento da capacidade de desenvolver novas terapias anti-inflamatórias a partir da descoberta do mecanismo de ação dos AINEs, os efeitos adversos desses medicamentos continuavam a ser um obstáculo a ser vencido.

1.2.1 Coxibs

No início da década de 90, a descoberta da existência de dois subtipos da COX por Xie et al. (1991), criou grande expectativa quanto a possibilidade de novas abordagens para a solução do problema dos efeitos gastrointestinais adversos. Nessa época, a diferente distribuição dos subtipos de COX no organismo de mamíferos, levou a compreensão de que existia uma forma constitutiva, COX-1, que estaria sempre presente no corpo e seria responsável por funções fisiológicas importantes, e de uma outra forma, COX-2, que seria induzida como resposta a um processo inflamatório. Dessa maneira, os efeitos colaterais dos AINEs estavam relacionados com a inibição da COX-1.

Surgiu então, uma nova geração de fármacos específicos para a inibição da isoforma COX-2 designados por coxibs. O celecoxib, nome comercial Celebra[®], foi o primeiro fármaco deste grupo a ser lançado no mercado pela Pfizer Inc., seguido, logo após, pelo lançamento do rofecoxib, nome comercial Vioxx[®], pela Merck. Em um curto período de

tempo, somente nos 15 primeiros meses após o lançamento, os dois coxibs (celecoxib e rofecoxib) alcançaram o status de *blockbuster* e atingiram vendas superiores a um bilhão de dólares, nos Estados Unidos (RAO; KNAUS, 2008).

Os primeiros resultados clínicos relativos ao uso dos coxibs mostraram-se animadores, e estes nutriam a impressão de que todos os efeitos adversos relacionados à ação dos AINEs estavam resolvidos.

Estudos como o *Celecoxib Long-Term Safety Study* (CLASS), (SILVERSTEIN et al., 2000), e o *Vioxx Gastrointestinal Outcomes Research Study* (VIGOR), (BOMBARDIER et al., 2000) demonstraram que os coxibs são mais seguros que os inibidores não seletivos a nível gastrointestinal. Uma redução significativa dos efeitos colaterais tinha sido constatada.

Contudo, estudos posteriores viriam colocar em discussão o fundamento desta abordagem ao demonstrarem, como discutido anteriormente, que a COX-2 também desempenha um papel fisiológico importante. E ainda, outro aspecto não menos importante chamava a atenção: várias pesquisas começavam a correlacionar a administração de coxibs ao aumento de eventos cardiovasculares adversos.

Mukherjee, Nissen; Topol (2001), trabalhando com os coxibs, rofecoxib e celecoxib, determinou que o tratamento contínuo com rofecoxib (Vioxx[®]) implica em 2,38 vezes mais chances de desenvolver um evento cardiovascular trombótico do que com o naproxen. E que, embora os dados da pesquisa não demonstrem diferenças significativas entre o uso de celecoxib e outros AINEs, a taxa anual de infarto do miocárdio para ambos os inibidores COX-2 é maior do que no grupo placebo.

Solomon et al. (2004), complementa a pesquisa anterior, sugerindo que o alto risco de infarto agudo do miocárdio atribuído ao tratamento com rofecoxib pode ser relacionado a dosagens maiores do que 25 mg do medicamento.

Bresalier et al. (2005), pesquisando pacientes com histórico de adenomas colorretal, determinou que o uso de rofecoxib está associado com o aumento de risco cardiovascular (infarto do miocárdio e acidente vascular cerebral isquêmico), evidenciado após 18 meses de tratamento.

Solomon et al. (2005), pesquisando o risco cardiovascular associado ao uso do celecoxib na prevenção de adenoma colorretal, chegou a dados que permitiram correlacionar o aumento das dosagens do medicamento ao aumento proporcional do risco de morte por

causas cardiovasculares, infarto do miocárdio, acidente vascular cerebral ou insuficiência cardíaca.

A repercussão de pesquisas como as citadas fizeram com que, em setembro de 2004, o medicamento Vioxx[®] da Merck & Co. fosse retirado do mercado mundial pelo próprio fabricante (MERCK, 2004). Menos de um ano após, em abril de 2005, o comitê consultivo da *Food and Drug Administration* (FDA), agência do Departamento de Saúde e Serviços Humanos do governo dos Estados Unidos da América responsável por proteger e promover a saúde pública através da regulação e supervisão de produtos farmacêuticos entre outros (U.S.FDA, 2011), concluiu que a maioria dos coxibs aumenta o risco de eventos cardiovasculares e recomendou a suspensão do Bextra[®] (valdecoxib), da Pfizer. Quanto ao Celebrex[®] (celecoxib), este foi autorizado a permanecer no mercado, mas com uma tarja preta indicando o risco de eventos cardiovasculares adversos. Além dessas decisões, a FDA pediu aos fabricantes dos AINEs mais utilizados para que realizassem alterações na rotulagem de seus produtos, sugerindo que eventos cardiovasculares pode ser um efeito geral para esta classe de compostos (RAO; KNAUS, 2008), representados na Figura 1.9.

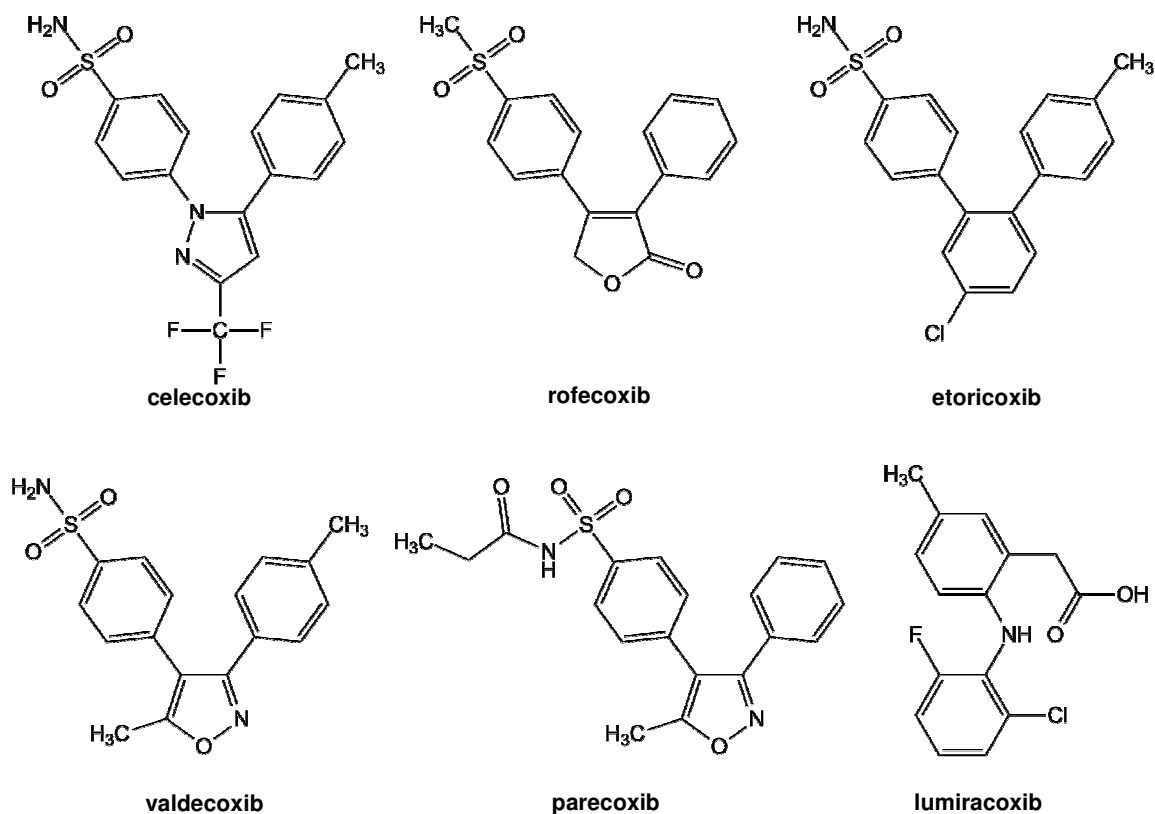


Figura 1.9 Exemplos de fármacos anti-inflamatórios de segunda geração, inibidores seletivos de COX-2.

A rapidez com que inibidores seletivos de COX-2 têm sido descobertos, bem como os avanços no desenvolvimento de novas abordagens para o desenvolvimento de terapias anti-inflamatórias, em grande parte podem ser atribuídos à abordagem racional no desenho de compostos líderes candidatos a fármacos. No entanto, os efeitos colaterais cardiovasculares associados a inibidores seletivos de COX-2 colocam em destaque as muitas dificuldades que ainda precisam ser vencidas para que se tenham soluções terapêuticas mais adequadas e eficientes.

1.3 Planejamento racional de fármacos

O processo de descoberta e desenvolvimento de novos medicamentos pelas indústrias farmacêuticas tem sofrido profundas mudanças ao longo dos anos. Se no início dos anos 50 até o final dos anos 80, o Químico Medicinal e o Farmacologista eram os pilares dos programas de pesquisa de fármacos, nos dias atuais as estratégias de modificação molecular e os princípios racionais do processo de desenvolvimento e otimização de um composto líder são cada vez mais comuns.

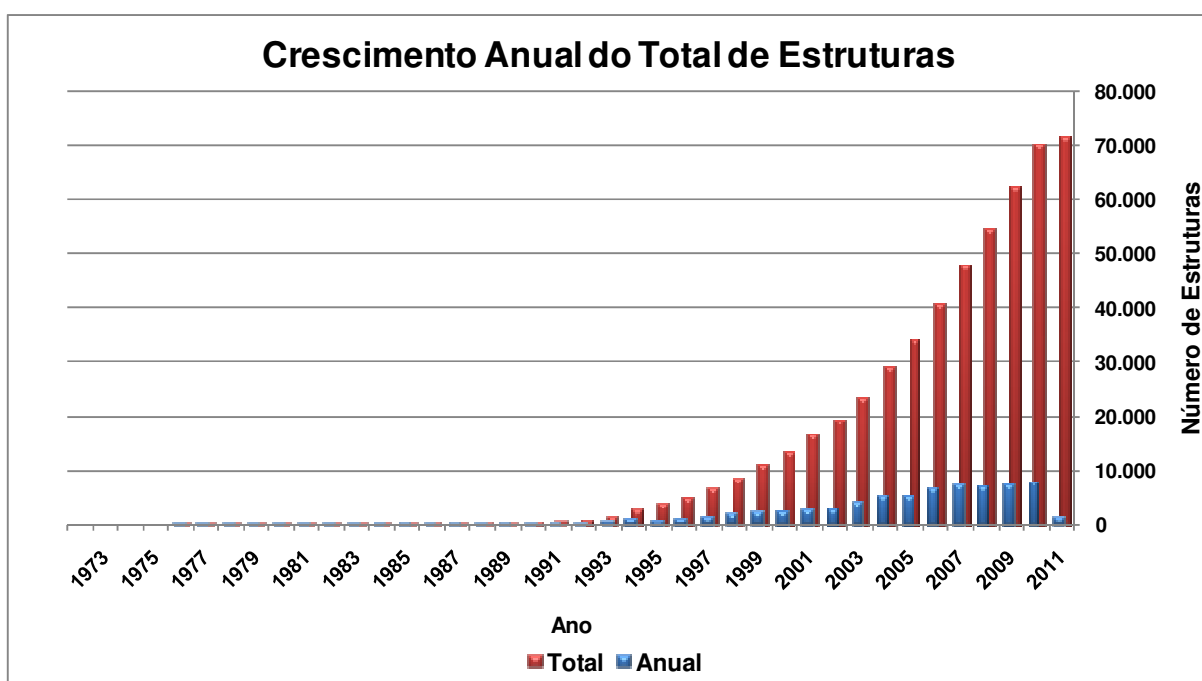


Figura 1.10 Crescimento anual do número de estruturas depositadas no *Protein Data Bank* desde o ano de 1972 até 8 de março de 2011. Em azul o total de estruturas depositadas no ano e em vermelho o total geral (RCSB, 2011).

Essa mudança paradigmática foi impulsionada pelo contínuo avanço nas tecnologias analíticas, sintéticas, de caracterização estrutural e, principalmente, pela rápida evolução da capacidade de processamento dos computadores, de armazenamento de dados e pela universalização desses dados. Bancos de dados como o *Protein Data Bank* (PDB) - banco de dados de estruturas de proteínas, ácidos nucleicos e seus complexos, e o *GenBank*[®] - banco de dados de sequências de nucleotídeos, ambos vinculados ao *National Center for Biotechnology Information* (NCBI), têm proporcionado importante fonte primária de informações à comunidade científica em geral (BENSON et al., 2008).

A indústria farmacêutica, talvez seja um dos principais exemplos de uma indústria baseada na ciência, onde a inovação, na forma de um novo composto líder ou a imitação e/ou melhoria do já existente, é a fonte fundamental da competitividade que determina a dinâmica de crescimento e declínio das firmas concorrentes (BOTAZZI et al., 2001).

Em 2003, os custos para o desenvolvimento de novos fármacos estavam estimados em 802 milhões de dólares nos EUA (DiMASI; HANSEN; GRABOWSKI, 2003). Grande parte desses custos está relacionada com a purificação, caracterização e síntese dos princípios ativos, e com os testes dos compostos, sintéticos ou naturais, em ensaios que demandam uma grande diversidade de material biológico.

Algumas dessas etapas são necessárias para confirmar a eficácia e segurança dos candidatos a fármacos e não podem ser menosprezadas, outras, no entanto, podem ser otimizadas a partir de uma abordagem mais racional para a identificação e refinamento de compostos candidatos a fármacos.

A compreensão das interações moleculares que ocorrem entre os alvos terapêuticos (receptor) e os fármacos (ligante) através de métodos computacionais baseados nas estruturas tridimensionais das moléculas envolvidas pode ser uma alternativa, relativamente menos onerosa, quando comparada com metodologias tradicionais. Visualização molecular, *screening* virtual, modelagem por homologia, modelagem por mecânica ou dinâmica molecular, construção de ligantes a partir da troca de fragmentos moleculares menores (bioisosterismo) ou pela reunião de características estruturais de dois compostos bioativos (hibridação molecular), e metodologias de docking são algumas das possíveis ferramentas que podem ser utilizadas no planejamento, descoberta e melhoria de compostos líderes (BARREIRO; FRAGA, 2008).

1.3.1 Docking molecular

Docking molecular é usualmente definido como uma técnica que permite a predição da estrutura do complexo formado por um receptor, normalmente uma proteína, um monômero da proteína ou um segmento de DNA, e um ligante, normalmente uma molécula pequena ou uma outra proteína (BROOIJMANS; KUNTZ, 2003).

Devido ao sucesso alcançado na fase inicial de sua utilização, como ferramenta para prever e reproduzir complexos proteína-ligante, e ao fato de ser uma alternativa rápida, barata e de alto rendimento, a exploração do docking molecular, em tempos recentes, tem sido associada à descoberta, ao melhoramento e a otimização de compostos líderes, *screening* virtual em extensos bancos de dados de moléculas, e ainda, ao design de bibliotecas virtuais de compostos através de técnicas *in silico* associadas à química combinatória (BROOIJMANS; KUNTZ, 2003; KITCHEN et al. 2004; CORBEIL; MOITESSIER, 2009).

Um programa de docking molecular qualquer, será sempre dependente de duas peças chave para a obtenção do sucesso em seu objetivo: um **algoritmo de busca** dos graus de liberdade configuracionais e conformacionais possíveis para a formação do complexo e uma **função *fitness*** ou função de ajuste, capaz de buscar o melhor cenário de energia potencial, avaliando a complementaridade estérica e química entre o ligante e o receptor em detalhe suficiente para encontrar o mínimo global de energia para o complexo formado (BROOIJMANS; KUNTZ, 2003).

No cálculo de docking rígido, o algoritmo de busca explora diferentes posições para o ligante no sítio ativo do receptor utilizando os graus de liberdade possíveis para translação e rotação do mesmo. No cálculo de docking flexível para o ligante, é acrescentado ao processo, a exploração dos graus de liberdade de torção do ligante.

Para o tratamento da flexibilidade do ligante, três categorias básicas para os cálculos são normalmente consideradas: **métodos sistemáticos** (construção incremental, busca conformacional, base de dados), **métodos aleatórios ou estocásticos** (Monte Carlo, algoritmos genéticos, busca tabu), e **métodos de simulação** (dinâmica molecular, minimização de energia) (KITCHEN et al. 2004).

A função *fitness* é um componente de extrema importância para o sucesso do docking molecular, sendo a responsável pela classificação do conjunto de resultados (scores) apresentado pelo programa como soluções para o cálculo realizado. As funções *fitness* mais

comuns estão categorizadas em três tipos: **baseada em campo de força**, **empírica** e **baseada no conhecimento**. (HUANG; GRINTER; ZOU, 2010)

Dentre os programas de docking que têm demonstrado uma melhor acurácia e precisão na previsão dos modos de ligação entre o sítio receptor e o ligante, destacam-se o Glide e o GOLD (KONTOYIANNI; MCCLELLAN; SOKOL, 2004; CUMMINGS et al., 2005; CORBEIL; MOITESSIER, 2009; LI et al., 2010), programa utilizado neste trabalho, e que utiliza um Algoritmo Genético (AG) associado a cálculos baseados em campo de força para elencar seus resultados (JONES et al. 1997).

1.3.1.1 Algoritmo genético

Algoritmos genéticos imitam o processo de seleção natural ao simularem características importantes que orientam a evolução dos organismos vivos. Embora apresentem muitas variações na atualidade, eles possuem um esqueleto principal, mais ou menos comum a todos, que pode ser utilizado tanto para a resolução de problemas como para a modelagem de sistemas evolutivos (JONES; WILLETT; GLEN, 1995; SOLMAJER; ZUPAN, 2004).

A ideia básica de um algoritmo genético envolve cinco passos: codificação das variáveis, criação da população inicial, avaliação da resposta, cruzamento e mutação. Primeiro, uma população de indivíduos é criada (normalmente armazenada como *strings* binários na memória do computador), e posteriormente passa por um processo evolutivo com o uso dos princípios de variação, seleção e herança (COSTA FILHO; POPPI, 1999).

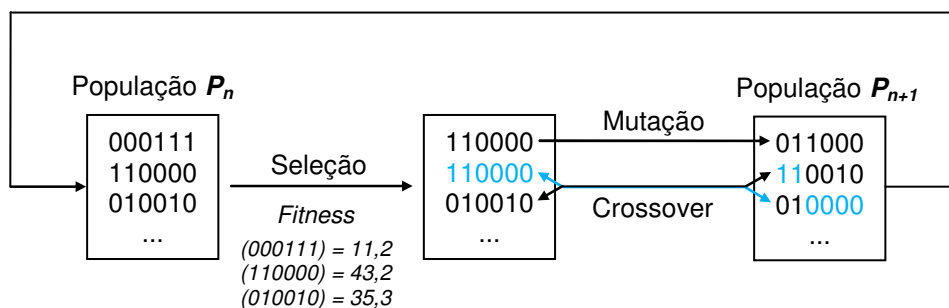


Figura 1.11 Funcionamento básico de um algoritmo genético. A população inicial P_n de indivíduos é classificada pela função de *fitness* e dois indivíduos são selecionados. Em seguida, a aplicação dos operadores genéticos (mutação e crossover) nos indivíduos com os melhores escores de aptidão, resulta em uma nova população P_{n+1} de indivíduos.

Na sua forma mais simples, representada na Figura 1.11, cada indivíduo da população é representado por uma sequência de dígitos binários (*bits*) ou cromossomo. Por analogia com sistemas biológicos, a sequência dos bits é chamado de "genótipo", sendo que, cada posição de bit (definido como 1 ou 0) representa um gene do cromossomo (FORREST, 1993).

A população inicial de indivíduos, normalmente, é gerada aleatoriamente e cada indivíduo é testado empiricamente no "ambiente" definido pelo usuário e é atribuída a ele uma avaliação numérica do seu mérito por uma função *fitness* (de ajuste), que retorna um número (score) único, onde, geralmente, os números mais altos são atribuídos aos indivíduos mais aptos. A função de ajuste determina como cada gene (*bit*) do indivíduo será interpretado e, dessa forma, qual problema específico a população irá evoluir para resolver.

Depois que os indivíduos da população foram avaliados, estes são selecionados pela eliminação dos indivíduos da população com baixos valores para a função de ajuste, fazendo com que, somente os indivíduos mais aptos transmitam seus genes. Operadores genéticos, como mutação (inversão de bits individuais) e crossover (troca de subsequências de dois indivíduos para obter duas descendências) são aplicados probabilisticamente aos indivíduos selecionados, produzindo uma nova população (ou geração) de indivíduos (FORREST, 1993).

Quando este ciclo de avaliação, seleção e operações genéticas é aplicado por muitas gerações, a aptidão total da população final, geralmente melhora, e os indivíduos dessa população representam "soluções" otimizadas para qualquer problema que tenha sido proposto na função de ajuste.

1.3.1.2 O programa GOLD (*Genetic Optimisation for Ligand Docking*)

GOLD é o resultado do projeto de colaboração entre a Universidade de Sheffield, o *Cambridge Crystallographic Data Centre* (CCDC) e a Glaxo Wellcome.

O programa GOLD está baseado num algoritmo genético (AG) idealizado para realizar o docking de ligantes em sítios de ligação de proteínas (CCDC, 2011).

Para explorar as possíveis formas de ligação do ligante, o algoritmo genético do GOLD modifica todos os ângulos diedros das ligações rotacionáveis do ligante, as geometrias para o anel do ligante, os ângulos diedros dos grupos OH dos resíduos, serina,

treonina, e tirosina e NH_3^+ das lisinas e o posicionamento do ligante no sítio de ligação (JONES et al. 1997; VERDONK et al., 2004).

Inserida as coordenadas tridimensionais da proteína e do ligante, e do espaço de busca (origem e raio) no GOLD, uma população inicial de poses (conformação e orientação) do ligante é gerada aleatoriamente, sendo atribuído a cada indivíduo (ou cromossomo) da população um escore de ajuste com base na previsão de afinidade deste com o espaço de busca delimitado pelo usuário (sítio de ligação). Funções *fitness*, entre elas, GoldScore, ChemScore e ASP, são executadas no GOLD, individualmente ou em conjunto, para essa finalidade,.

Cada cromossomo da população codifica uma conformação interna do ligante e do sítio ativo da proteína, incluindo o mapeamento dos locais de ligações de hidrogênio do ligante e do sítio da proteína baseado em átomos aceptores e átomos doadores de ligação de hidrogênio. Para posicionar o ligante no sítio ativo da proteína, na decodificação de um cromossomo o AG utiliza um processo de ajuste de mínimos quadrados de tal forma que, muitas das ligações de hidrogênio sugeridas pelo mapeamento são formadas. Sendo assim, a aptidão de um cromossomo decodificado é uma combinação do número e da força das ligações de hidrogênio que foram formadas no processo e da energia de van der Waals do complexo ligado (JONES; WILLETT; GLEN, 1995).

Após ser formada a população inicial, toda a população de cromossomos é então otimizada iterativamente através dos operadores genéticos, mutação e crossover, e de operações de migração entre nichos e ilhas, sendo todo o processo controlado por parâmetros como: tamanho da população, pressão seletiva, número de operações, número de ilhas, tamanho do nicho, e os pesos dados aos operadores de crossover, de mutação e de migração. (LI et al., 2010) A cada ciclo do AG a população gerada é avaliada pela função de ajuste (*fitness*) e classificada para selecionar os indivíduos de maior aptidão.

Conforme descrito por Jones; Willett; Glen, (1995), a atuação do AG na busca de uma solução aceitável para o problema proposto pode ser descrita nas sete etapas a seguir:

1. Um conjunto de operadores de reprodução é escolhido e atribuído a cada um deles um peso;
2. Uma população inicial é criada aleatoriamente e a aptidão de seus membros é determinada pela função *fitness*;
3. Um operador é escolhido através de cálculos de probabilidade baseados nos pesos dos operadores;

4. Os pais exigidos pelo operador são escolhidos através de seleção com base na escala de aptidão dos indivíduos da população;
5. O operador é aplicado e cromossomos filhos são produzidos e sua aptidão é avaliada pela função *fitness*;
6. Se ainda não estiver presente na população, os filhos substituem os membros menos aptos, ajustando a população;
7. Se uma solução aceitável foi encontrada o processo para, do contrário volta para a etapa 3.

Ao final dos cálculos de docking, obtém-se como saída (resultado) as poses (conformação e orientação) dos ligantes testados inseridos no sítio de ligação, nos complexos formados.

Como citado anteriormente, o GOLD pode utilizar várias funções para determinar a aptidão entre ligante e sítio de ligação no desenvolvimento do AG, sendo o GoldScore, a função *fitness* original do programa, descrita basicamente pelos termos:

$$GoldScore = S_{hb_ext} + 1,375 S_{vdW_ext} + S_{hb_int} + S_{vdW_int} \quad (1.1)$$

onde S_{hb_ext} é o escore da energia das ligações de hidrogênio proteína-ligante, S_{vdW_ext} é o escore das energias de van der Waals proteína-ligante, S_{hb_int} é a contribuição para o ajuste devido a ligações de hidrogênio intramoleculares do ligante - este termo está desligado em todos os cálculos apresentados neste trabalho, e S_{vdW_int} é a contribuição devido à tensão intramolecular do ligante.

O termo S_{vdW_ext} é multiplicado por um fator de 1,375 quando a pontuação total da aptidão é computada. Trata-se de uma correção empírica para incentivar os contatos hidrofóbicos entre a proteína e o ligante.

O escore final de cada resultado encontrado pela função *fitness* é o negativo da soma dos termos que a compõem, de modo que os escores de maior valor (maior aptidão) tendem a serem os melhores para prever a posição de ligação do ligante no sítio.

O GOLD usa formas funcionais do potencial de Lennard-Jones para as contribuições de Van der Waals na função *fitness*. Por padrão, um potencial 6-12 é aplicado para a contribuição de Van der Waals interna (S_{vdW_int}) e um potencial de 4-8 é aplicado para a contribuição de Van der Waals externa (S_{vdW_ext}), sendo possível variar esse valor.

Para um par de átomos i e j localizados em r_i e r_j , o cálculo para a energia potencial de van der Waals modelada por uma função Leonard-Jones 6-12 é realizada como mostrado na equação 1.2:

$$E_{vdW}(r) = \sum_{j=1}^N \sum_{i=1}^N 4\varepsilon \left[\left(\frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}} \right)^{12} - \left(\frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}} \right)^6 \right] \quad (1.2)$$

onde $r_{ij} \equiv |r_i - r_j|$, o parâmetro ε especifica a intensidade da interação e o σ define a distância finita onde o potencial é nulo. O termo de expoente 12 é responsável pela repulsão de pequena distância, enquanto o de expoente 6 prevê um termo atrativo que se aproxima de zero, com o aumento da distância entre os dois átomos (KITCHEN et al., 2004).

Os parâmetros empíricos utilizados na função *fitness* (energia e direcionalidade da ligação de hidrogênio, raio de átomos, polarizabilidade, potenciais de torção, etc.) são obtidos do arquivo de parâmetros do GOLD independentemente da função utilizada.

1.3.1.3 Interações envolvidas no reconhecimento molecular

Do ponto de vista qualitativo, o grau de afinidade e a especificidade da ligação fármaco-sítio receptor são determinadas por interações intermoleculares. Estas interações, não covalentes, incluem, entre muitas outras, ligações de hidrogênio, forças de van der Waals, interações eletrostáticas e interações hidrofóbicas (BRANDL et al., 2001).

Para se definir os tipos de interação que ocorrem entre duas moléculas, podemos considerar que a interação total entre as mesmas, de modo aproximado e sem o uso da mecânica quântica, sempre estará dividida em diferentes termos com um significado físico, de acordo com a equação 1.3 abaixo, onde a maior contribuição energética de um determinado termo classifica o tipo de interação predominante.

$$E_{interação} = E_{eletrostática} + E_{indução} + E_{dispersão} + E_{repulsão} \quad (1.3)$$

Na Tabela 1.1, a seguir, são apresentadas as interações eletrostáticas simples e combinadas importantes para o reconhecimento molecular entre o ligante e o sítio receptor.

Tabela 1.1 Interações eletrostáticas.

Simples		
Categoria	Equação potencial ^(a)	Energia aproximada
Íon - Íon	$\frac{q_1 q_2}{4\pi\epsilon_0} \cdot \frac{1}{r}$	25 kJ.mol ⁻¹
Íon - Dipolo permanente	$-\frac{q^2 p^2}{(4\pi\epsilon_0)} \cdot \frac{1}{kTr^4}$	50-200 kJ.mol ⁻¹
Dipolo permanente - Dipolo permanente (Forças de Keesom)	$-\frac{2}{3} \frac{p_1^2 p_2^2}{(4\pi\epsilon_0)^2} \cdot \frac{1}{kTr^6}$	50-500 kJ.mol ⁻¹
Dipolo permanente - Dipolo induzido	$-\frac{p^2 \alpha_p}{(4\pi\epsilon_0)^2} \cdot \frac{1}{r^6}$	< 5 kJ.mol ⁻¹
Dipolo induzido - Dipolo induzido (Forças de dispersão ou Forças de London)	Sempre presente Atrativas e varia com 1/r ⁶ Origem mecânica quântica	< 5 kJ.mol ⁻¹
Forças repulsivas	Sempre presente Origem mecânica quântica Repulsão derivada da sobreposição das nuvens eletrônicas	
Combinada		
Ligação de hidrogênio	Entre H e átomos com baixa eletronegatividade Entre H e átomos com alta eletronegatividade (Entre o H parcialmente positivo e elétrons em ligação dupla/tripla)	4-60 kJ.mol ⁻¹
Envolvendo sistemas π	Face-a-face Ponta-a-face em forma de T Faces paralelas-deslocadas Cátion-π	5-80 kJ.mol ⁻¹ e 0-50 kJ.mol ⁻¹

(a) q_i é a carga do íon i ; p_i o momento de dipolo do dipolo i ; α_p a polarizabilidade; r a distância entre os objetos; k a constante de Boltzmann; ϵ_0 a permissividade do espaço livre; T é a temperatura; o subscrito i é omitido quando não necessário.

* Adaptado de Ermondi; Caron (2006).

Interações de van der Waals incluem interações do tipo dipolo permanente-dipolo permanente, dipolo permanente-dipolo induzido e dipolo induzido-dipolo induzido. Estas interações ocorrem entre todos os átomos, e são resultado de um complexo fenômeno mecânico-quântico que, de maneira simplificada, pode ser descrito como uma assimetria transitória na distribuição eletrônica em torno de um átomo que induz uma assimetria

complementar no átomo adjacente, resultando em uma força atrativa entre eles (CARACELLI; ZUKERMAN-SCHPECTOR, 2006).

As interações hidrofóbicas ocorrem em função da presença de cadeias ou subunidades não polares, tanto no sítio receptor como no ligante. Normalmente estas cadeias ou subunidades encontram-se organizadamente solvatadas por camadas de moléculas de água. A aproximação dessas superfícies hidrofóbicas entre si promove o colapso da estrutura organizada das moléculas de água, favorecendo a interação ligante-receptor à custa do ganho entrópico associado à desorganização do sistema (BARREIRO; FRAGA, 2008; VOET; VOET; PRATT, 2008).

As ligações de hidrogênio são as mais importantes interações não covalentes em sistemas biológicos, sendo em grande parte responsáveis pela manutenção das conformações bioativas de proteínas (α -hélices e folhas β), além de serem responsáveis pelas notáveis propriedades físico-químicas da água. Os termos que mais contribuem energeticamente para sua estabilidade são a energia eletrostática e uma reduzida troca de energia de repulsão (BRANDL et al., 2001).

A ideia de que um único átomo de hidrogênio poderia manter vínculo simultâneo com outros dois átomos foi proposto formalmente por Latimer e Rodebush (1920) e seu orientador, G. N. Lewis. O trabalho teve a colaboração de M. L. Huggins que também havia descrito a ligação de hidrogênio em sua dissertação, em 1919 (GILLI, 2006).

A *International Union of Pure and Applied Chemistry* (IUPAC) através da Recomendação Provisória fruto do Relatório Técnico vinculado ao projeto: "Categorização da ligação de hidrogênio e outras interações intermoleculares", desenvolvido pelo grupo de trabalho liderado pelo professor E. Arunan definiu a ligação de hidrogênio assim:

A ligação de hidrogênio é uma interação atrativa entre um átomo de hidrogênio de uma molécula ou um fragmento molecular X-H em que X é mais eletronegativo do que H e um átomo ou um grupo de átomos da mesma ou de uma molécula diferente, em que há evidências da formação de ligação (IUPAC, 2010a).

No desenvolvimento do texto da Recomendação Provisória (IUPAC, 2010b), são detalhados os parâmetros que estão implícitos na definição acima.

Segundo Desiraju (2011), mesmo considerando que a investigação sobre as ligações de hidrogênio, o que elas são, e o que eles podem fazer já se arrastem por quase cem

anos, e que atualmente, já se tenha uma grande compreensão desse tipo de interação, é provável que a definição proposta pela IUPAC ainda não seja a definitiva. Para o autor, as ligações de hidrogênio clássicas ($\text{N-H}\cdots\text{O}$, $\text{O-H}\cdots\text{O}$, $\text{O-H}\cdots\text{X}$, $\text{F-H}\cdots\text{F}$, ...) não apresentam problemas e sempre vão estar inseridas em todas as definições, mesmo nas que remetem aos primeiros tempos. Entretanto, mudanças poderão ocorrer em relação ao entendimento das interações mais fracas e mais complexas ($\text{C-H}\cdots\text{O}$, $\text{C-H}\cdots\text{N}$, $\text{O-H}\cdots\pi$, $\text{N-H}\cdots\pi$, e $\text{C-H}\cdots\pi$) e que progressivamente foram aceitas como ligações de hidrogênio.

Embora a interação $\text{C-H}\cdots\pi$ seja fraca (cerca de $4 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$), a possibilidade de que muitos grupos CH participem na interação com sistemas π , aumentando a energia total, aliada ao fato de que esse tipo de interação persiste, mesmo em meios polares tais como a água, deixam evidente que tais interações podem ter um papel importante para a estabilidade estrutural de macromoléculas orgânicas (SHANTHI; RAMANATHAN; SETHUMADHAVAN, 2010).

Para a identificação de ligações de hidrogênio clássicas, a determinação de valores entre 110° e 180° para o ângulo formado entre o doador X, o átomo de hidrogênio e o acceptor Y, e de distâncias entre $2,5 \text{ \AA}$ e $3,3 \text{ \AA}$ entre o doador X e o acceptor Y são, normalmente, suficientes para a identificação das mesmas (GOHLKE; KLEBE, 2002). Entretanto, para a identificação das interações desse tipo que envolvem sistemas aromáticos, outros parâmetros geométricos são necessários.

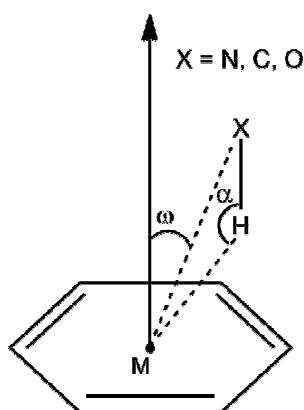


Figura 1.12 Parâmetros geométricos utilizados para identificar as interações $\text{X-H}\cdots\pi$. O anel (de cinco membros ou seis membros) é representado como anel aromático. M é o centro geométrico do sistema π por onde passa a normal perpendicular ao plano do anel. α é o ângulo entre os segmentos \overline{XM} e \overline{HM} . ω é o ângulo entre o segmento \overline{XM} e a normal do anel. X-H é o grupo doador da ligação de hidrogênio, onde X pode ser o átomo de C, N ou O (STOJANOVIC et al., 2007; SHANTHI; RAMANATHAN; SETHUMADHAVAN, 2010).

Na determinação das ligações de hidrogênio tipo X–H··· π (Figura 1.12), os valores dos ângulos α e ω devem ser, maior ou igual a 120° e menor ou igual a 30° , respectivamente. Para a distância X–M os valores mais aceitos estão abaixo de $4,5 \text{ \AA}$, sendo $3,3 \text{ \AA}$ o valor que associa maior contribuição energética a interação (maior que $4,0 \text{ kJ.mol}^{-1}$) (BRANDL et al., 2001; STOJANOVIC et al., 2007; SHANTI; RAMANATHAN; SETHUMADHAVAN, 2010).

Considerada algumas vezes como uma ligação iônica "não convencional", a interação cátion- π apresenta características predominantemente eletrostáticas, com energias de interação calculadas *ab initio* na fase gasosa variando de 10 a 22 kcal.mol^{-1} , aproximadamente. Estatisticamente, nesse tipo de interação, os grupos carregados amino (δ^+) dos resíduos de lisina, arginina e histidina encontram-se a distâncias menores que $6,0 \text{ \AA}$ dos centroides dos resíduos de fenilalanina, tirosina e triptofano, nas estruturas cristalográficas de proteínas, sendo preferenciais as distâncias situadas entre os valores de $3,4$ e $6,0 \text{ \AA}$ (BURLEY; PETSKO, 1986; SCRUTTON; RAINE, 1996; MA; DOUGHERTY, 1997).

Interações entre resíduos aromáticos são consideradas de grande importância para a estabilidade estrutural e térmica em proteínas e ácidos nucleicos (KANNAN; VISHVESHWARA, 2000; GEORIS et al., 2000; BOEHR et al, 2002; TEWARI; DUBEY, 2008).

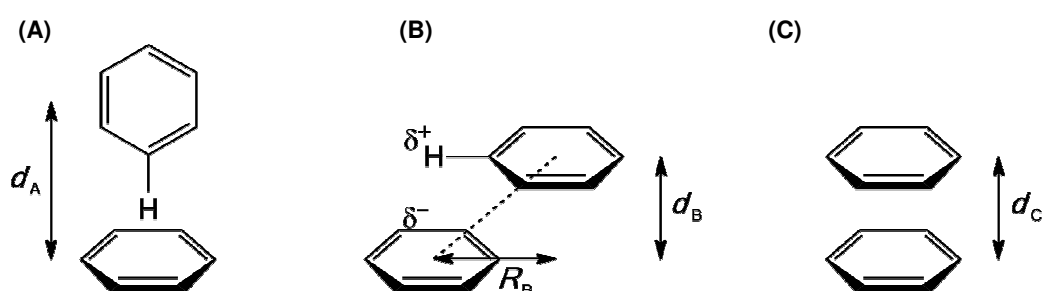


Figura 1.13 Representações de interações entre anéis de benzeno. (A) Geometria ponta-a-face em forma de T (*T-shaped edge-to-face*). (B) Geometria de faces paralelo-deslocadas (*parallel-displaced*). (C) Geometria face-a-face (*face-to-face*).

Os valores geométricos que descrevem os arranjos mais estáveis, (A) e (B) da Figura 1.13, determinados experimentalmente por Meyer, Castellano e Diederich (2003), apresentam o valor para a distância d_A , entre os centroides dos anéis, igual a $4,96 \text{ \AA}$, estando o átomo de hidrogênio com carga parcial positiva apontando perpendicularmente para o centro

parcialmente carregado negativamente do segundo anel. Entre os anéis aromáticos deslocados paralelamente, à distância interplanar d_B varia de 3,4 a 3,6 Å, e o deslocamento lateral R_B de 1,6 a 1,8 Å, o que denota uma distância entre os centroides dos dois anéis da ordem de 4,0 Å.

De modo geral, respeitando-se as geometrias propostas na Figura 1.13, distâncias entre os centroides de anéis aromáticos situadas no intervalo de 3,4 Å a 7,0 Å são um indicativo da presença de interações π - π (BURLEY; PETSKO, 1985; McGAUGHEY; GAGNÉ; RAPPÉ, 1988).

1.4 Objetivos

Estudar e compreender os mecanismos envolvidos nas interações entre macromoléculas (proteínas, DNA e outras) e pequenas moléculas (ligantes) tem sido um dos grandes desafios no planejamento de moléculas candidatas a fármaco.

Grande parte desse desafio é fruto das inter-relações necessárias entre as diversas áreas do conhecimento (química supramolecular, bioquímica de sistemas biológicos, farmacologia, bioinformática, entre outras) envolvidas neste tipo de estudo.

Para delimitar e direcionar as abordagens possíveis em um trabalho dessa natureza, os objetivos expostos a seguir foram traçados.

Objetivo geral

Estudar os complexos formados por cálculos de docking entre a enzima COX-2 e as moléculas pesquisadas e propor quais as características químicas e estruturais a serem consideradas para o planejamento, desenvolvimento e melhoramento de candidatos a fármaco a partir dos ligantes contemplados nesse trabalho.

Objetivos específicos

- analisar e entender os mecanismos moleculares e estruturais envolvidos na formação dos complexos proteína-ligante;
- obter modelos tridimensionais enzima-ligantes;
- estabelecer relações entre estrutura molecular e atividade do ligante;

- correlacionar os mecanismos de interação envolvidos na formação dos complexos com os dados experimentais disponíveis na bibliografia utilizada (WUEST et al., 2009; KANG et al., 2009);
- buscar mecanismos comuns aos grupos de ligantes estudados;
- determinar características estruturais favoráveis dos ligantes.

CAPÍTULO 2

Materiais e Métodos

Neste capítulo são apresentados os materiais e métodos utilizados no trabalho, descritos de forma a qualificar a importância relativa dos mesmos em cada etapa do estudo.

Os estudos por simulação computacional de docking molecular permitem obter o melhor ajuste entre duas estruturas tridimensionais, tornando possível prever a estrutura de complexos e/ou adutos formados entre macromoléculas, o receptor, e outra molécula (inibidor, substrato, etc.), o ligante. No caso presente, entre a proteína COX-2 (o receptor) e os ligantes selecionados por demonstrarem capacidade *in vitro* de inibir a atividade ciclooxigenase da proteína.

As etapas contempladas no estudo de docking realizado neste trabalho estão representadas na Figura 2.1 abaixo:

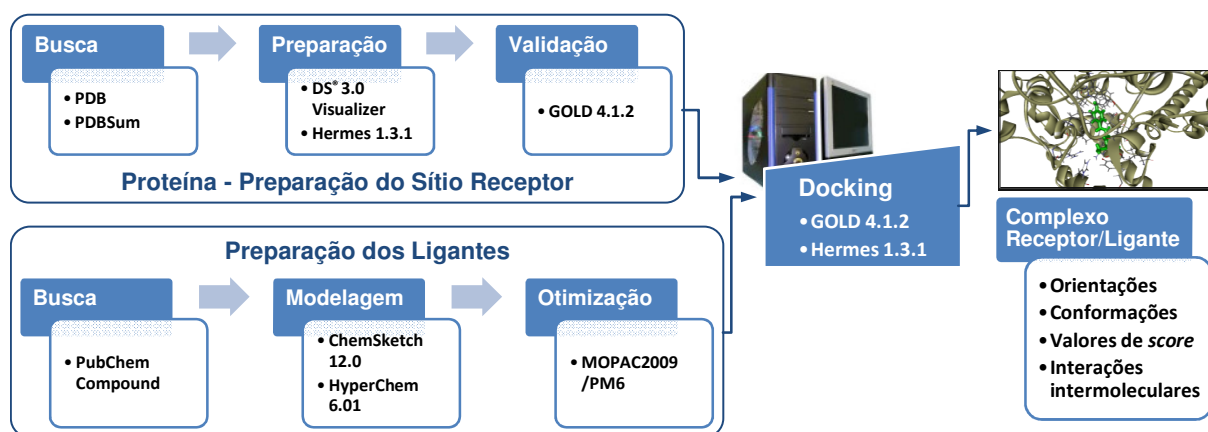


Figura 2.1 Representação esquemática das etapas do trabalho.

Como pode ser observado na Figura 2.1, os cálculos de docking são uma etapa importante da simulação computacional, no entanto não representam todo o processo. É preciso que os dados gerados por meio dos cálculos, sejam avaliados e interpretados de modo que se encontrem as respostas pretendidas para o estudo. É necessário ainda, que as etapas anteriores aos cálculos de docking sejam realizadas com critério e conhecimento dos objetivos a serem alcançados, pois as mesmas podem comprometer irremediavelmente os resultados finais do estudo.

2.1 A estrutura tridimensional da COX-2

Conforme o esquema apresentado na Figura 2.1, é necessário que se tenha disponível as coordenadas tridimensionais da proteína. Essas informações foram obtidas a partir de dois portais de banco de dados sobre estruturas biológicas macromoleculares, o *Protein Data Bank* (PDB) (PDB - <http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>) e o *Protein Data Bank Summary* (PDBSum) (PDBSum - <http://www.ebi.ac.uk/pdbsum/>).

A proteína selecionada para os estudos de docking foi a de código pdb 1cx2 (Kurumbail et al., 1996), um complexo com o inibidor de código pdb SC-558, 1-fenilsulfonamida-3-trifluormetil-5-parabromofenilpirazol.

Em geral, no PDB e PDBSum as coordenadas estruturais podem ser obtidas sem os átomos de H e com as moléculas de água de cristalização. No caso da 1cx2, diferente do caso comum, tanto o receptor proteico quanto o ligante apresentam os átomos de H e não há águas de cristalização.

2.2 A estrutura tridimensional dos ligantes

As moléculas para esse estudo foram selecionadas a partir de duas publicações, Kang et al. (2009) e Wuest et al. (2009), que tratam, respectivamente, da síntese e avaliação biológica de análogos de 3, 5, 4'-trihidroxi-trans-estilbeno (resveratrol) e de derivados de (aril-1,2,3-triazol-1-il)-(metilsulfonil)fenil.

Como as coordenadas tridimensionais destes ligantes não estavam disponíveis foi necessário utilizar métodos de modelagem molecular para obtê-las. Para tal utilizou-se as estruturas dos compostos modelo, descritos na Seção 2.2.1, a partir dos quais foram modelados os ligantes.

2.2.1 Obtenção das coordenadas da estrutura modelo

As coordenadas tridimensionais dos compostos modelo (Figura 2.2), foram obtidas em busca realizada no banco de dados *PubChem Compound* (NCBI, 2010), tendo sido selecionados os compostos identificados por: CID 445154, CID 44581926 e CID 21859783.

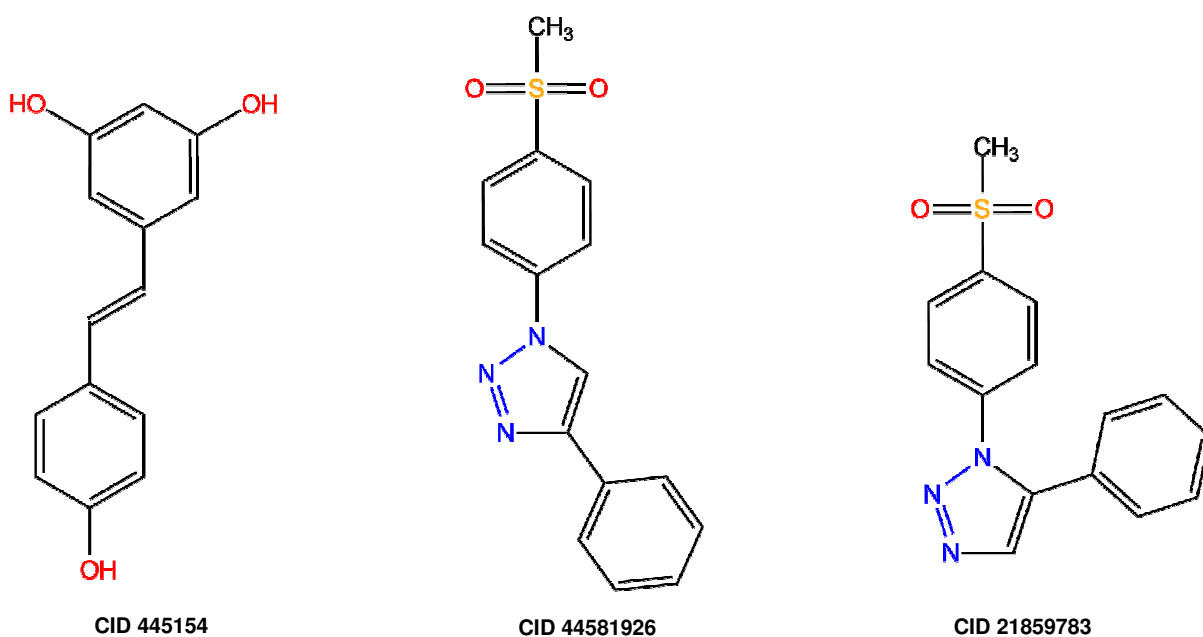


Figura 2.2 Estruturas modelo obtidas no banco de dados *PubChem Compound*: **CID 445154**, 5-[(E)-2-(4-hidroxifenil)etenil]benzeno-1,3-diol; **CID 44581926**, 1-[4-(metilsulfonil)fenil]-4-fenil-1H-1,2,3-triazol; **CID 21859783** 1-[4-(metilsulfonil)fenil]-5-fenil-1H-1,2,3-triazol.

2.2.2 Modelagem dos ligantes

A partir das estruturas representadas na Figura 2.2, foram modelados os ligantes por substituição ou inclusão de grupos funcionais, tendo sido utilizado para tal, os programas ACD/ChemSketch v12.01 (ACD, 2009) e HyperChem v6.01 (HYPERCUBE, 2000).

O conjunto de ligantes baseados na estrutura CID 44581926 foi chamado de **grupo 10** (Figura 2.3).

Todos os ligantes dessa família foram identificados pelo número 10 seguido de uma letra que identifica qual grupo ou átomo substitui o H31 na estrutura base **10a** (**a** = H; **b** = CH₃; **c** = OCH₃; **d** = N(CH₃)₂; **e** = Cl; **f** = F).

Para os ligantes baseados na estrutura CID 21859783, foi adotado o mesmo esquema de identificação do grupo 10 (um número e uma letra), sendo esse conjunto de ligantes chamado de **grupo 11** e a estrutura base de **11a** (Figura 2.4). Os grupos ou átomos substituintes do H31, também são os mesmos.

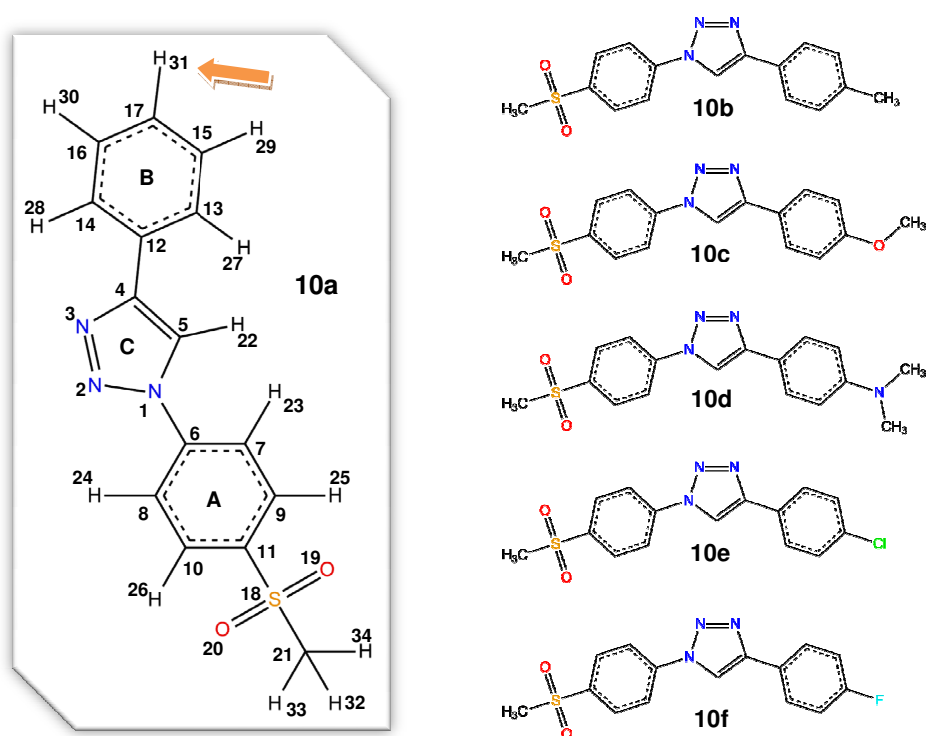


Figura 2.3 Estruturas dos ligantes do grupo 10. O ligante 10a, em destaque, apresenta a numeração adotada para os átomos dos ligantes e a identificação dos centroides (A-C) dos anéis da estrutura.

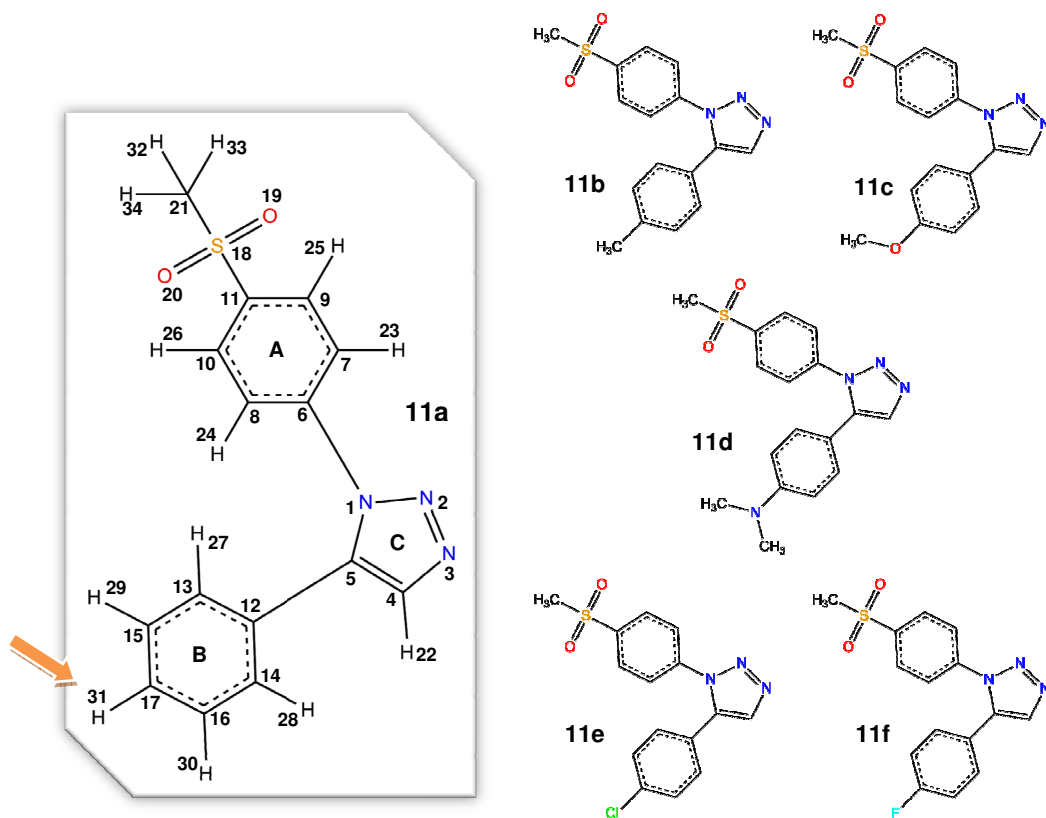


Figura 2.4 Estruturas dos ligantes do grupo 11. O ligante 11a, em destaque, apresenta a numeração adotada para os átomos dos ligantes e a identificação dos centroides (A-C) dos anéis da estrutura.

Um outro grupo de ligantes foi obtido utilizando como modelo a estrutura CID 445154, o Resveratrol (Figura 2.5).

Para a identificação desses ligantes foi adotada a sequência R1-R2-R3 onde, **R1** e **R3** são números que identificam os substituintes aril, e **R2**, uma letra, E, H ou M, que identifica o substituinte dessa posição, conforme o esquema detalhado na Tabela 2.1. Esse conjunto de ligantes foi chamado de **grupo R** (Figura 2.6).

Tabela 2.1 Identificação dos substituintes que compõem a estrutura dos ligantes do grupo R.

R1 ou R3	Substituinte	R1 ou R3	Substituinte
1	fenol	14	4-nitro-fenil
2	3,5-dihidroxi-fenil	15	b-naftil
5	4-metoxi-fenil	16	4-dimetilamino-fenil
6	3,5-dimetoxi-fenil	R2	Substituinte
7	3,4-dimetoxi-fenil	E	etil
10	3-fluor-fenil	H	hidrogênio
13	4-trifluormetil-fenil	M	metil

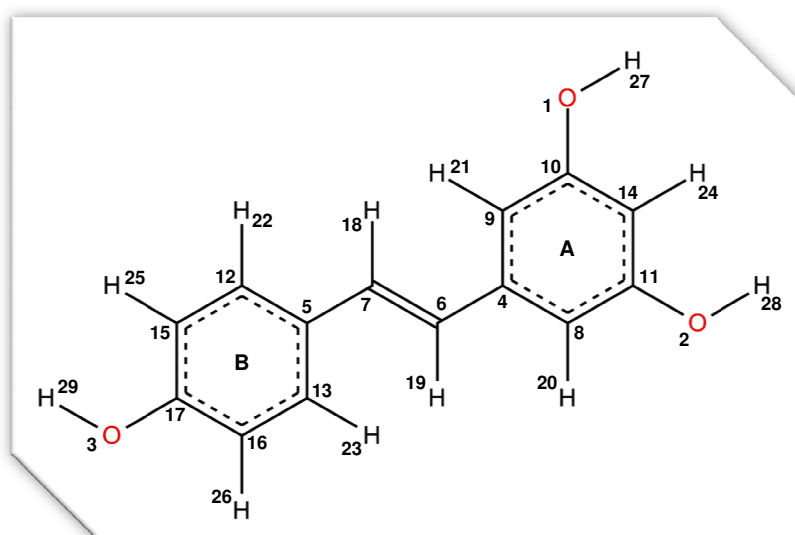


Figura 2.5 A molécula do **Resveratrol**, apresenta a numeração adotada para os átomos dos ligantes do **grupo R** e os centroides (A-B) dos anéis da estrutura.

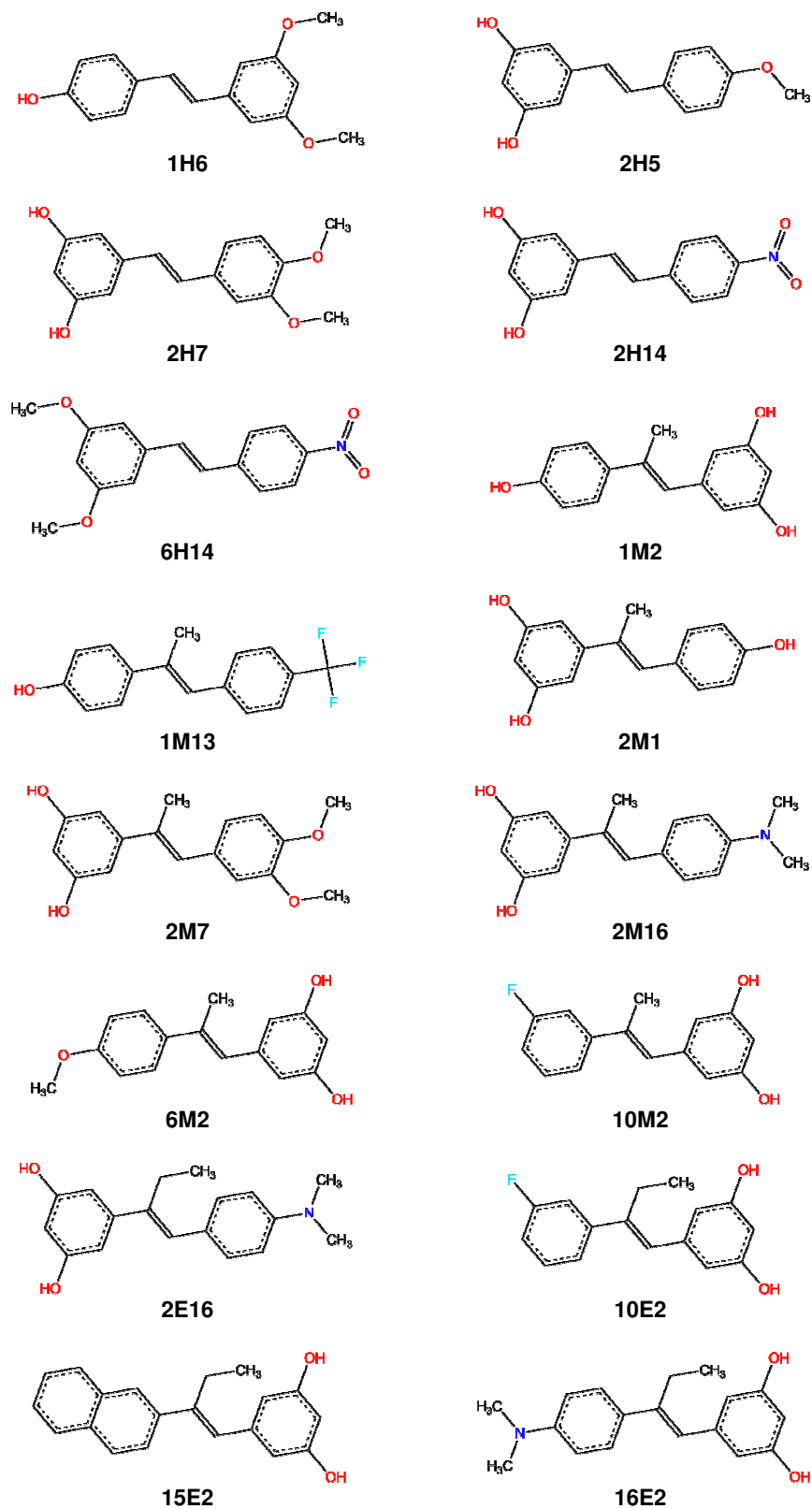


Figura 2.6 Ligantes modelados a partir do composto Resveratrol.

2.2.3 Otimização da geometria dos ligantes

Os cálculos para otimização das geometrias dos ligantes foram realizados com o auxílio do programa computacional para cálculos químico-quânticos semi-empíricos MOPAC2009TM (*Molecular Orbital PACkage*), utilizando o método paramétrico PM6 (STEWART, 2009).

2.3 Cálculos de Docking

Para os cálculos de docking foi utilizado o Programa GOLD, versão 4.1.2. Nos cálculos de docking e redocking (validação) realizados, foram utilizados os ajustes pré-definidos para o programa com pequenas modificações, exceto nos casos descritos de forma diferente no decorrer do trabalho. Para cada ligante foram obtidas 10 soluções, geradas a partir de 10.000 operações do algoritmo genético (AG) por solução, com minimização pelo método Simplex ao final dos mesmos. Quando os resultados das 5 melhores soluções do cálculo apresentaram RMSD (*Root Mean Square Deviation*) menor ou igual a 1,5 Å, os cálculos foram interrompidos antecipadamente pelo programa.

O espaço tridimensional do sítio de ligação no receptor foi definido usando as coordenadas, $x = 24,389$, $y = 21,705$ e $z = 16,255$, do centroide do ligante cristalográfico SC-558 no complexo pdb 1cx2, com um raio de 10 Å ao redor deste ponto.

Para a cadeia lateral do resíduo arginina 120, inserido no espaço de busca (sítio ativo ciclooxigenase) da proteína, foram adotados os ângulos diedrais: $\chi_1 = -115^\circ$, $\chi_2 = 77^\circ$, $\chi_3 = -152^\circ$ e $\chi_4 = -146^\circ$.

A função *fitness* utilizada foi a GoldScore.

$$GoldScore = S_{hb_ext} + 1,375 S_{vdW_ext} + S_{hb_int} + S_{vdW_int} \quad (2.1)$$

onde S_{hb_ext} é o escore da energia das ligações de hidrogênio proteína-ligante, S_{vdW_ext} é o escore das energias de van der Waals proteína-ligante, S_{hb_int} é a contribuição para o escore devido a ligações de hidrogênio intramoleculares do ligante, e S_{vdW_int} é a contribuição devido à tensão intramolecular do ligante.

2.4 Validação dos parâmetros para o *docking*

Para o início dos cálculos de docking, é necessário que as variáveis (raio do espaço tridimensional, hibridização dos átomos, presença de moléculas de água no espaço de busca, etc.) e os parâmetros utilizados pelo programa para os cálculos de docking sejam testados. Para isso, é realizado o redocking, ou a tentativa de se reconstruir o complexo cristalográfico original 1cx2.

Um esquema do procedimento para validação dos parâmetros (redocking) é mostrada na Figura 2.7.

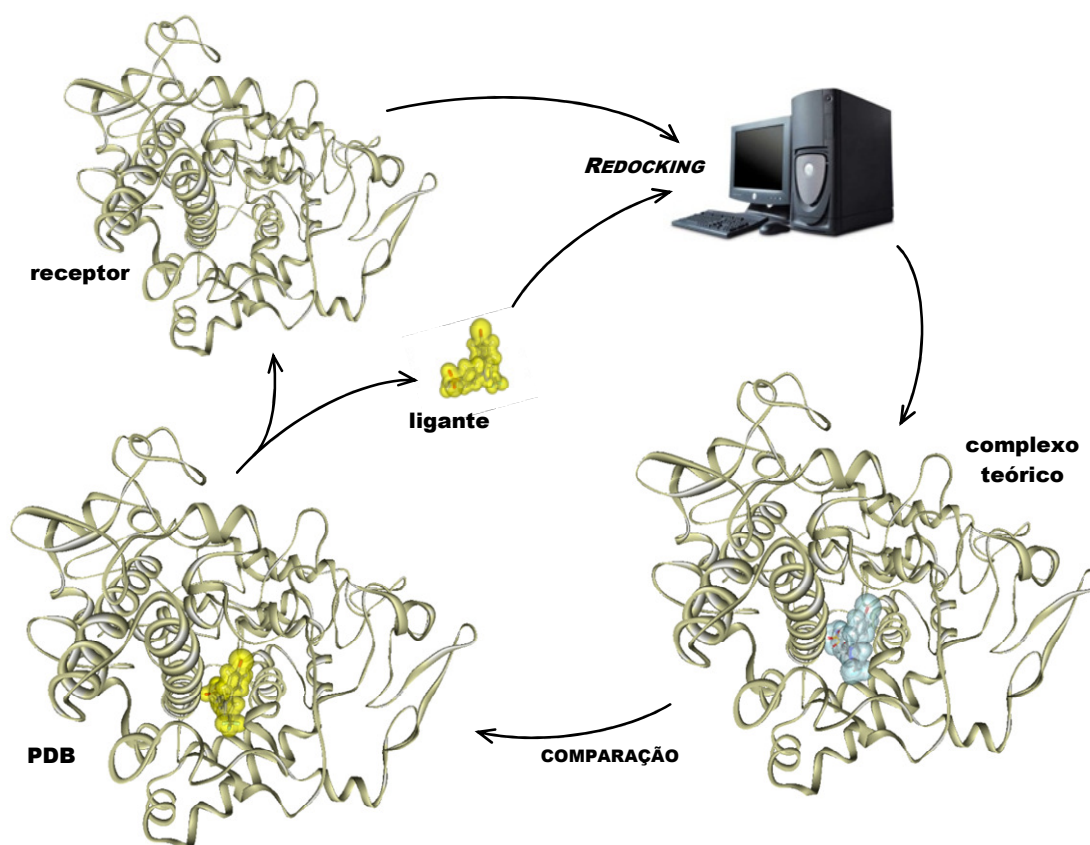


Figura 2.7 Representação esquemática do procedimento de validação dos parâmetros para os cálculos de docking. O complexo 1cx2 é separado em receptor e ligante e posteriormente submetido ao redocking para formar o complexo teórico que será comparado ao complexo original.

A estrutura cristalográfica de entrada 1cx2 é desfeita, separando-se a proteína (receptor) do ligante complexado. Posteriormente, cálculos de docking são realizados utilizando as coordenadas de entrada das duas estruturas separadas (proteína e ligante). E finalmente, os resultados são comparados com o complexo cristalográfico original.

Considera-se como adequados e validados, os parâmetros utilizados, quando os resultados obtidos conseguem recriar a orientação e conformação do ligante inserido na estrutura do complexo cristalográfico com RMSD (*Root Mean Square Deviation*) inferior ou igual a 2,0 Å (VERDONK et al., 2003; ONODERA; SATOU; HIROTA, 2007; ARMEN; CHEN; BROOKS, 2009; LI et al., 2010).

2.5 Visualização molecular

O trabalho foi acompanhado por visualização molecular, utilizando os programas gráficos, Hermes 1.3.1 nos cálculos de docking, e Discovery Studio[®] Visualizer v2.5 e v3.0 (ACCELRYS, 2011), em todas as etapas, na análise:

- (a) e seleção da estrutura da proteína;
- (b) dos ligantes;
- (c) dos resultados do cálculo de *docking*:
 - c.1 dos ligantes, observando a existência ou não de um padrão nas soluções obtidas nos cálculos;
 - c.2 das **interações** intermoleculares proteína-ligante.

2.6 Análise dos resultados

Após a realização dos cálculos de docking, é necessário que os complexos formados (saídas do programa) possam ser avaliados graficamente. Essa avaliação tem por objetivo a busca e o entendimento do modo de ligação do complexo no sítio de ligação e as interações intermoleculares envolvidas.

Considera-se nessa busca, os escores obtidos nos cálculos, a complementaridade atômica entre ligante e sítio de ligação, a percentagem de repetição de uma pose nos cálculos de docking e a representatividade da mesma para a série de compostos da família estudada (VEGA-TEIJIDO; CARACELLI; ZUKERMAN-SCHPECTOR, 2006).

Os resultados obtidos através da observação e avaliação das interações realizadas entre os ligantes estudados e o sítio de ligação são então confrontados com os dados da Tabela 2.2 relativos à inibição da atividade da COX-2 pelos mesmos, obtidos nos

trabalhos de Kang et al. (2009) e de Wuest et al., (2009), na tentativa de se encontrar correlações entre o IC_{50} ² apresentado pelo ligante e as interações observadas.

Tabela 2.2. Dados de inibição* da atividade da COX-2 pelos compostos estudados.

Composto	IC_{50} (μ M)
10 ^a	0,15
10b	2,5
10c	2,5
10d	>10
10e	0,19
10f	0,21
11 ^a	0,11
11b	0,12
11c	0,17
11d	0,36
11e	0,04
11f	0,03
1H6	0,82
2H5	19,6
2H7	21,3
2H14	31,6
6H14	5,94
1M2	1,57
1M13	0,47
2M1	1,78
2M7	12,8
2M16	1,74
5M2	16,0
10M2	2,54
2E16	2,20
10E2	17,7
15E2	3,30
16E2	14,8
Resveratrol	$0,99 \pm 0,40$

* Dados de IC_{50} obtidos de Wuest et al., (2009) e de Kang et al. (2009)

² Concentração do composto que inibe 50% da atividade enzimática

CAPÍTULO 3

Resultados e Discussão

Neste capítulo e seus apêndices são descritos os procedimentos realizados e os resultados, discutidos de modo a encontrar justificativas, em nível molecular, para os efeitos inibitórios apresentados pelas moléculas dos ligantes estudados.

3.1 A estrutura da proteína

A busca realizada no PDB e PDBSum, em novembro de 2010, com o intuito de obter a proteína COX-2, o receptor nos cálculos de docking, resultou nas 18 estruturas relacionadas na Tabela 3.1.

Tabela 3.1. Estruturas tridimensionais da COX-2, obtidas por difração de raios X, depositadas no PDB.

Código	Descrição	Ligante	Resolução	Referência
1cvu	Ácido araquidônico ligado ao sítio ativo ciclooxigenase	ácido araquidônico	2.40 Å	KIEFER et al., 2000.
1cx2	Complexo com o inibidor seletivo, SC-558	1-fenilsulfonamida-3-trifluormetil-5-parabromofenilpirazol	3.00 Å	KURUMBAIL et al., 1996.
1ddx	Ácido araquidônico e prostaglandina ligada ao sítio ativo	ácido 7-[6-(3-hidroperoxi-oct-1-enil)-2,3-dioxa-biciclo [2.2.1]hept-5-il]-hept-5-enóico	3.00 Å	KIEFER et al., 2000.
1pxx	Diclofenaco ligado ao sítio ativo	ácido 2-[2,6-(diclorofenil)amino] benzenoacético	2.90 Å	ROWLINSON et al., 2003.
3hs5	Ácido araquidônico ligado ao canal ciclooxigenase	ácido araquidônico	2.10 Å	VECCHIO et al., 2010.
3hs6	Ácido eicosapentaenóico ligado ao canal ciclooxigenase	ácido 5,8,11,14,17-eicosapentaenóico	2.40 Å	VECCHIO et al., 2010.
3hs7	Ácido docosahexaenóico ligado ao canal ciclooxigenase	ácido docosa-4,7,10,13,16,19-hexaenóico	2.65 Å	VECCHIO et al., 2010.
3krk	Ácido araquidônico ligado ao canal ciclooxigenase da L531F	ácido araquidônico	2.40 Å	VECCHIO et al., 2010.
3ln0	Composto 5C-S ligado no sítio ativo	ácido (2S)-6,8-dicloro-2-(trifluormetil)-2H-cromeno-3-carboxílico	2.20 Å	WANG et al., 2010.
3ln1	Celoxib ligado no sítio ativo	4-[5-(4-metilfenil)-3-(trifluormetil)-1H-pirazol-1-il] benzenosulfonamida	2.40 Å	WANG et al., 2010.
3mqe	SC-75416 ligado no sítio ativo	ácido (2S)-7-tert-butil-6-cloro-2-(trifluormetil)- 2H-cromeno-3-carboxílico	2.80 Å	WANG et al., 2010.
3nt1	Complexo naproxen:COX-2	ácido (2S)-2-(6-metoxinaftalen-2-il)propanóico	1.73 Å	DUGGAN et al., 2010.
3ntb	Análogo de 6-metiltionaproxen ligado na COX-2	ácido (2S)-2-[6-(metilsulfanil) naftalen-2-il]propanóico	2.27 Å	DUGGAN et al., 2010.
3ntg	COX-2 com o composto seletivo 23D-(R)	ácido (2R)-6,8-dicloro-7-(2-metilpropoxi)-2-(trifluormetil)- 2H-cromeno-3-carboxílico	2.19 Å	WANG et al., 2010.
3pgh	Complexo com o inibidor não seletivo, flurbiprofen	flurbiprofen	2.50 Å	KURUMBAIL et al., 1996.
4cox	Complexo com o inibidor não seletivo, indometacin	indometacin	2.90 Å	KURUMBAIL et al., 1996.
5cox	Prostaglandina sintase-2 não inibida		3.00 Å	KURUMBAIL et al., 1996.
6cox	Complexo com o inibidor seletivo, SC-558	1-fenilsulfonamida-3-trifluormetil-5-parabromofenilpirazol	2.80 Å	KURUMBAIL et al., 1996.

Inicialmente, foram consideradas as estruturas que se apresentassem complexadas com um ligante, seletivo ou não para COX-2, diferente do substrato natural da enzima, o ácido araquidônico.

Dessa forma, foram selecionadas as estruturas: 1cx2, 1pxx, 3ln0, 3ln1, 3mqe, 3ntb, 3ntg, 3nt1, 3pgh, 4cox e 6cox, para as primeiras avaliações.

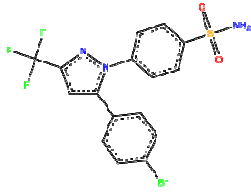
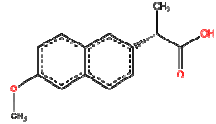
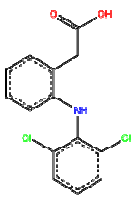
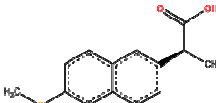
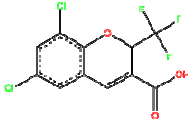
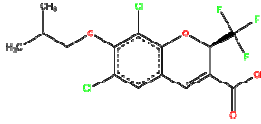
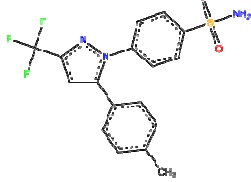
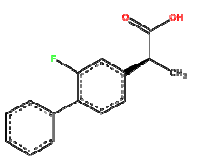
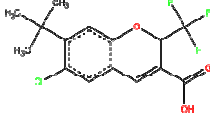
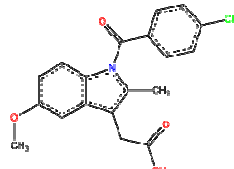
Tabela 3.2. Estruturas avaliadas e os resíduos de aminoácidos mais frequentemente envolvidos em interações com os compostos/fármacos no sítio ativo ciclooxigenase da COX-2.

Aminoácido Estrutura	H90	R120	Q192	Y348	V349	L352	S353	Y355	L359	Y385	W387	R513	A516	F518	V523	G526	A527	S530	L531
1cx2/SC-558																			
1pxx/diclofenaco																			
3ln0/SD-8381																			
3ln1/celoxib																			
3mqe/SC-75416																			
3nt1/naproxen																			
3ntb/6-metiltio- naproxen																			
3ntg/D72																			
3pgh/flurbiprofen																			
4cox/indometacin																			
6cox/SC-558																			

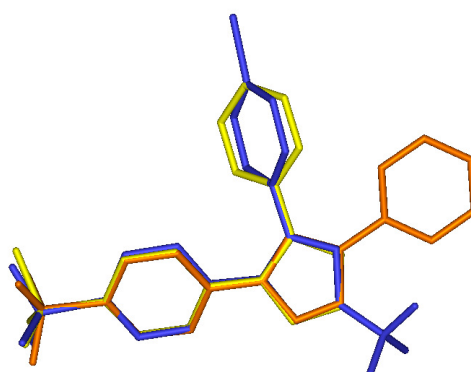
A Tabela 3.2 apresenta, sinteticamente, quais são os resíduos de aminoácidos envolvidos em interações com os compostos/fármacos complexados nas estruturas pesquisadas que demonstram serem importantes para o posicionamento e conformação adotada pelos mesmos no sítio de ligação da enzima.

Paralelamente a análise das interações, foi avaliada ainda a similaridade estrutural entre os compostos/fármacos presentes nos complexos cristalográficos (Tabela 3.3) e os ligantes estudados neste trabalho.

Tabela 3.3 Fórmula estrutural dos compostos complexados nas estruturas selecionadas da COX-2.

PDB (código)	Composto	Estrutura	PDB (código)	Composto	Estrutura
1cx2 6cox	SC-558		3nt1	naproxen	
1pxx	diclofenaco		3ntb	6-metiltio naproxen	
3ln0	SD-8381		3ntg	D72	
3ln1	celecoxib		3pgh	flurbiprofen	
3mqe	SC-75416		4cox	indometacin	

A inspeção visual utilizando programas de visualização molecular e a análise das interações intermoleculares resultou na seleção da estrutura de código pdb 1cx2 para ser considerada como o receptor nos cálculos de docking realizados. Um fator importante para a escolha foi a similaridade estrutural entre o ligante SC-558 e os ligantes dos grupos 11 e 10.

**Figura 3.1.** Sobreposição das estruturas dos ligantes, SC-558 (em azul), 11a (em amarelo) e 10a (em laranja).

Para os cálculos realizados neste trabalho foi utilizada as coordenadas tridimensionais da entrada pdb 1cx2, que está representada na Figura 3.2, com suas hélices numeradas. Esta representação será útil na discussão dos resultados, por isso foi inserida no começo deste capítulo.

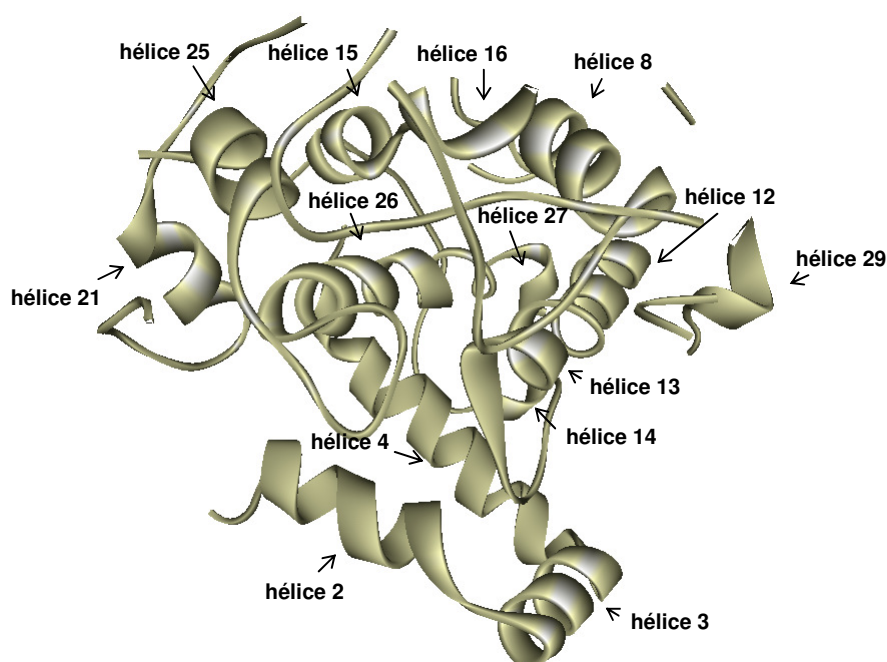


Figura 3.2 Representação em *solid ribbon* da estrutura do monômero A, com as α -hélices identificadas, da entrada 1cx2.

3.2 Os ligantes

A seguir são apresentadas as três famílias de ligantes que foram consideradas para os cálculos de docking, obtidas por modelagem molecular, conforme descrito na Seção 2.2.1 do Capítulo 2.

As estruturas tridimensionais dos ligantes 10a-f e as dos ligantes 11a-f, são mostradas na Figura 3.3 e as dos ligantes derivados do composto Resveratrol na Figura 3.4.

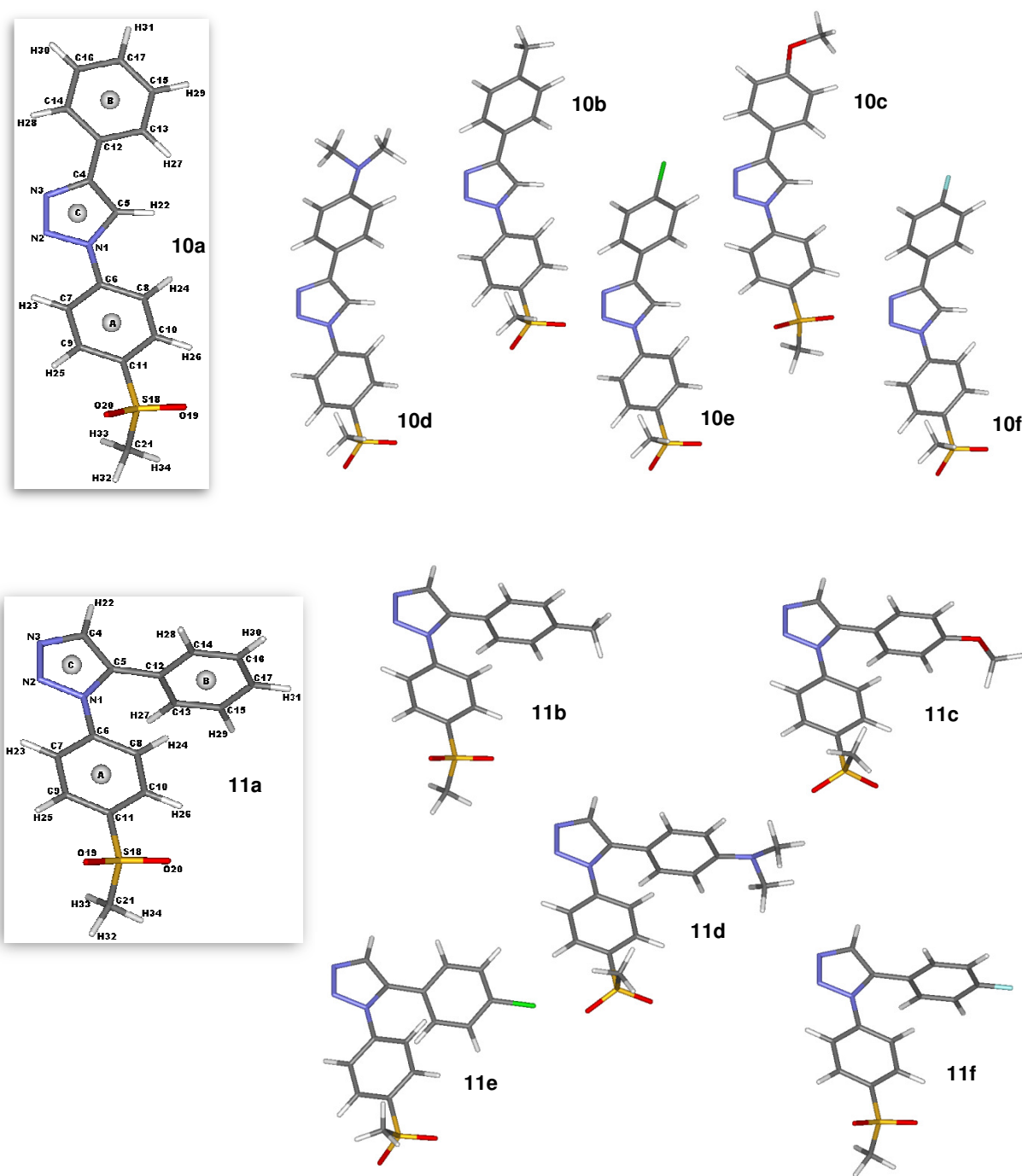


Figura 3.3 Ligantes modelados dos **grupos 10 e 11**. O ligante **10a e 11a**, em destaque, apresentam a numeração adotada para os átomos dos ligantes e a identificação dos centroides (A-C) dos anéis da estrutura.

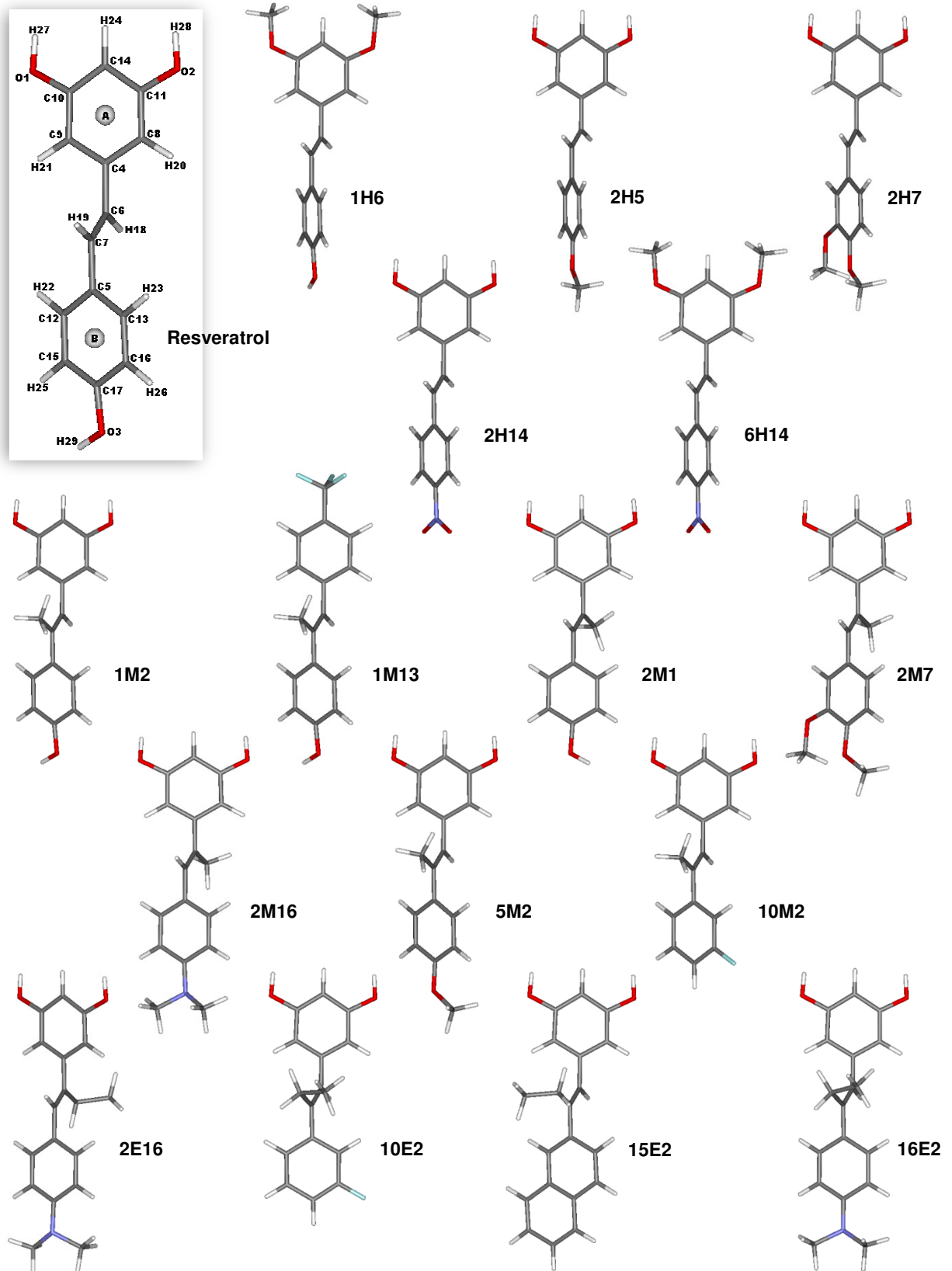


Figura 3.4 Ligantes modelados a partir do composto **Resveratrol**. Em destaque, a numeração adotada para os átomos dos ligantes e a identificação dos centroides (A-B) dos anéis da estrutura.

3.3 Os estudos de docking

Como descrito anteriormente, os ligantes estudados foram separados em grupos baseado nas similaridades estruturais apresentadas entre eles.

A apresentação e discussão dos resultados obtidos para o docking destes segue o mesmo critério, pois como será visto no decorrer do trabalho, a similaridade entre as estruturas dos ligantes de um mesmo grupo repercute no tipo e frequência de interações realizadas entre os mesmos e o sítio da proteína.

3.3.1 Redocking

Para a validação dos parâmetros utilizados nos cálculos de docking dos ligantes foi realizado o redocking do ligante cristalográfico, tendo sido obtidas as saídas, detalhadas e discutidas no **Apêndice A**, e visualizadas na Figura 3.5, a seguir.

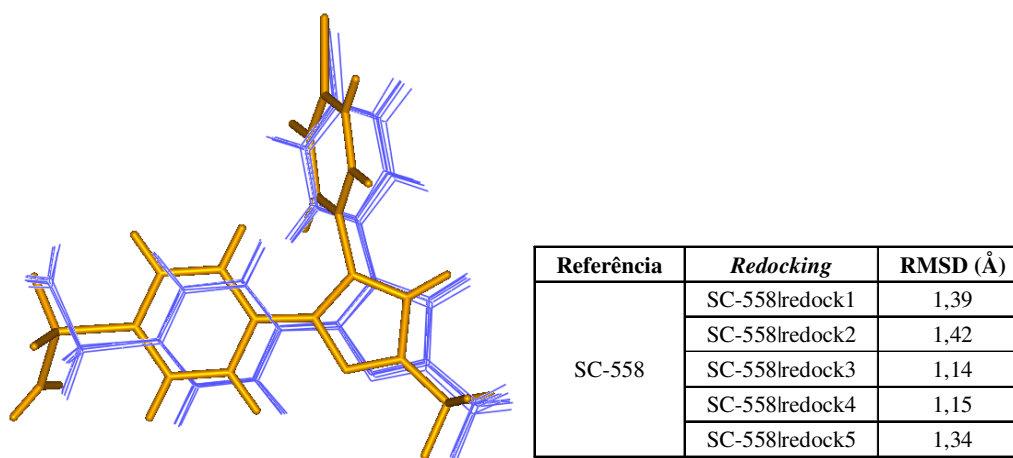


Figura 3.5 Visualização das saídas (azul) obtidas no redocking do ligante SC-558 (laranja). Ao lado, os valores de RMSD obtidos usando o ligante cristalográfico como referência.

Nos cálculos de redocking, para as cinco saídas programadas foram recriadas a orientação do ligante original e os valores de RMSD apresentaram-se dentro dos valores considerados adequados para esse tipo de validação (≤ 2 Å), conforme demonstrado no quadro da Figura 3.5.

Foi realizado ainda, o docking de três inibidores seletivos de COX-2, a saber, celecoxib, rofecoxib e valdecoxib, com o objetivo de se ter parâmetros de valores de escore

para ligantes considerados como fármacos. Na Tabela 3.3 estão descritos os valores de escore obtidos para os coxibs e os valores de IC_{50} para COX-2 dos mesmos.

Tabela 3.4 Escores obtidos pelos coxibs e pelo ligante SC-558.

Ligante	Escore ($kcal.mol^{-1}$)	IC_{50} (μM)
Celecoxib	76,39	0,04 ^a
Rofecoxib	68,19	0,02 ^a
Valdecoxib	69,80	0,005 ^b
SC-558	81,21	0,0093 ^c

^a Hankey (1999); ^b Gierse et al. (2005); ^c Kurumbail et al. (1996)

Na Figura 3.6, estão representados os coxibs descritos na Tabela 3.4, localizados no sítio ativo ciclooxygenase da COX-2. Todos se posicionam entre as α -hélices 13 e 26, com o anel contendo o grupo sulfonil adentrando o bolso lateral do sítio e o restante da molécula posicionando-se longitudinalmente no sítio de ligação.

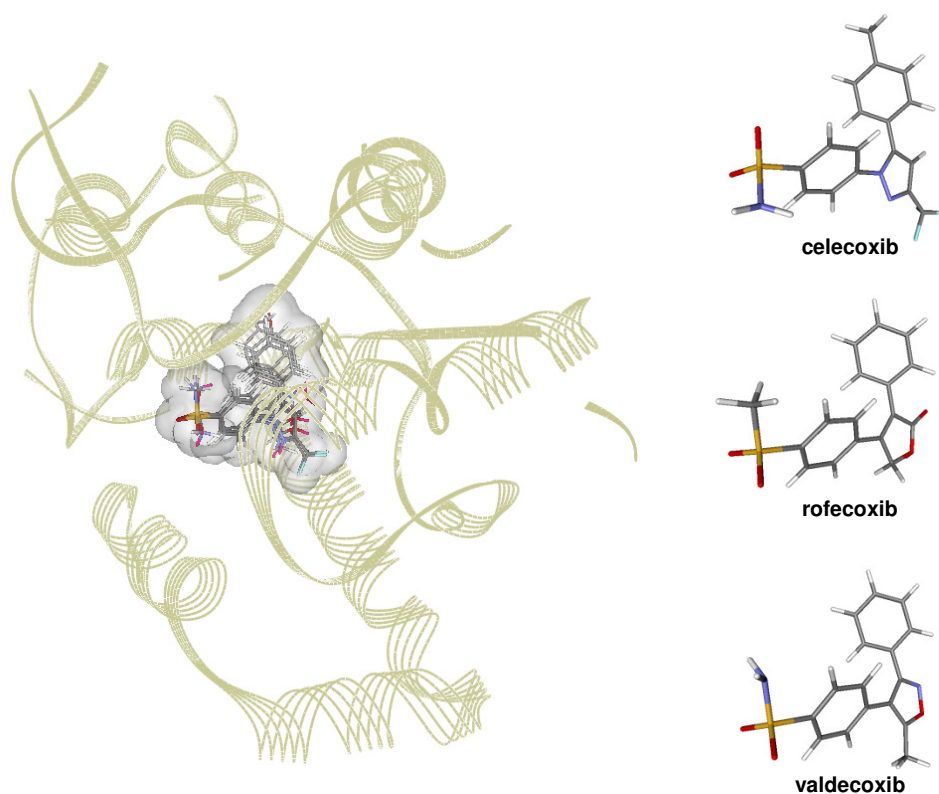


Figura 3.6 Posicionamento dos coxibs: celecoxib, rofecoxib e valdecoxib, e do ligante SC-558 no sítio Cox da COX-2 (representados em *line ribbon*)

3.3.2 Resultados para o Grupo 10

Os ligantes do grupo 10 possuem a mesma estrutura básica do ligante 10a, variando somente o substituinte da posição *para* (H31) do anel benzênico ligado ao anel central triazol da molécula.

Conforme mostrado na Figura 3.7, somente o ligante **10d** apresentou orientação diversa do restante do grupo. Deve ser ressaltado, no entanto, que a mudança de orientação em relação ao restante do grupo deve ter implicação direta com os menores valores de escore e o maior IC₅₀ relacionado ao ligante.

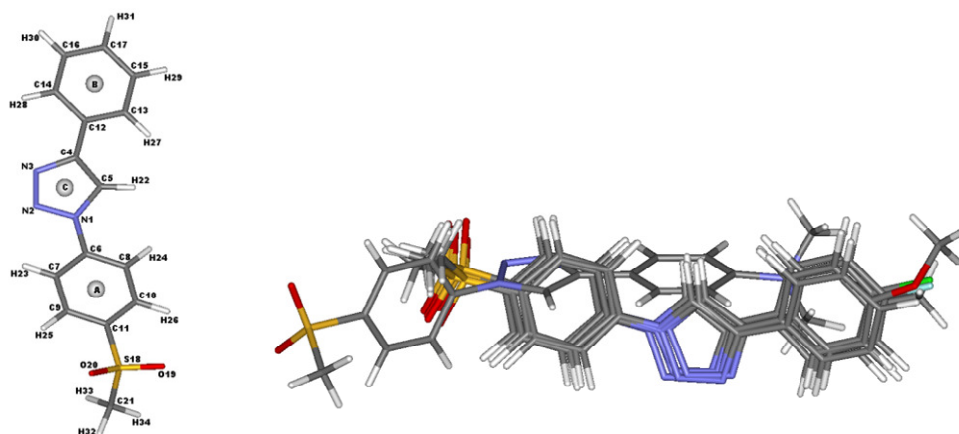


Figura 3.7 Visualização da sobreposição das poses do grupo 10 selecionadas para avaliação das interações intermoleculares (à direita). A estrutura base dos ligantes está representada a esquerda para referência.

Na Tabela 3.5 estão descritos os valores médios dos escores obtidos por cada ligante do grupo, bem como os valores de IC₅₀ para COX-2 destes.

Tabela 3.5 Escores obtidos pelos ligantes do grupo 10.

Ligante	Escore	IC ₅₀ (μM) ^a	Estrutura
10a	62,49	0,15	
10b	50,20	2,5	

Tabela 3.5 Escores obtidos pelos ligantes do grupo 10.

Ligante	Escore	IC ₅₀ (μM) ^a	Estrutura
10c	52,62	2,5	
10d	48,04	>10	
10e	55,79	0,19	
10f	63,17	0,21	

^a Dados obtidos de Wuest et al (2009)

Nos cálculos de docking, os ligantes **10a**, **10b**, **10c**, **10e** e **10f**, posicionaram-se transversalmente no sítio ciclooxygenase da COX-2 entre as hélices 13 e 26, com o anel metilsulfonilfenil posicionado no bolso lateral do sítio ciclooxygenase e a porção 4-fenil-1,2,3-triazol posicionada na direção da região inicial do sítio, logo acima dos resíduos Arg120 e Tyr355 (Figura 3.8A).

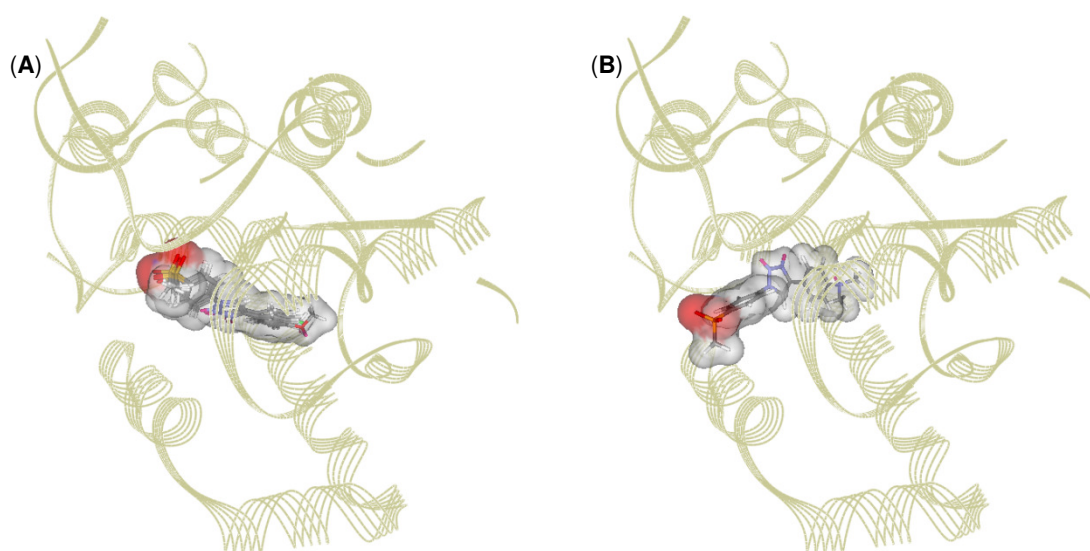


Figura 3.8 Posicionamento dos ligantes do grupo 10 no sítio Cox da COX-2. (A) ligantes **10(a, b, c, e, f)**. (B) ligante **10d**.

A molécula **10d**, conforme mostrado na Figura 3.8B, apresentou variação no posicionamento em relação aos outros ligantes do grupo. O anel metilsulfonilfenil ficou localizado no bolso lateral, muito próximo ao *turn* que "fecha" o acesso lateral ao sítio, com a porção fenil-triazol disposta paralelamente às hélices 13 e 26, na região central do sítio Cox.

A descrição das interações realizadas com o sítio de ligação, por cada um dos ligantes do grupo, está detalhada no **Apêndice B**.

Pela análise realizada, acredita-se que a não presença de interações entre o ligante **10d** e os resíduos glutamina 192, leucina 352 e serina 353, pode ser o motivo para o menor valor de escore obtido, quando comparado com os demais ligantes do grupo, e ainda, pelo alto valor de IC₅₀ associado ao mesmo.

Na Tabela 3.6 estão descritos os aminoácidos frequentemente envolvidos nas interações realizadas entre o sítio receptor ciclooxygenase e os ligantes do grupo 10 estudados.

Tabela 3.6 Ligantes do grupo 10 e os resíduos de aminoácidos mais frequentemente envolvidos em interações no sítio ciclooxygenase da COX-2 com seus respectivos valores de escore (- kcal.mol⁻¹).

Aminoácido Ligante	H90	V116	R120	Q192	L352	S353	Y355	R513	A516	I517	F518	V523	L531	Escore
10a														62,49
10b														50,20
10c														52,62
10d														48,04
10e														55,79
10f														63,17

Para os ligantes do **grupo 10**, merece destaque ainda, o aspecto relacionado com a consequência da inclusão de grupos volumosos na estrutura base. A mudança de orientação e posicionamento do ligante **10d** pode ser explicada, em nível molecular, pela falta de espaço disponível (impedimento estérico) na região inferior do sítio identificada pelos resíduos metionina 113, valina 116, leucina 117 e leucina 359, logo acima da região de constrição que dá acesso ao sítio ciclooxygenase da COX-2, para abrigar o aumento no comprimento da molécula do ligante e o volume do grupo dimetilamina, e ainda manter as interações que posicionam e definem a conformação dos outros ligantes do grupo.

Na Figura 3.9 são apresentadas as moléculas do grupo 10, e seu posicionamento geral dentro do sítio ativo da proteína.

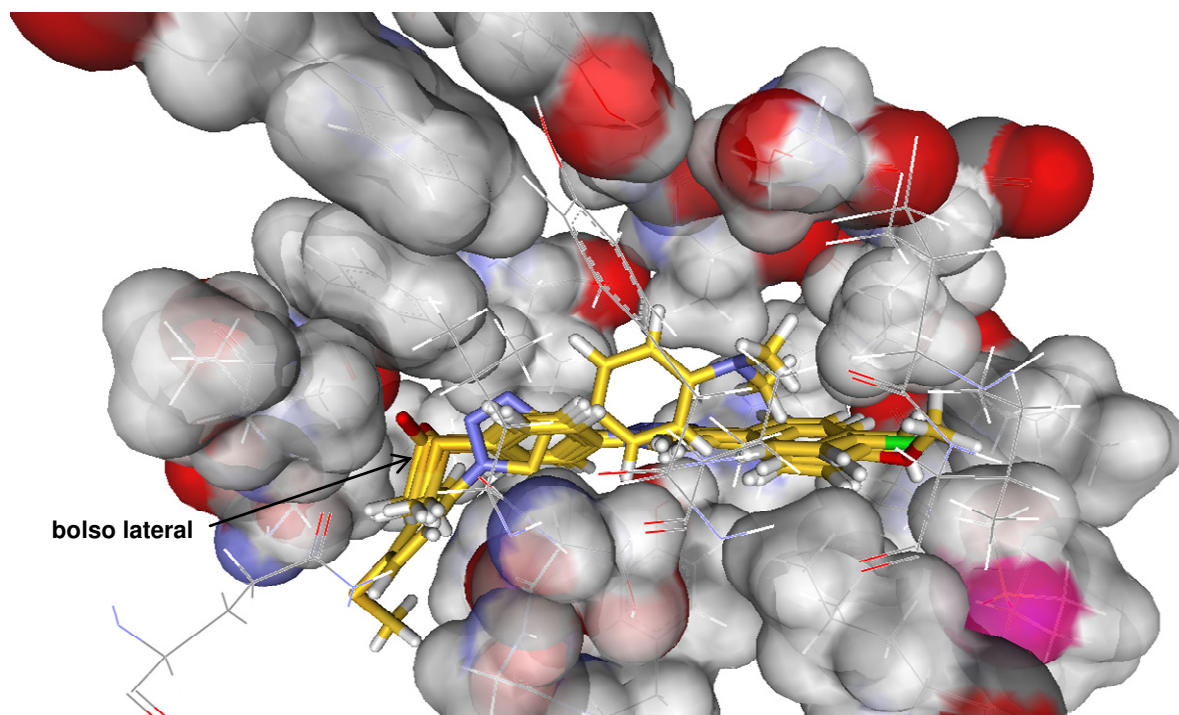


Figura 3.9 Visualização das poses dos ligantes do **grupo 10** no sítio de ligação. As estruturas dos ligantes estão representadas em *stick* com os átomos de carbono em amarelo. A superfície de van der Waals dos resíduos envolvidos no "encaixe" está representada levando-se em consideração os átomos presentes nas estruturas, sendo que a superfície dos resíduos que encontram-se acima da região de "encaixe" foram omitidas para facilitar a visualização.

Nos cálculos de docking realizados para o **grupo 10**, toda mudança na estrutura base de modo a promover o aumento do comprimento da molécula, implicou em perda de qualidade nas interações envolvendo os sistemas π dos anéis A e C, demonstrando, como consequência observável, mudanças nas distâncias e nos ângulos dessas interações, como demonstrado no **Apêndice B**.

Os escores obtidos (Tabela 3.5) corroboram para a percepção de que a qualidade das interações com os sistemas π é importante para a estabilidade do complexo formado ao relacionarem o menor valor de escore com a estrutura de maior comprimento e de modo contrário, o maior valor de escore com a estrutura de menor comprimento.

Na análise dos valores de IC_{50} em relação à extensão molecular, a situação anterior é reforçada ao correlacionar os menores valores de IC_{50} as moléculas menos extensas, os valores intermediários as moléculas com os grupos substituintes de tamanho intermediário, metil e metoxi, e os valores maiores a molécula com o grupo substituinte de maior volume, o dimetilamina.

3.3.3 Resultados do Grupo 11

Os ligantes do grupo 11 apresentam os mesmos grupos substituintes do grupo anterior (grupo 10) ligados na sua estrutura base na posição do hidrogênio 31, no entanto, a ligação dos anéis benzênicos nas posições 1 e 5 do núcleo triazol faz com que a geometria dos mesmos seja alterada.

Todos os ligantes desse grupo apresentam estrutura química, geometria e conformação muito similar a do ligante SC-558 e dos coxibs: celcoxib, rofecoxib e valdecoxib. Esse fato denota a percepção inicial de que os mesmos devem se orientar no sítio de ligação da enzima de modo semelhante ao dos coxibs, o que foi confirmado pela visualização dos cálculos de docking realizados.

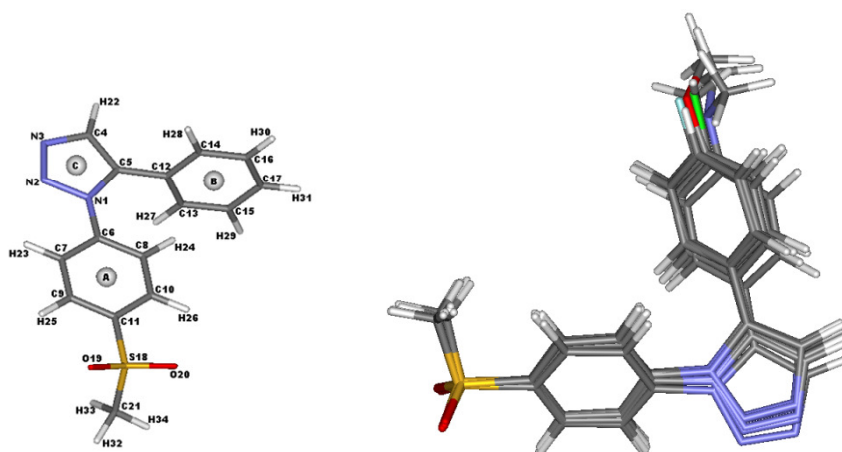
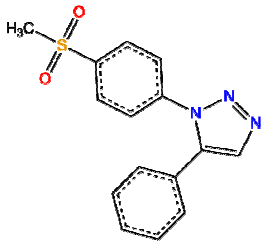
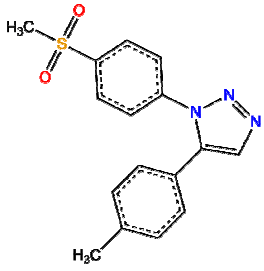
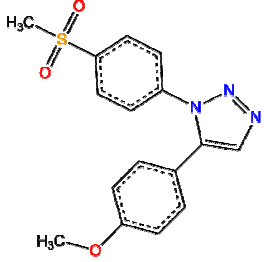
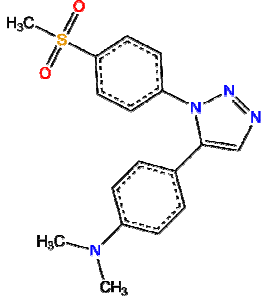
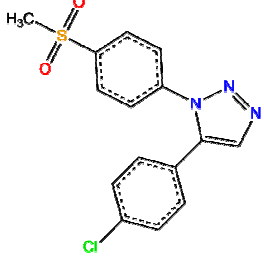
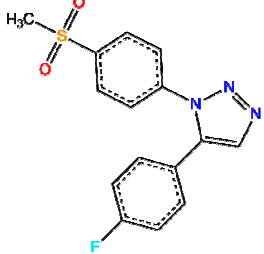


Figura 3.10 Visualização da sobreposição das poses do grupo 11 selecionadas para avaliação das interações intermoleculares (a direita). A estrutura base dos ligantes esta representada a esquerda para referência.

Conforme demonstrado na Figura 3.10, todos os ligantes do grupo 11 adotaram orientação no sítio de ligação e conformações similares entre si. Essa mesma relação de similaridade foi encontrada para os escores obtidos pelos cálculos de docking.

Na Tabela 3.7 estão descritos os valores médios dos escores obtidos por cada ligante do grupo, bem como os valores de IC_{50} para COX-2 dos mesmos.

Tabela 3.7 Escores obtidos pelos ligantes do grupo 11.

Ligante	Escore	IC ₅₀ (μM) ^a	Estrutura
11a	68,18	0,81	
11b	72,39	0,78	
11c	74,49	0,83	
11d	74,99	0,84	
11e	71,03	0,70	
11f	68,47	0,91	

^a Dados obtidos de Wuest et al. (2009)

Na Figura 3.11 é apresentado o posicionamento dos ligantes do grupo 11 no sítio cicloxigenase da COX-2.

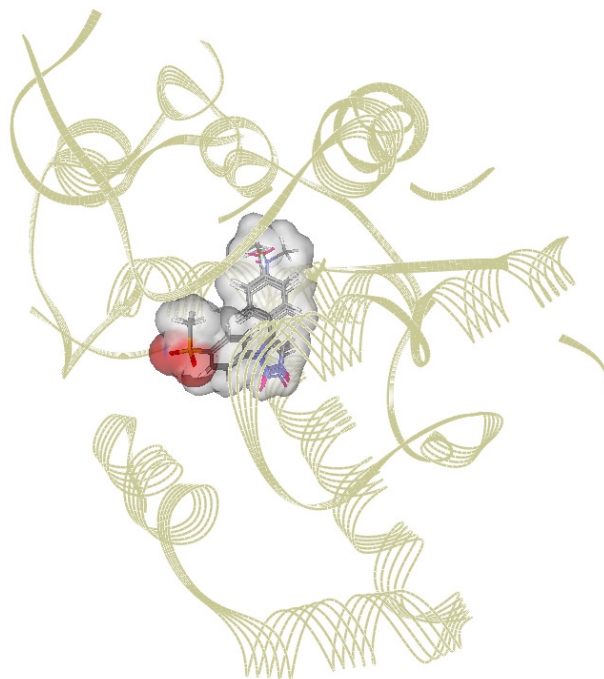


Figura 3.11 Posicionamento dos ligantes do grupo 11 no sítio ciclooxygenase da COX-2.

A descrição das interações realizadas com o sítio de ligação, por cada um dos ligantes do grupo, está detalhada no **Apêndice C**.

A análise dos resultados encontrados permitiu observar que os ligantes desse grupo apresentam poses muito semelhantes entre si, com o grupo aril metilsulfonilfenil posicionado no bolso lateral do sítio ciclooxygenase da COX-2 e a porção 4-fenil-1,2,3-triazol ocupando a extensão vertical do mesmo.

Essa orientação é muito similar a adotada pelo ligante SC-558 e os coxibs: celecoxib, rofecoxiv e valdecoxib, fármacos com histórico de eventos relacionados a complicações cardiovasculares, conforme citado anteriormente.

Estudos realizados com celecoxib e valdecoxib, compostos classificados como diaril heterocíclicos como os ligantes do grupo 11, demonstraram que esses compostos possuem alta afinidade pela COX-2 e podem se ligar muito rapidamente ao sítio ativo de forma tempo reversível (HOOD et al., 2003). E que, os grupos sulfonil, sulfona e sulfonamida

ligados e essa classe de compostos tendem a ocupar o bolso lateral do sítio ativo da enzima (HANKEY, 1999).

Na tabela 3.8 encontram-se relacionados os resíduos de aminoácidos do sítio ciclooxigenase mais frequentemente envolvidos em interações com os ligantes do grupo 11 estudados, e ainda, com os compostos SC-558 e celoxib.

Tabela 3.8 Ligantes do grupo 11 e os resíduos de aminoácidos mais frequentemente envolvidos em interações no sítio ciclooxigenase da COX-2 com seus respectivos valores de escore (- kcal.mol⁻¹).

Aminoácido Ligante	H90	R120	L352	S353	Y355	Y385	W387	R513	V523	L531	Escore
1cx2/SC-558											81,21
3ln1/celoxib											76,39
11a											68,18
11b											72,39
11c											74,49
11d											74,99
11e											71,03
11f											68,47

A análise comparativa entre os resíduos que interagem com os ligantes do grupo 11 e aqueles que interagem com o SC-558 e o celoxib, remetem à percepção de que a interação com o resíduo leucina 531 pode ser importante para definir maior potência a essa classe de compostos.

Diferentemente do observado para o grupo 10, no **grupo 11**, a inclusão de substituintes com maior tamanho/volume na estrutura molecular base dos ligantes não alterou de modo significativo os valores para o IC₅₀ apresentado pelos mesmos (Tabela 3.7).

Em nível molecular, a pequena variação nos valores para o IC₅₀ em função das alterações na estrutura base, pode ser explicada levando-se em consideração o modo como os ligantes do grupo se posicionam e se orientam dentro do sítio de ligação (Figura 3.12) e as interações envolvidas.

Conforme demonstrado no **Apêndice C**, as principais interações observadas, responsáveis pelo posicionamento dos ligantes do **grupo 11**, estão presentes na porção metilsulfonilfenil, inserida no bolso lateral do sítio ciclooxigenase da proteína.

Como as substituições, nesse grupo de ligantes, ocorrem no anel benzênico posicionado longitudinalmente no sítio ciclooxygenase, mesmo quando as mesmas provocam pequenos deslocamentos na molécula devido a falta de espaço (impedimento estérico) na parte superior do sítio para acomodar grupos substituintes extensos e/ou volumosos, como no caso do ligante **11d**, esses deslocamentos não são suficientes para comprometer a qualidade das interações mais importantes para a estabilidade dos ligantes no sítio de ligação, localizadas no bolso lateral. Esta situação ficou evidenciada pela não presença de variações significativas nas distâncias e ângulos da ligação CH... π no anel A e pela manutenção das ligações de hidrogênio NH...O e CH...O em todos os complexos formados conforme demonstrado no **Apêndice C**.

Na Figura 3.12 são apresentadas as moléculas do grupo 11 sobrepostas, e o posicionamento das mesmas dentro do sítio ativo Cox da proteína.

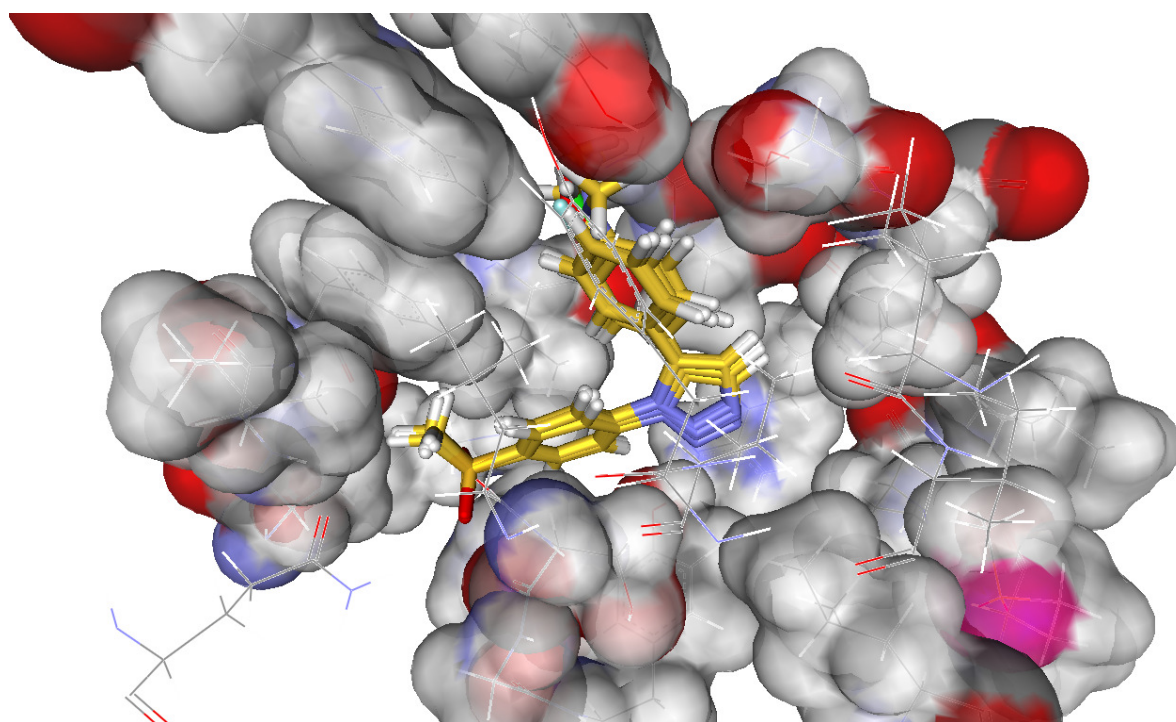


Figura 3.12 Visualização das poses dos ligantes do **grupo 11** no sítio de ligação. As estruturas dos ligantes estão representadas em *stick* com os átomos de carbono em amarelo. A superfície de van der Waals dos resíduos envolvidos no "encaixe" está representada levando-se em consideração os átomos presentes nas estruturas, sendo que a superfície dos resíduos que se encontram acima da região de "encaixe" foi omitida para facilitar a visualização.

3.3.4 Resultados para o Grupo R

O grupo R, o grupo dos análogos do resveratrol que apresentam atividade inibitória para COX-2 conforme o trabalho de Kang et al. (2009), é o mais extenso e diversificado dentre os grupos estudados.

A demonstração das interações realizadas com o sítio de ligação, por cada um dos ligantes do grupo, está detalhada no **Apêndice D**.

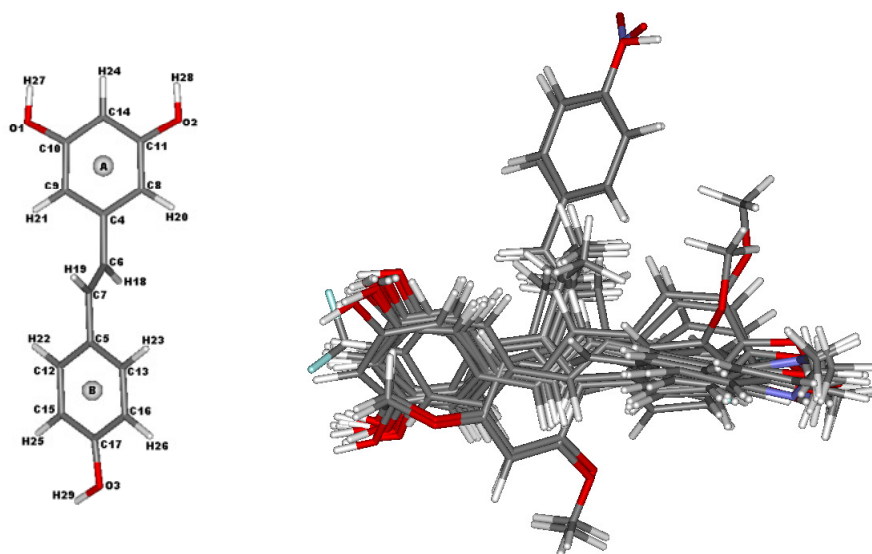


Figura 3.13 Visualização da sobreposição das poses do grupo R selecionadas para avaliação das interações intermoleculares (à direita). A estrutura do Resveratrol esta representada a esquerda para referência.

Todos os compostos do grupo R, classificados quimicamente como estilbenos, ou diariltenos, apresentam dois grupos fenila ligados a cada um dos carbonos da ligação dupla trans do eteno, diferentemente dos grupos anteriores que apresentavam dois grupos fenila ligados a um anel triazol.

Embora os ligantes desse grupo apresentem uma diversidade maior de substituintes, duas orientações básicas foram encontradas para o grupo (Figura 3.13), sendo que, somente dois ligantes apresentaram orientação diversa dos demais. Isso pode estar relacionado com a dupla substituição por grupos metoxi nas posições 3 e 5 de um dos anéis, conforme demonstrado na avaliação das interações realizados por esses ligantes com o sítio de ligação presente no **Apêndice D**.

Nos cálculos de docking realizados, os ligantes **1H6** e **6H14**, posicionaram-se transversalmente (Figura 3.14B) no sítio ciclooxygenase da COX-2 entre as α -hélices 13 e 26, com o grupo substituinte da posição 4 do anel benzênico localizado na porção superior do sítio, próximo aos resíduos tirosina 385 e serina 530 e, com o outro anel, onde estão presentes os substituintes metoxi nas posições 3 e 5, direcionado para a α -hélice 2 do MBD.

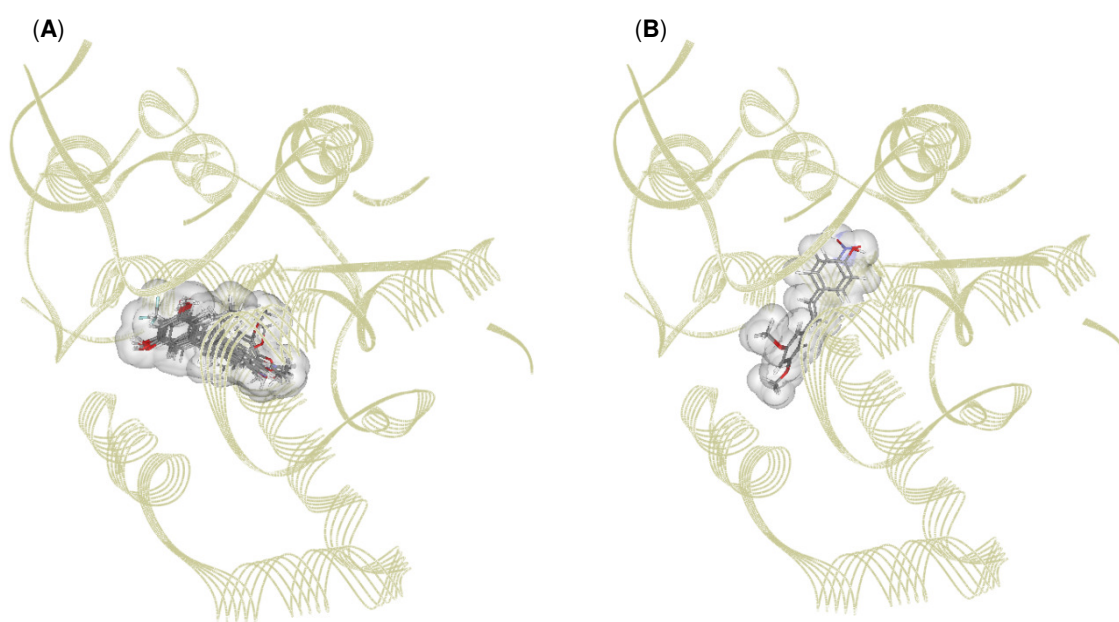


Figura 3.14 Posicionamento dos ligantes do grupo R no sítio ciclooxygenase da COX-2. (B) ligantes **1H6** e **6H14**. (A) demais ligantes do grupo.

As demais moléculas do grupo localizaram-se entre as α -hélices 13 e 26, com um dos anéis ocupando o bolso lateral do sítio e com o outro posicionado na parte inferior do mesmo, próximo à constricção que faz divisa com o canal do MBD (Figura 3.14A). Dessas moléculas, somente o ligante **1M13**, não apresenta os substituintes hidroxí nas posições 3 e 5 do anel inserido no bolso lateral do sítio ciclooxygenase da COX-2. A presença desses substituintes demonstra ser o que determinou o posicionamento desses ligantes.

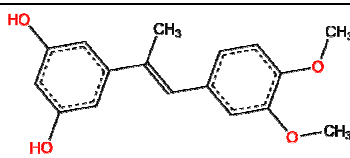
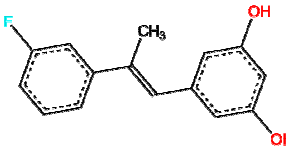
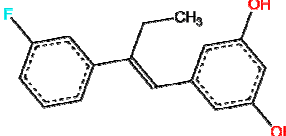
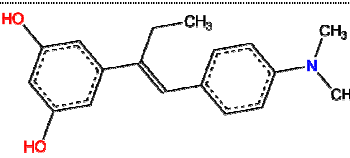
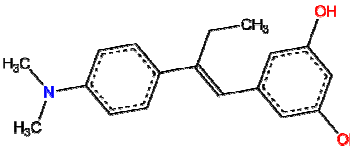
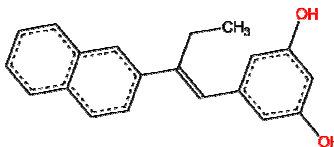
Na Tabela 3.9 estão descritos os valores dos escores obtidos por cada ligante do grupo, bem como os valores de IC_{50} para COX-2 dos mesmos.

Embora o trabalho de Kang et al. (2009), não contemple a molécula do resveratrol como um dos ligantes testados pelo grupo, foram realizados os cálculos de docking para a mesma com o objetivo de se ter um referencial de escore associado aos níveis de inibição que ela apresenta em relação a COX-2.

Tabela 3.9 Escores obtidos pelos ligantes do grupo R.

Ligante	Escore	IC ₅₀ (μM) ^a	Estrutura
1M13	48,14	0,47	
Resveratrol	51,82	0,99 ± 0,40	
1M2	52,08	1,57	
2M1	47,33	1,78	
2M16	47,46	1,74	
6H14	47,20	5,94	
1H6	54,76	0,82	
2H14	55,29	31,6	
2H5	55,32	19,6	
5M2	57,62	16,0	
2H7	58,15	21,3	

Tabela 3.9 Escores obtidos pelos ligantes do grupo R.

Ligante	Escore	IC ₅₀ (μM) ^a	Estrutura
2M7	49,09	12,8	
10M2	50,51	2,54	
10E2	54,18	17,7	
2E16	51,84	2,20	
16E2	47,67	14,8	
15E2	58,34	3,30	

^a Dados obtidos de Kang et al. (2009)

A análise detalhada da Tabela 3.9 não permitiu estabelecer relações claras entre os valores de escore e as concentrações de inibição. A diversidade de posições para substituição, e de grupos substituintes, pode ser o motivo para a dificuldade em se determinar essa relação.

Outra possibilidade pode ter relação com a dificuldade que as funções *fitness* têm para determinar a pose correta para ligantes que apresentam atividade de inibição em concentrações próximas ou superiores a 1,0 μM (KITCHEN et al., 2004).

Na tentativa de minimizar essa dificuldade, foi levado em consideração, para a escolha das poses analisadas, principalmente, a complementaridade atômica entre ligante e o sítio de ligação, a percentagem de repetição nos cálculos de docking e a representatividade do modo de ligação da saída escolhida em relação à série de compostos estudados, conforme proposto por Vega-Tejido; Caracelli; Zukerman-Schpector (2006).

Em virtude do exposto, a análise em nível molecular, das interações e as possíveis relações com as concentrações para inibição (IC_{50}) da COX-2 foram realizadas através da comparação das características de ligação apresentadas entre as moléculas com grupos substituintes similares.

Para os ligantes do **grupo R**, embora não tenha sido possível determinar com clareza, para todos os ligantes, o efeito das substituições por grupos de maior volume na estrutura base, de modo geral, as que ocorrem na posição terminal da estrutura base, posição 4 dos anéis benzênicos, demonstram ter menor importância para a definição da pose apresentada pelo ligante.

Para os ligantes que adotam pose similar a do resveratrol, a explicação para essa observação, deve-se ao fato de não haver impedimento estérico no bolso formado pelos resíduos metionina 113, valina 116, leucina 117 e leucina 359 (Figura 3.15), para acomodar os grupos substituintes terminais, posição 4 do anel benzênico.

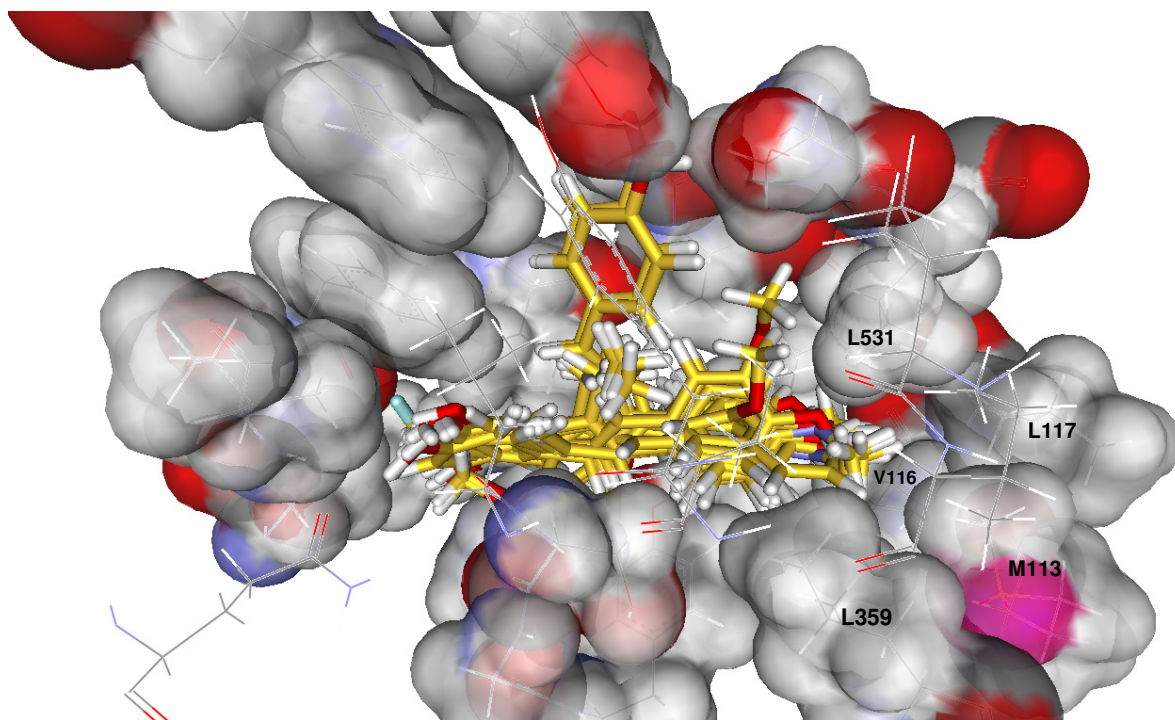


Figura 3.15 Visualização das poses dos ligantes do **grupo R** no sítio de ligação. As estruturas dos ligantes estão representadas em *stick* com os átomos de carbono em amarelo. A superfície de van der Waals dos resíduos envolvidos no "encaixe" está representada levando-se em consideração os átomos presentes nas estruturas, sendo que a superfície dos resíduos que se encontram acima da região de "encaixe" foi omitida para facilitar a visualização.

Para os ligantes, **1H6** e **6H14**, que apresentam pose diferenciada em relação aos outros ligantes do grupo, a explicação para tal contempla as substituições laterais nas posições 3 e 5 do anel benzênico. O aumento no volume lateral do anel provocado pela presença dos grupos metoxi nessas posições, provocou a mudança de posicionamento desses ligantes, por não haver espaço (impedimento estérico) para acomodar os grupos substituintes, na orientação adotada pelos demais ligantes, nem no bolso lateral do sítio Cox formado pelos resíduos leucina 352, serina 353, tirosina 355, fenilalanina 518 e valina 523, nem no bolso formado pelos resíduos metionina 113, valina 116, leucina 117, leucina 359 e leucina 531, na parte inferior do sítio (Figura 3.15).

Quanto à relação entre a presença do grupo substituinte, interação com o sítio e concentrações de inibição (Tabela 3.9), alguns grupos substituintes demonstraram não agregar valores para a estabilização do complexo quando estão presentes. O caso mais claro disso é o do grupo nitro presente nas estruturas **2H14** e **6H14**. Nas duas situações testadas, o grupo substituinte provocou mudanças na conformação das moléculas que prejudicaram a formação de ligações de hidrogênio entre o ligante e o sítio de ligação, quando comparados com os complexos formados para o **resveratrol** e o ligante **1H6**, respectivamente.

Outra substituição que não demonstrou melhorar as condições para a formação do complexo foi a presença do átomo de flúor no anel dos ligantes **10M2** e **10E2**. Nos dois casos, não foram observadas interações importantes envolvendo esse átomo sendo que, nas saídas obtidas pelos cálculos de docking a presença deste em posições invertidas no anel em relação ao sítio não apresentaram diferenciação clara nos valores de escore obtidos. As diferenças nos valores de inibição entre os dois ligantes foram relacionadas com as mudanças na conformação dos ligantes em função da presença dos radicais metila e etila no carbono C7 dos ligantes.

A presença do grupo substituinte metoxi na posição 4, para os ligantes **2H5** e **5M2**, e posição 3 e 4, para os ligantes **2H7** e **2M7**, do anel benzênico, demonstram pela análise dos valores de IC₅₀ dos mesmos (Tabela 3.9), que não são favoráveis para a estabilização do complexo. Embora não tenha sido possível definir, com clareza, os motivos para isso, na visualização das saídas dos cálculos de docking desses ligantes, uma diversidade maior de conformações dos anéis onde estão presentes os grupos metoxi foi encontrada, em comparação com os demais ligantes. Se for considerado que, a presença de diversas conformações para um determinado ligante pode ser um forte indicativo de falta de interações

específicas entre ele e o sítio de ligação, temos uma explicação razoável para as concentrações de inibição apresentada por esses ligantes.

Quanto à presença de grupos metila e etila ligados aos carbonos do eteno, a comparação dos complexos formados para os ligantes **1M2** e **2M1** com o complexo formado para o **resveratrol**, indicam que a presença do grupo metila impõe mudanças na conformação dos mesmos que determinam perda de qualidade nas interações com os anéis, em especial as interações $\text{cátion}\dots\pi$. Para os complexos **10M2** e **10E2**, já citados acima, a troca do grupo metila pelo etila não favoreceu as interações com o sítio de ligação.

Dessa forma, de modo geral, tem-se a percepção de que as substituições pelo grupo metila ou etila no local R2 da molécula base não apresentam benefícios claros para a estabilização dos complexos formados entre os ligantes estudados e o sítio de ligação da COX-2, quando comparados com complexos similares.

Tabela 3.10 Ligantes do grupo R e os resíduos de aminoácidos mais frequentemente envolvidos em interações no sítio ciclooxigenase da COX-2 com seus respectivos valores de escore ($-\text{kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$).

Aminoácido Ligante	H90	V116	R120	Q192	L352	S353	Y355	Y385	R513	A516	I517	F518	V523	S530	L531	Escore	IC ₅₀ (μM)
1M13																48,14	0,47
1H6																54,76	0,82
Resveratrol																51,82	0,99 \pm 0,40
1M2																52,08	1,57
2M16																47,46	1,74
2M1																47,33	1,78
2E16																51,84	2,20
10M2																50,51	2,54
15E2																58,34	3,30
6H14																47,20	5,94
2M7																49,09	12,8
16E2																47,67	14,8
5M2																57,62	16,0
10E2																54,18	17,7
2H5																55,32	19,6
2H7																58,15	21,3
2H14																55,29	31,6

A análise da Tabela 3.10, assim como anteriormente relatado para a Tabela 3.9, não permitiu estabelecer relações claras entre os resíduos de aminoácidos envolvidos em interações, os valores de escore e as concentrações de inibição apresentadas pelos ligantes.

Como discutido anteriormente, esse fato pode estar relacionado com a diversidade de substituintes e de posições de substituições envolvendo os ligantes do grupo R. No entanto, é possível perceber que os resíduos, histidina 90, arginina 120, leucina 352, tirosina 355, arginina 513, fenilalanina 518 e leucina 531, de modo geral, denotam serem importantes para se estabeleçam as interações entre os ligantes desse grupo e o sítio ciclooxigenase da COX-2.

3.3.5 Resultados para o Resveratrol

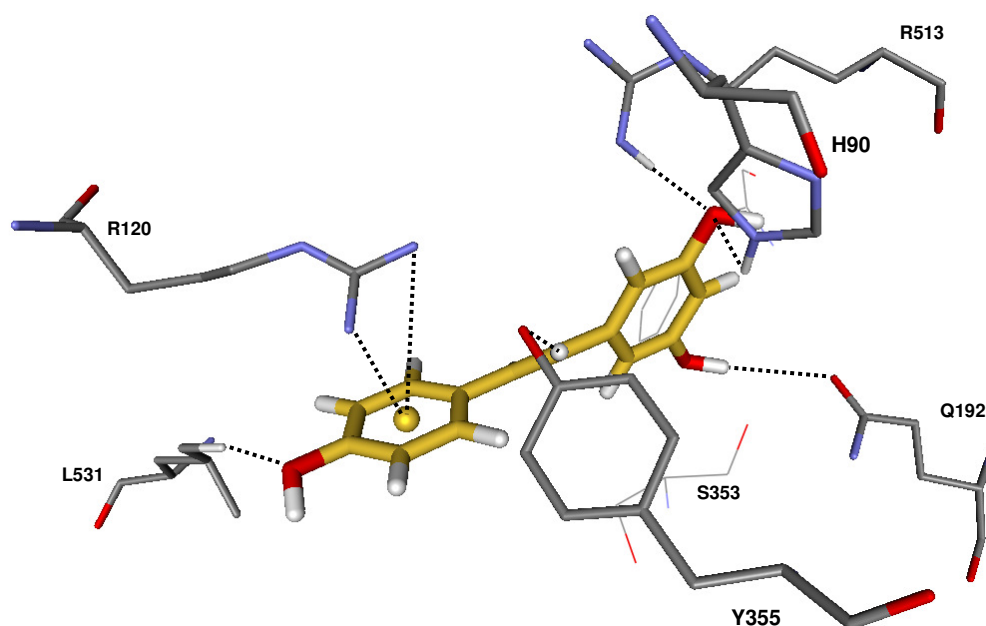


Figura 3.16 Principais interações entre o **resveratrol** (com os carbonos representados em amarelo) e os resíduos do sítio ciclooxigenase da COX-2. Os hidrogênios dos resíduos que não estão envolvidos nas interações (representadas em tracejado) foram omitidos.

A molécula do resveratrol está incluída no grupo de **ligantes R** que se posicionam entre as α -hélices 13 e 26, ocupando o bolso lateral do sítio com o anel substituído nas posições 3 e 5 com grupos hidroxila, e com o outro anel ocupando a parte inferior do sítio Cox, próximo ao bolso formado pelos resíduos metionina 113, valina 116, leucina 117 e leucina 359, logo acima da constrição que faz divisa com o canal do MBD, e representa uma boa aproximação das interações e conformações encontradas para os mesmos.

Entre as principais interações que a molécula apresenta com o sítio de ligação estão duas ligações de hidrogênio NH...O entre os átomos HH11 do resíduo arginina 513 e

HE2 da histidina 90 com o átomo O2 do resveratrol. Ligações de hidrogênio dessa natureza apresentam forte caráter eletrostático pela presença dos grupos carregados participantes.

Apresenta ainda, uma ligação de hidrogênio OH...O entre os átomos OE1 da glutamina 192 e H27 do resveratrol, duas ligações CH...O entre os átomos H18 e O3 do resveratrol e os átomos OH e HD13 da tirosina 355 e leucina 531, respectivamente, e duas interações cátion... π entre o resíduo arginina 120 (átomos NH1 e NH2) e o sistema π do anel B representado por seu centroide, com distâncias de 3,42 Å e 4,12 Å, respectivamente.

3.3.6 A interação CH... π com a serina 353

Conforme demonstrado no **Apêndice D**, dentre os ligantes do grupo R, somente o ligante **1M13** ($IC_{50} = 0,47 \mu\text{M}$) apresentou a interação CH... π entre o sistema π do anel A e o resíduo serina 353.

Entretanto, embora presente no complexo formado para o ligante 1M13, a interação CH... π descrita não apresenta os melhores valores para os parâmetros geométricos definidos para esse tipo de ligação. Mesmo com o átomo HA da serina 353 apontado diretamente para o centroide do sistema π , a inclinação da ligação é desfavorável em relação ao plano do anel.

Essa interação, presente nos complexos formados para todos os ligantes dos grupos 10 e 11 que apresentam baixos valores de IC_{50} , demonstra ser importante para estabilizar o posicionamento do ligante entre as α -hélices 13 e 26.

Na tentativa de posicionar o ligante em um espaço no interior do sítio Cox que promova melhores valores para os parâmetros geométricos da ligação, quatro novos ligantes foram modelados e testados com o objetivo de se determinar as alterações em nível molecular e os escores associados aos cálculos realizados.

Foi utilizado como estrutura base para os ligantes modelados, o ligante 1M13.

Para promover o deslocamento do ligante modelado em direção ao espaço inferior do sítio Cox, formado pelos resíduos metionina 113, valina 116, leucina 117, leucina 359 e leucina 531, e conseqüentemente posicioná-lo melhor em relação à ligação CH... π , o grupo trifluormetil foi substituído pelo grupo triclorometil no ligante 1M_CL3 e pelo grupo metilsulfonil no ligante 1M_SM. Duas variações desses ligantes, sem o grupo metila,

1H_CL3 e 1H_SM, também foram modeladas com o objetivo de observar a influência da metila no posicionamento e nos valores de escore desses ligantes.

Os parâmetros geométricos envolvendo aos átomos HA e CA da serina 353 e os sistemas π do anel, foram discriminados na Tabela 3.11, pois demonstram ter relação com os valores de escore obtidos.

Tabela 3.11 Comparação entre valores de escore dos ligantes teste e do ligante 1M13.

Ligante	Escore	Ligação Ser353:HA... π Distância (Å)	α	ω	IC ₅₀ (μ M)
1M13	48,14	2,66	170°	33,5°	0,47
1M_CL3	52,16	2,49	169°	28,4°	-
1M_SM	58,94	2,51	164°	26,9°	-
1H_CL3	58,93	2,71	166°	26,7°	-
1H_SM	61,97	2,34	168°	16,1°	-

A análise das saídas dos cálculos de docking representadas nas Figuras 3.17-3.20 demonstra que existe uma relação entre a qualidade da ligação CH... π e a estabilidade do complexo formado, conforme demonstrado pelos valores de escore obtidos. Todos os ligantes modelados apresentaram melhorias em relação aos parâmetros que definem a ligação CH... π .

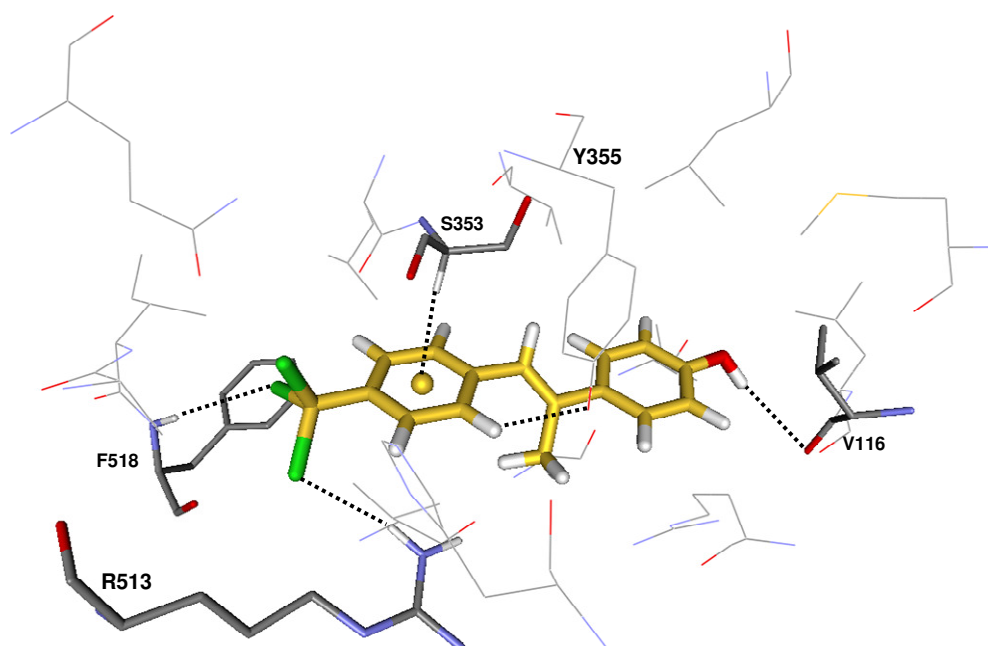


Figura 3.17 Principais interações entre o ligante 1M_CL3 (com os carbonos representados em amarelo) e os resíduos do sítio ciclooxigenase da COX-2. Os hidrogênios dos resíduos que não estão envolvidos nas interações (representadas em tracejado) foram omitidos.

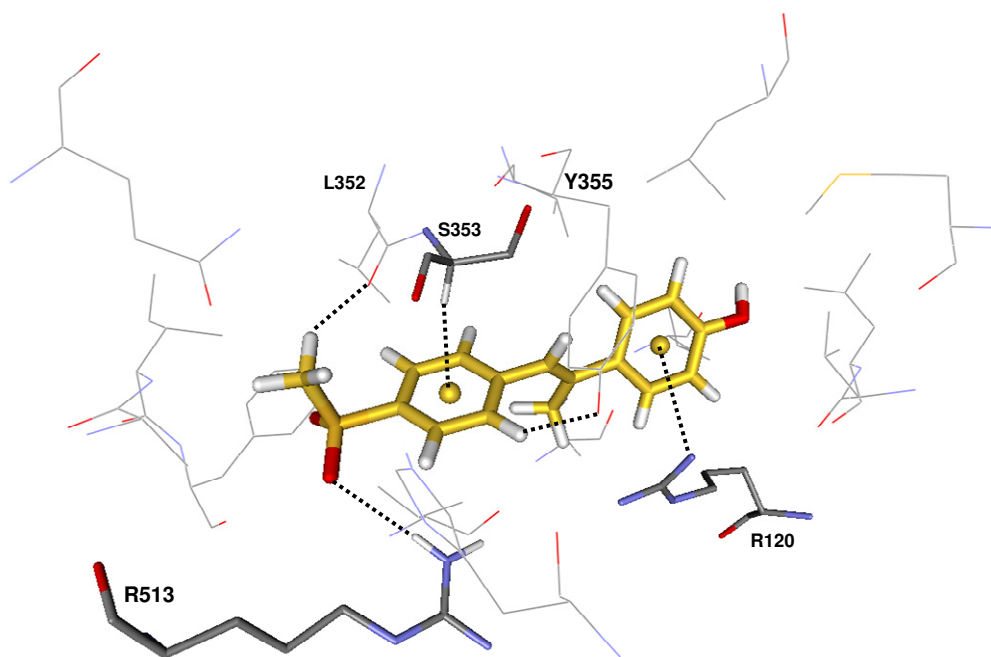


Figura 3.18 Principais interações entre o ligante **1M_SM** (com os carbonos representados em amarelo) e os resíduos do sítio ciclooxygenase da COX-2. Os hidrogênios dos resíduos que não estão envolvidos nas interações (representadas em tracejado) foram omitidos.

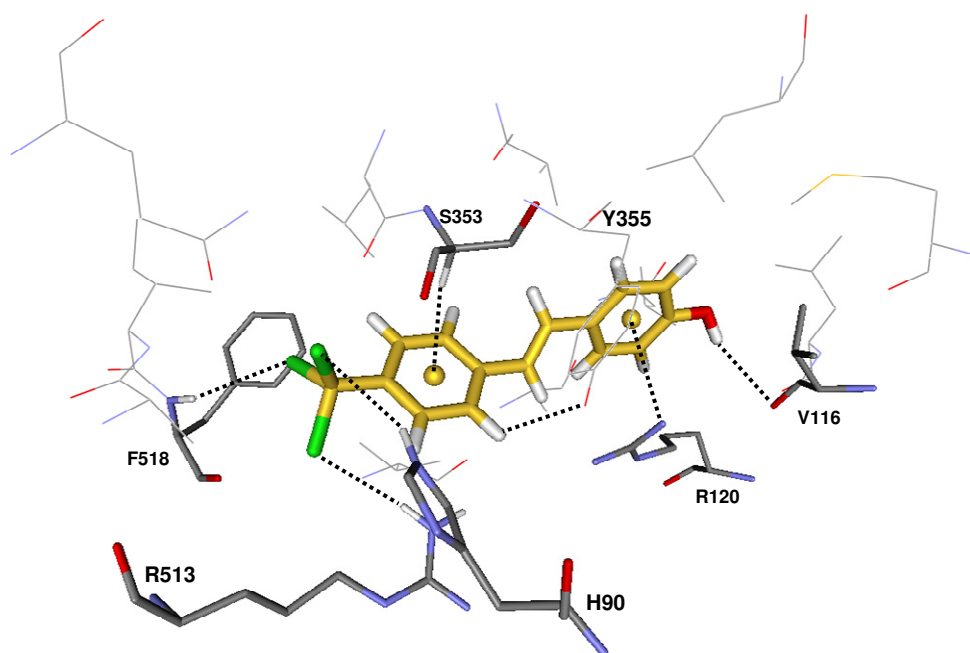


Figura 3.19 Principais interações entre o ligante **1H_CL3** (com os carbonos representados em amarelo) e os resíduos do sítio ciclooxygenase da COX-2. Os hidrogênios dos resíduos que não estão envolvidos nas interações (representadas em tracejado) foram omitidos.

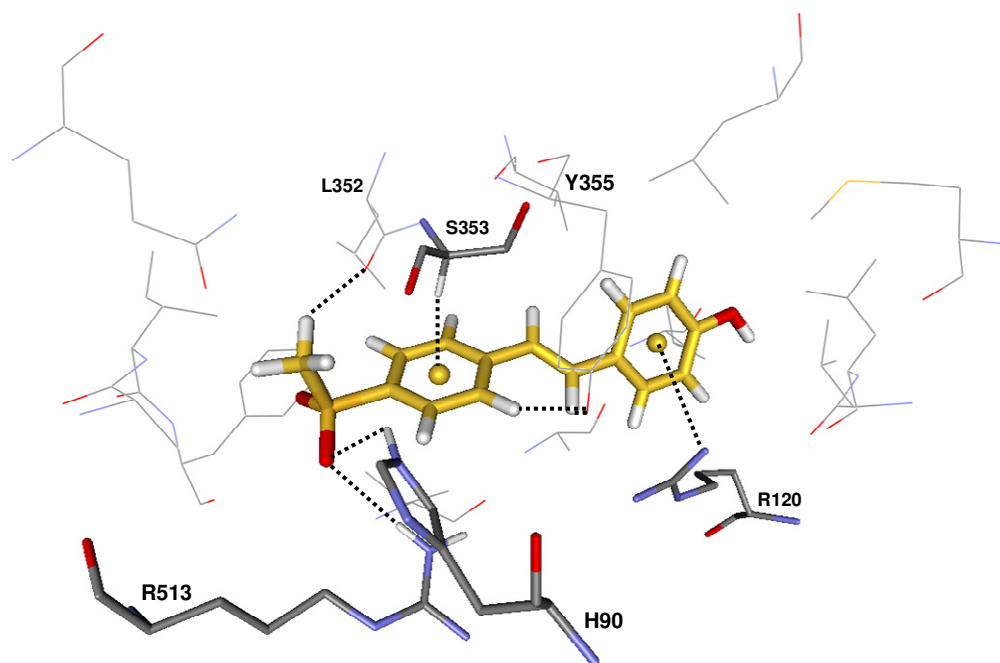


Figura 3.20 Principais interações entre o ligante **1H_SM** (com os carbonos representados em amarelo) e os resíduos do sítio ciclooxygenase da COX-2. Os hidrogênios dos resíduos que não estão envolvidos nas interações (representadas em tracejado) foram omitidos.

Acredita-se que a presença da interação CH... π da maneira descrita para os complexos dos grupos 10 e 11 e para o ligante 1M13, posicione o ligante de forma a permitir a realização de outras interações importantes com os resíduos: histidina 90, arginina 120, leucina 352, tirosina 355 e arginina 513, observadas na maioria dos complexos citados.

Nas simulações realizadas, os escores associados aos complexos formados indicam que essas interações foram facilitadas quando o grupo metila não estava presente no carbono da ligação dupla do eteno, como observado para os ligantes 1H_CL3 e 1H_SM, que apresentam melhores escores quando comparados, respectivamente, com os ligantes 1M_CL3 e 1M_SM.

Esses resultados reforçam a percepção anterior de que a substituição do hidrogênio por grupos maiores na posição R2 não favorece energeticamente, de modo geral, a formação do complexo ligante/enzima.

A análise das interações encontradas no complexo do ligante 1H_SM: ligação CH... π com o resíduo serina 353, ligações CH...O envolvendo os resíduos leucina 352 e tirosina 355, ligações NH...O envolvendo os resíduos histidina 90 e arginina 513, ligação

cátion... π envolvendo o resíduo arginina 120, o maior valor de escore calculado dentre os ligantes testados, indicam que, possivelmente, esse ligante, sendo sintetizado, deva apresentar boa atividade inibitória para COX-2 *in vitro*.

CAPÍTULO 4

Conclusões

Os estudos realizados, por cálculos de docking, para os complexos formados entre a proteína COX-2 e os ligantes dos grupos **10**, **11** e **R**, permitiram inferir algumas observações comuns aos ligantes estudados.

Para os ligantes do **grupo 10**, conforme mostrado e discutido na Seção 3.3.2 e Apêndice B, a substituição do hidrogênio 31 pelo grupo dimetilamina na estrutura base (ligante 10a), não favoreceu a melhor orientação para o ligante 10d, quando comparado ao restante do grupo. Nos complexos formados nos cálculos de docking para os ligantes desse grupo, a principal consequência do aumento na extensão das moléculas, devido às substituições na posição 31, foi a perda de qualidade nas interações entre os sistemas π de seus anéis e os resíduos de aminoácidos do sítio ativo da enzima, nas poses apresentadas.

Embora, para o **grupo 11**, essas substituições na posição 31 tenham apresentado muito pouca interferência nas interações realizadas com os anéis dos ligantes, deve ser considerado que, de modo geral, substituições por grupos ou átomos volumosos, nas posições realizadas nas estruturas base estudadas não favoreceram a qualidade das interações.

Para o **grupo R**, na posição **R2**, substituições por grupos maiores/volumosos não demonstraram serem favoráveis à conformação adotada e às interações entre os sistemas π dos anéis dos ligantes e os resíduos de aminoácidos do sítio ativo.

As interações envolvendo o sistema π dos anéis dos compostos estudados apresentam papel determinante para as conformações adotadas pelos mesmos no sítio de ligação ciclooxigenase da proteína, sendo que, a interação CH... π envolvendo o resíduo serina 353 demonstra ser importante para o estabelecimento de interações, no bolso lateral do sítio Cox, favoráveis energeticamente à formação do complexo enzima/inibidor.

Os ligantes estudados tendem a se posicionar entre as α -hélices 13 e 26, com um dos substituintes aril posicionado no bolso lateral do sítio ciclooxigenase da COX-2, o metilsulfonilfenil para os grupos 10 e 11 e o 3,5-dihidroxifenil para o grupo R, sendo que, para os ligantes que apresentam conformação estendida, grupo 10 e grupo R, o substituinte aril, oposto ao localizado no bolso lateral do sítio Cox, tende a ocupar o bolso formado pelos resíduos metionina 113, valina 116, leucina 117, leucina 359 e leucina 531, na parte inferior do sítio, em sua porção inicial, próximo a região de constrição que separa o sítio Cox do canal formado pelas α -hélices do MBD.

Para os ligantes estudados, a análise visual das poses obtidas mostra que, a presença de interações entre o sistema π de um dos anéis aromáticos dos mesmos e o resíduo

serina 353, acompanhadas de outras interações que envolvam pelo menos quatro dos seguintes resíduos, a saber: histidina 90, arginina 120, leucina 352, tirosina 355, arginina 513 e valina 523, simultaneamente, são um indicativo de uma possível inibição da atividade ciclooxigenase da enzima COX-2 pelo composto.

Os dados apresentados nas Tabelas 3.6, 3.8 e 3.10, reforçam a percepção descrita acima ao mostrar que estes aminoácidos apresentam-se frequentemente envolvidos nas interações com os ligantes que tem os mais baixos valores, determinados experimentalmente, de IC_{50} .

Outro ponto que deve ser destacado na análise dessas tabelas, está relacionado à frequência de interações envolvendo os resíduos polares, histidina 90, arginina 120, tirosina 355 e arginina 513 nos complexos formados, indicando que as interações eletrostáticas são importantes para a definição das poses apresentadas pelos ligantes estudados, ainda que em um sítio predominantemente hidrofóbico.

Diante do exposto, acredita-se que os objetivos propostos neste trabalho tenham sido alcançados, ao proporcionar explicação e entendimento das principais características moleculares e estruturais favoráveis para a formação dos complexos proteína-ligantes estudados, a melhor orientação geral para os mesmos no sítio ciclooxigenase da COX-2 e, os principais mecanismos envolvidos na capacidade inibitória apresentada pelos ligantes identificados por baixos valores de IC_{50} .

Considerando-se que efeitos colaterais podem estar relacionados com as características estruturais e conformacionais da molécula utilizada como fármaco, entende-se que os resultados descritos são de singular importância, pois favorecem a percepção de que outras moléculas, não similares às utilizadas comercialmente, podem apresentar bons resultados quanto à especificidade e capacidade de inibição da COX-2.

Referências

ACCELRY'S INC. - ACCELRY'S. **Discovery Studio Visualizer 3.0**. San Diego, CA, 2011.

ADVANCED CHEMISTRY DEVELOPMENT - ACD. **ACD/ChemSketch Freeware**: a free comprehensive chemical drawing package. Disponível em: <<http://www.acdlabs.com/resources/freeware/chemsketch/>>. Acesso em: 30 set. 2009.

AID, S.; BOSETTI, F. Targeting cyclooxygenases-1 and -2 in neuroinflammation: therapeutic implications. **Biochimie**, v. 93, n. 1, p. 46-51, jan. 2011.

AID, S.; LANGENBACH, R.; BOSETTI, F. Neuroinflammatory response to lipopolysaccharide is exacerbated in mice genetically deficient in cyclooxygenase-2. **Journal of Neuroinflammation**, v. 5, n. 17, mai. 2008.

ARMELIN, P.R.G. **Modelagem Molecular de Derivados Pirimidínicos e Estudo de Docking nas Enzimas Ciclooxygenase 1 e Ciclooxygenase 2**. 2010. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade Federal de São Carlos, Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior.

ARMEN, R. S.; CHEN, J.; BROOKS III, C. L. An evaluation of explicit receptor flexibility in molecular docking using molecular dynamics and torsion angle molecular dynamics. **Journal of Chemical Theory and Computation**, v. 5, n. 10, p. 2909-2923, out. 2009

BALA, M.; CHIN, C. N.; LOGAN, A. T.; AMIN, T.; MARNETT, L. J.; BOUTAUD, O. OATES, J. A. Acetylation of prostaglandin H₂ synthases by aspirin is inhibited by redox cycling of the peroxidase. **Biochemical Pharmacology**, v. 75, n. 7, p. 1472-1481, abr. 2008.

BARREIRO, E. J.; FRAGA, C. A. M. **Química medicinal**: as bases moleculares da ação dos fármacos. 2. ed. Porto Alegre: Artmed, 2008. 536 p.

BAYER HEALTHCARE - BAYER. **Linha do tempo Aspirina**. Disponível em: <<http://www.aspirina.com.br/espaco-aspirina/linha-do-tempo/linha-do-tempo.php>>. Acesso em: 16 dez. 2010.

BENSON, D. A.; KARSCH-MIZRACHI, I; LIPMAN, D. J.; OSTELL, J.; WHEELER, D. L. GenBank. **Nucleic Acids Research**, v. 36, p. D25-D30, 2008.

BOEHR, D. D.; FARLEY, A. R.; WRIGHT, G. D.; COX, J. R. Analysis of the π - π stacking interactions between the aminoglycoside antibiotic kinase aph(3')-iiiia and its nucleotide ligands. **Chemistry & Biology**, v. 9, p. 1209-1217, nov. 2002.

BOMBARDIER, C.; LAINE, L.; REICIN, A.; SHAPIRO, D.; BURGOS-VARGAS, R.; DAVIS, B.; DAY, R.; FERRAZ, M. B.; HAWKEY, C. J.; HOCHBERG, M. C.; KVIEN, T. K.; SCHNITZER, T. J. Comparison of upper gastrointestinal toxicity of rofecoxib and naproxen in patients with rheumatoid arthritis. **The New England Journal of Medicine**, v. 343, n. 21, p. 1520-1528, nov. 2000.

BOTTAZZI, G.; DOSI, G.; LIPPI, M.; PAMMOLLI, F.; RICCABONI, M. Innovation and corporate growth in the evolution of the drug industry. **International Journal of Industrial Organization**, v. 19, n. 7, p. 1161-1187, jul. 2001.

BRANDL, M.; WEISS, M. S.; JABS, A.; SÜHNEL, J.; HILGENFELD, R. C-H... π -interactions in proteins. **Journal of Molecular Biology**, v. 307, n. 1, p. 357-377, mar. 2001.

BRESALIER, R. S.; SANDLER, R. S.; QUAN, H.; BOLOGNESE, J. A.; OXENIUS, B.; HORGAN, K.; LINES, C.; RIDDELL, R.; MORTON, D.; LANAS, A.; KONSTAM, M. A.; BARON, J. A. Cardiovascular events associated with rofecoxib in a colorectal adenoma chemoprevention trial. **The New England Journal of Medicine**, v. 352, n. 11, p. 1092-1102, mar. 2005.

BROOIJMANS, N.; KUNTZ, I. D. Molecular recognition and docking algorithms. **Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure**, v. 32, p. 353-373, jun. 2003.

BURLEY, S. K.; PETSKO, G. A. Aromatic-aromatic interaction: a mechanism of protein structure stabilization. **Science**, v. 229, p. 23-28, jul. 1985.

BURLEY, S. K.; PETSKO, G. A. Amino-aromatic interactions in proteins. **Federation of European Biochemical Societies**, v. 203, n. 2, p. 139-143, jul. 1986.

CAMBRIDGE CRYSTALLOGRAPHIC DATA CENTRE - CCDC. **Gold Help**. Disponível em: <http://www.ccdc.cam.ac.uk/support/documentation/gold/5_0/gold/gold.1.3.html> Acesso em: 20 jan. 2011.

CARACELLI, I.; ZUKERMAN-SCHPECTOR, J. **Introdução a Biofísica Estrutural**. São Carlos: EdUFSCar, 2006. 69 p.

CARACELLI, Ignez; ZUKERMAN-SCHPECTOR, Julio; MAGANHI, Stella H.; STEFANI, Hélio A.; GUADAGNIN, Rafael; TIEKINK, Edward R. T. 2-chlorovinyl tellurium dihalides, (p-tol)Te[C(H)=C(Cl)Ph]X₂ for X = Cl, Br and I: variable coordination environments, supramolecular structures and docking studies in cathepsin B. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 21, p. 2155-2163, 2010.

CHANDRASEKHARAN, N. V.; DAI, H.; ROOS, K. L. T.; EVANSON, N. K.; TOMSIK, J.; ELTON, T. S.; SIMMONS, D. L. 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 of the United States of America**, v. 99, n. 21, p. 13926-13931, out. 2002.

CHANDRASEKHARAN, N. V.; SIMMONS, D. L. The cyclooxygenases. **Genome Biology**, v. 5, n. 9, art. 241, p. 1-7, ago. 2004.

CORBEIL, C. R.; MOITESSIER, N. Docking ligands into flexible and solvated macromolecules. 3. impact of input ligand conformation, protein flexibility, and water molecules on the accuracy of docking programs. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 49, n. 4, p. 997-1009, 2009.

COSTA FILHO, P. A.; POPPI, R. J. Algoritmo genético em química. **Química Nova**, v. 22, n. 3, mai./jun.1999.

CUMMINGS, M. D.; DesJARLAIS, R. L.; GIBBS, A. C.; MOHAN, V.; JAEGER, E. P. Comparison of automated docking programs as virtual screening tools. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 48, n. 4, p. 962-976, jan. 2005.

CUNHA, Rodrigo Luiz Oliveira Rodrigues; ZUKERMAN-SCHPECTOR, J.; CARACELLI, I.; COMASSETTO, Joao Valdir. Revisiting the addition reaction of TeCl_4 to alkynes: The crystal structure and docking studies of 1-chloro-2-trichlorotelluro-3-phenyl-propen-2-ol. **Journal of Organometallic Chemistry**, v. 691, p. 4807-4815, 2006.

DARGAHI, L.; NASIRAEI-MOGHADAM, S.; ABDI, A.; KHALAJ, L.; MORADI, F.; AHMADIANI, A. Cyclooxygenase (COX)-1 activity precedes the COX-2 induction in $\text{A}\beta$ -induced neuroinflammation. **Journal of Molecular Neuroscience**, mai. 2010.

DESIRAJU, G. R. A bond by any other name. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 50, n. 1, p. 52-59, jan. 2011.

DeWITT, D. L.; SMITH, W. L. Primary structure of prostaglandin G/H synthase from sheep vesicular gland determined from the complementary DNA sequence. **Proceedings of National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 85, n. 5, p. 1412-1416, mar. 1988.

DEY, I.; KELLER, K.; BELLEY, A.; CHADEE, K. Identification and characterization of a cyclooxygenase-like enzyme from *Entamoeba histolytica*. **Proceedings of National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 100, n. 23, p. 13561-13566, nov. 2003.

DIETZ, R.; NASTAINCZYK, W.; RUF, H. H. Higher oxidation states of prostaglandin H synthase: rapid electronic spectroscopy detected two spectral intermediates during the peroxidase reaction with prostaglandin G_2 . **European Journal of Biochemistry**, v. 171, n. 1-2, p. 321-328, jan. 1988.

DiMASI, J. A.; HANSEN, R. W.; GRABOWSKI, H. G.. The price of innovation: new estimates of drug development costs. **Journal of Health Economics**, v. 22, n. 2, p. 151-185, mar. 2003.

DONK, W. A. van der.; TSAI, A. L.; KULMACZ, R. J. The cyclooxygenase reaction mechanism. **Biochemistry**, v. 41, n. 52, p. 15451-15458, dez. 2002.

DUGGAN, K. C.; WALTERS, M. J.; MUSEE, J.; HARP, J. M.; KIEFER, J. R.; OATES, J. A.; MARNETT, L. J. Molecular basis for cyclooxygenase inhibition by the non-steroidal anti-inflammatory drug naproxen. **Journal of Biological Chemistry**, v. 285, n. 45, nov. 2010.

ERMONDI, G.; CARON, G. Recognition forces in ligand-protein complexes: blending information from different sources. **Biochemical Pharmacology**, v. 72, p. 1633-1645, 2006.
FORREST, S. Genetic algorithms: principles of natural selection applied to computation. **Science**, v. 261, ago. 1993.

GAJRAJ, N. M. Cyclooxygenase-2 inhibitors. **Anesthesia & Analgesia**, v. 96, n. 6, p. 1720-1738, jun. 2003.

GALLIVAN, J. P.; DOUGHERTY, D. A. Cation- π interactions in structural biology. **Proceedings of National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 96, p. 9459-9464, ago. 1999.

GARAVITO, R. M.; MALKOWSKI, M. G.; DeWITT, D. L. The structures of prostaglandin endoperoxide H synthases-1 and -2. **Prostaglandins & other Lipid Mediators**, n. 68-69, p. 129-152, ago. 2002.

GEORIS, J.; ESTEVES, F. D. L. E.; LAMOTTE-BRASSEUR, J.; BOUGNET, V.; DEVREESE, B.; GIANNOTTA, F.; GRANIER, B.; FRÈRE, J. An additional aromatic interaction improves the thermostability and thermophilicity of a mesophilic family 11 xylanase: structural basis and molecular study. **Protein Science**, v. 9, n. 3, p. 466-475, mar. 2000.

GIERSE, J. K.; ZHANG, Y.; HOOD, W. F.; WALKER, M. C.; TRIGG, J. S.; MAZIASZ, T. J.; KOBOLDT, C. M.; MUHAMMAD, J. L.; ZWEIFEL, B. S.; MASFERRER, J. L.; ISAKSON, P. C.; SEIBERT, K. Valdecoxib: assessment of cyclooxygenase-2 potency and selectivity. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 312, n. 3, p. 1206-1212. mar. 2005.

GILLI, G. Modern Hydrogen Bonding Theory. In: 23rd European Crystallographic Meeting, ECM23, Leuven, 2006. **Acta Crystallographica**, v. A62, p. s3, 2006.

GOHLKE, H.; KLEBE, G. Approaches to the description and prediction of the binding affinity of small-molecule ligands to macromolecular receptors. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 41, n. 15, p. 2644-2676, ago. 2002.

HANKEY, C. J. Cox-2 inhibitors. **The Lancet**, v. 353, p. 307-314, jan. 1999.

HART, F. D.; BOARDMAN, P. L. Indomethacin: a new non-steroid anti-inflammatory agent. **British Medical Journal**, v. 19, n. 2, p. 965-970, out. 1963.

HOOD, W. F.; GIERSE, J. K.; ISAKSON, P. C.; KIEFER, J. R.; KURUMBAIL, R. G.; SEIBERT, K.; MONAHAN, J. B. Characterization of celecoxib and valdecoxib binding to cyclooxygenase. **Molecular Pharmacology**, v. 63, n. 4, p. 870-877. abr. 2003.

HUANG, S. Y.; GRINTER, S. Z.; ZOU, X. Scoring functions and their evaluation methods for protein-ligand docking: recent advances and future directions. **Physical Chemistry Chemical Physics**, v. 12, n. 40, p. 12899-12908, out. 2010.

HYPERCUBE, INC. - HYPERCUBE. **HYPERCHEM**: release 6.01 for Windows. Gainesville, FL, 2000.

INTERNATIONAL UNION OF PURE AND APPLIED CHEMISTRY - IUPAC. Defining the hydrogen bond: an account. **Technical Report**, jan. 2010a. Disponível em: <http://media.iupac.org/reports/provisional/abstract11/arunan_tr.pdf>. Acesso: 20 jan. 2011.

INTERNATIONAL UNION OF PURE AND APPLIED CHEMISTRY - IUPAC. Definition of the hydrogen bond. **Provisional Recommendation**, out. 2010b. Disponível em: <http://media.iupac.org/reports/provisional/abstract11/arunan_prs.pdf>. Acesso: 20 jan. 2011.

JACK, D. B. One hundred years of aspirin. **The Lancet**, v. 350, n. 9075, p. 437-439, ago. 1997.

JONES, G.; WILLETT, P.; GLEN, R. C.; LEACH, A. R.; TAYLOR, R. Development and validation of a genetic algorithm for flexible docking. **Journal of Molecular Biology**, v. 267, n. 3, p. 727-748, abr. 1997.

JONES, G.; WILLETT, P.; GLEN, R. C. Molecular recognition of receptor sites using a genetic algorithm with a description of desolvation. **Journal of Molecular Biology**, v. 245, n. 1, p. 43-53, jan. 1995.

KALGUTKAR, A. S.; CREWS, B. C.; ROWLINSON, S. W.; GARNER, C.; SEIBERT, K.; MARNETT, L. J. Aspirin-like molecules that covalently inactivate cyclooxygenase-2. **Science**, v. 280, n. 5367, p. 1268-1270, mai. 1998.

KANG, S. S.; CUENDET, M.; ENDRINGER, D. C.; CROY, V. L.; PEZZUTO, J. M.; LIPTON, M. L. Synthesis and biological evaluation of a library of resveratrol analogues as inhibitors of COX-1, COX-2 and NF- κ B. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 17, n. 3, p. 1044-1054, fev. 2009.

KANNAN, N.; VISHVESHWARA, S. Aromatic clusters: a determinant of thermal stability of thermophilic proteins. **Protein Engineering**, v. 13, n. 11, p. 753-761, 2000.

KIEFER, J. R.; PAWLITZ, J. L.; MORELAND, K. T.; STEGEMAN, R. A.; HOOD, W. F.; GIERSE, J. K.; STEVENS, A. M.; GOODWIN, D. C.; ROWLINSON, S. W.; MARNETT, L. J.; STALLINGS, W. C.; KURUMBAIL, R. G. Structural insights into the stereochemistry of the cyclooxygenase reaction. **Nature**, v. 405, n. 6782, p. 97-101, mai. 2000.

KITCHEN, D. B.; DECORNEZ, H.; FURR, J. R.; BAJORATH, J. Docking and scoring in virtual screening for drug discovery: methods and applications. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 3, n. 11, p. 935-949, nov. 2004.

KONTOYIANNI, M.; McCLELLAN, L. M.; SOKOL, G. S. Evaluation of docking performance: comparative data on docking algorithms. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 47, n. 3, p. 558-565, jan. 2004.

KOSAKA, T.; MIYATA, A.; IHARA, H.; HARA, S.; SUGIMOTO, T.; TAKEDA, O.; TAKAHASHI, E.; TANABE, T. Characterization of the human gene (PTGS2) encoding prostaglandin-endoperoxide synthase 2. **European Journal of Biochemistry**, v. 221, n. 3, p. 889-897, mai. 1994.

KOSHKIN, V.; DUNFOR, H. B. Coupling of the peroxidase and cyclooxygenase reactions of prostaglandin H synthase. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1430, n. 2, p. 341-348, mar. 1999.

KOZAK, K. R.; PRUSAKIEWICZ, J. J.; ROWLINSON, S. W.; SCHNEIDER, C.; MARNETT, L. J. Amino acid determinants in cyclooxygenase-2 oxygenation of the endocannabinoid 2-arachidonylglycerol. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 32, p. 30072-30077, ago. 2001.

KUJUBU, D. A.; FLETCHER, B. S.; VARNUM, B. C.; LIM, R. W.; HERSCHMAN, H. R. TIS10, a phorbol ester tumor promoter-inducible mRNA from swiss 3T3 cells, encodes a

novel prostaglandin synthase/cyclooxygenase homologue. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 266, n. 20, p. 12866-12873, jul. 1991.

KULMACZ, R. J. Regulation of cyclooxygenase catalysis by hydroperoxides. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 338, n. 1, p. 25-33, dez. 2005.

KURUMBAIL, R. G.; STEVENS, A. M.; GIERSE, J. K.; McDONALD, J. J.; STEGEMAN, R. A.; PAK, J. Y.; GILDEHAUS, D.; MIYASHIRO, J. M.; PENNING, T. D.; SEIBERT, K.; ISAKSON, P. C.; STALLINGS, W. C. Structural basis for selective inhibition of cyclooxygenase-2 by anti-inflammatory agents. **Nature**, v. 384, n. 6610, p. 644-648, dez. 1996.

LATIMER, W. M.; RODEBUSH, W. H. Polarity and ionization from the standpoint of the lewis theory of valence. **Journal of the American Chemical Society**, v. 42, p. 1419-1433, 1920.

LI, H.; WU, W. K. K.; ZHENG, Z.; CHE, C. T.; LI, Z. J.; XU, D. D.; WONG, C. C. M.; YE, C. G.; SUNG, J. J. Y.; CHO, C. H.; WANG, M. 3,3',4,5,5'-pentahydroxy-trans-stilbene, a resveratrol derivative, induces apoptosis in colorectal carcinoma cells via oxidative stress. **European Journal of Pharmacology**, v. 637, n. 1-3, p. 55-61, jul. 2010.

LI, X.; LI, Y.; CHENG, T.; LIU, Z.; WANG, R. Evaluation of the performance of four molecular docking programs on a diverse set of protein-ligand complexes. **Journal of Computational Chemistry**, v. 31, n. 11, p. 2109-25, ago. 2010.

LOLL, P. J.; PICOT, D.; GARAVITO, M. The structural basis of aspirin activity inferred from the crystal structure of inactivated prostaglandin H₂ synthase. **Nature Structural & Molecular Biology**, v. 2, n. 8, p. 637-643, ago. 1995.

LUONG C.; MILLER, A.; BARNETT, J.; CHOW, J.; RAMESHA, C.; BROWNER, M. F. Flexibility of the NSAID binding site in the structure of human cyclooxygenase-2. **Nature Structural & Molecular Biology**, v. 3, p. 927-933, 1996.

MA, J. C.; DOUGHERTY, D. A. The cation- π interaction. **Chemical Reviews**, v. 97, n. 5, p. 1303-1324, ago. 1997.

McGAUGHEY, G. B.; GAGNÉ, M.; RAPPÉ, A. K.. π -stacking interactions: alive and well in proteins. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 273, n. 25, p. 15458-15463, jun. 1998.

MERCK & CO., INC. - MERCK. Merck announces voluntary worldwide withdrawal of Vioxx®. **News Release**, set. 2004. Disponível em: <http://www.merck.com/newsroom/vioxx/pdf/vioxx_press_release_final.pdf>. Acesso em: 16 dez. 2010.

MERLIE, J. P.; FAGAN, D.; MUDD, J.; NEEDLEMAN, P. Isolation and characterization of the complementary dna for sheep seminal vesicle prostaglandin endoperoxide synthase (cyclooxygenase). **The Journal of Biological Chemistry**, v. 263, n. 8, p. 3550-3553, mar. 1988.

MEYER, E. A.; CASTELLANO, R. K.; DIEDERICH, F. Interactions with aromatic rings in chemical and biological recognition. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 42, n. 11, p. 1210-1250, mar. 2003.

MIFFLIN, R. C.; POWEL, D. W. Cyclooxygenases. **The Regulatory Peptide Letter**, v. VIII, n. 4, 2001.

MUKHERJEE, D.; NISSEN, S. E.; TOPOL, E. J. Risk of cardiovascular events associated with selective cox-2 inhibitors. **The Journal of the American Medical Association**, v. 286, n. 8, p. 954-959, ago. 2001.

NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION - NCBI. PubChem Compound Database. **CID=21859783**. Disponível em: <http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/summary/summary.cgi?cid=21859783&loc=ec_rcs>. Acesso em: 22 jul. 2010.

NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION - NCBI. PubChem Compound Database. **CID=445154**. Disponível em: <http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/summary/summary.cgi?cid=445154&loc=ec_rcs>. Acesso em: 22 jul. 2010.

NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION - NCBI. PubChem Compound Database. **CID=44581926**. Disponível em: <http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/summary/summary.cgi?cid=44581926&loc=ec_rcs>. Acesso em: 22 jul. 2010.

ONODERA, K.; SATOU, K.; HIROTA, H. Evaluations of molecular docking programs for virtual screening. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 47, n. 4, p. 1609-1618, 2007.

OTTO, J. C.; DeWITT, D. L.; SMITH, W. L. N-glycosylation of prostaglandin endoperoxide synthases 1- and -2 and their orientations in the endoplasmic reticulum. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 268, n. 24, p. 18234-18242, ago. 1993.

PROTEIN DATA BANK - PDB. Disponível em: <<http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>>. Acesso em: 22 jan. 2011.

PROTEIN DATA BANK SUMMARY - PDBSum. Disponível em: <<http://www.ebi.ac.uk/pdbsum/>>. Acesso em: 22 jan. 2011.

PICOT, D.; GARAVITO, R. M. Prostaglandin H synthase: implications for membrane structure. **FEBS Letters**, v. 346, n. 1, p. 21-25, jun. 1994.

RAO, P. N. P.; KNAUS, E. E. Evolution of nonsteroidal anti-inflammatory drugs (nsaids): cyclooxygenase (cox) inhibition and beyond. **Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences**, v. 11, n. 2, p. 81s-110s, set. 2008.

RESEARCH COLLABORATORY FOR STRUCTURAL BIOINFORMATICS - RCSB. **Yearly growth of total structures**. Disponível em: <<http://www.rcsb.org/pdb/statistics/contentGrowthChart.do?content=total&seqid=100>>. Acesso em: 8 mar. 2011.

RINSEMA, T. J. One hundred years of aspirin. **Medical History**, v. 43, n. 4, p. 502-507, out. 1999.

ROWLINSON, S. W.; KIEFER, J. R.; PRUSAKIEWICZ, J. J.; PAWLITZ, J. L.; KOZAK, K. R.; KALGUTKAR, A. S.; STALLINGS, W. C.; KURUMBAIL, R. G.; MARNETT, L. J. A novel mechanism of cyclooxygenase-2 inhibition involving interactions with Ser-530 and Tyr-385. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 46, p. 45763-45769, nov. 2003.

ROUZER, C. A.; MARNETT, L. J. Mechanism of free radical oxygenation of polyunsaturated fatty acids by cyclooxygenases. **Chemical Reviews**, v. 103, n. 6, p. 2239-2304, jun. 2003.

SCHNEIDER, C.; BRASH, A. R. Stereospecificity of hydrogen abstraction in the conversion of arachidonic acid to 15*R*-hete by aspirin-treated cyclooxygenase-2: implications for the alignment of substrate in the active site. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 7, p. 4743-4746, fev. 2000.

SCHNEIDER, C.; BOEGLIN, W. E.; PRUSAKIEWICZ, J. J.; ROWLINSON, S. W.; MARNETT, L. J.; SAMEL, N.; BRASH, A. R. Control of prostaglandin stereochemistry at the 15-carbon by cyclooxygenases-1 and -2: a critical role for serine 530 and valine 349. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 1, p. 478-485, jan. 2002.

SCRUTTON, N. S.; RAINE, A. R. C. Cation- π bonding and amino-aromatic interactions in the biomolecular recognition of substituted ammonium ligands. **Biochemical Journal**, v. 319, p. 1-8 out. 1996.

SEIBOLD, S. A.; CERDA, J. F.; MULICHAK, A. M.; SONG, I.; GARAVITO, R. M.; ARAKAWA, T.; SMITH, W. L.; BABCOCK, G. T. Peroxidase activity in prostaglandin endoperoxide H synthase-1 occurs with a neutral histidine proximal heme ligand. **Biochemistry**, v. 39, n. 22, p. 6616-6624, jun. 2000.

SENG, Hoi-Ling; ONG, Han-Kiat Alan; ABD, Raja Noor Zaliha Raja; YAMIN, Bohari M.; TIEKINK, Edward R. T.; TAN, Kong Wai; MAAH, Mohd Jamil; CARACELLI, I.; NG, C. H. Factors affecting nucleolytic efficiency of some ternary metal complexes with DNA binding and recognition domains. Crystal and molecular structure of Zn(phen)(edda). **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 102, p. 1997-2011, 2008.

SENG, Hoi-Ling; VON, Sze-Tin; TAN, Kong-Wai; MAAH, Mohd Jamil; NG, Seik-Weng; RAHMAN, Raja Noor Zaliha Raja Abd; CARACELLI, Ignez; NG, Chew-Hee. Crystal structure, DNA binding studies, nucleolytic property and topoisomerase I inhibition of zinc complex with 1,10-phenanthroline and 3-methyl-picolinic acid. **BioMetals**, v. 23, p. 99-118, 2010.

SHANTHI, V; RAMANATHAN, K.; SETHUMADHAVAN, R. Exploring the role of C-H... π interactions on the structural stability of single chain "all-alpha" proteins. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 160, n. 5, p. 1473-1483, mar. 2010.

SHIMOKAWA, T.; KULMACZ, R. J.; DeWITT, D. L.; SMITH, W. L. Tyrosine 385 of prostaglandin endoperoxide synthase is required for cyclooxygenase catalysis. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 265, n. 33, p. 20073-20076, nov. 1990.

SILVERSTEIN, F. E.; FAICH, G.; GOLDSTEIN, J. L.; SIMON, L. S.; PINCUS, T.; WHELTON, A.; MAKUCH, R.; EISEN, G.; AGRAWAL, N. M.; STENSON, W. F.; BURR, A. M.; ZHAO, W. W.; KENT, J. D.; LEFKOWITH, J. B.; VERBURG, K. M.; GEIS, G. S. Gastrointestinal toxicity with celecoxib vs nonsteroidal anti-inflammatory drugs for osteoarthritis and rheumatoid arthritis. **The Journal of the American Medical Association**, v. 284, n. 10, p. 1247-1255, set. 2000.

SMITH, W. L.; DeWITT, D. L.; GARAVITO, R. M. Cyclooxygenases: structural, cellular, and molecular biology. **Annual Review of Biochemistry**, v. 69, p.145-182, jul. 2000.

SMITH, W. L.; GARAVITO, R. M.; DeWITT, D. L. Prostaglandin endoperoxide H synthases (cyclooxygenases)-1 and -2. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 271, n. 52, p. 33157-33160, dez. 1996.

SOLMAJER, T.; ZUPAN, J. Optimization algorithms and natural computing in drug discovery. **Drug Discovery Today: Technologies**, v. 1, n. 3, 2004.

SOLOMON, D. H.; SCHNEEWEISS, S.; GLYNN, R. J.; KIYOTA, Y.; LEVIN, R.; MOGUN, H.; AVORN, J. Relationship between selective cyclooxygenase-2 inhibitors and acute myocardial infarction in older adults. **Circulation**, v. 109, p. 2068-2073, 2004.

SOLOMON, S. D.; McMURRAY, J. J. V.; PFEFFER, M. A.; WITTES, J.; FOWLER, R.; FINN, P.; ANDERSON, W. F.; ZAUBER, A.; HAWK, E.; BERTAGNOLLI, M. Cardiovascular risk associated with celecoxib in a clinical trial for colorectal adenoma prevention. **The New England Journal Of Medicine**, v. 352, n. 11, mar. 2005.

SPENCER, A. G.; THURESSON, E.; OTTO, J. C.; SONG, I.; SMITH, T.; DeWITT, D. L.; GARAVITO, R. M.; SMITH, W. L. The membrane binding domains of prostaglandin endoperoxide H synthases 1 and 2: peptide mapping and mutational analysis. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 274, n. 46, p. 32936-32942, nov. 1999.

STEWART, J. J. P. **MOPAC2009™**. Stewart Computational Chemistry - SCC, Colorado Springs, CO, 2009.

STOJANOVIC, S. D.; MEDAKOVIC, V. B.; PREDOVIC, G.; BELJANSKI, M.; ZARIC, S. D. XH/ π interactions with the π system of porphyrin ring in porphyrin-containing proteins. **Journal of Biological Inorganic Chemistry**, v. 12, n. 7, p. 1063-1071, 2007.

TANABE, T.; TOHNAI, N. Cyclooxygenase isozymes and their gene structures and expression. **Prostaglandins & other Lipid Mediators**, v. 68-69, p. 95-114, 2002.

TEWARI, A. K.; DUBEY, R. Emerging trends in molecular recognition: utility of weak aromatic interactions. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 16, n. 1, p.126-143, jan. 2008.

THURESSON, E. D.; LAKKIDES, K. M.; RIEKE, C. J.; SUN, Y.; WINGERD, B. A.; MICIELLI, R.; MULICHAK, A. M.; MALKOWSKI, M. G.; GARAVITO, R. M.; SMITH, W. L. Prostaglandin endoperoxide H synthase-1: the functions of cyclooxygenase active site residues in the binding, positioning, and oxygenation of arachidonic acid. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 13, p. 10347-10359, mar. 2001.

- TSAI, A. L.; KULMACZ, R. J. Prostaglandin H synthase: resolved and unresolved mechanistic issues. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 493, n. 1, p. 103-124, jan. 2010.
- TSUZUKI, S.; HONDA, K.; UCHIMARU, T.; MIKAMI, M.; TANABE, K. Origin of attraction and directionality of the π/π interaction: model chemistry calculations of benzene dimer interaction. **Journal of the American Chemical Society**, v. 124, n. 1, p. 104-112, jan. 2002.
- U. S. FOOD AND DRUG ADMINISTRATION - U.S.FDA. **About FDA**. Disponível em: <<http://www.fda.gov/AboutFDA/CentersOffices/default.htm>>. Acesso em 21 jan. 2011.
- VANE, J. R. Inhibition of prostaglandin synthesis as a mechanism of action for aspirin-like drugs. **Nature: New Biology**, v. 231, n. 25, p. 232-235, jun. 1971.
- VANE, J. R.; BOTTING, R. M. The mechanism of action of aspirin. **Thrombosis Research**, v. 110, p. 255-258, 2003.
- VECCHIO, A. J.; SIMMONS, D. M.; MALKOWSKI, M. G. Structural basis of fatty acid substrate binding to cyclooxygenase-2. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 285, n. 29, p. 22152-22163, jul. 2010.
- VEGA-TEJIDO, M.; CARACELLI, I.; ZUKERMAN-SCHPECTOR, J. 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 Modeling**, v. 24, n. 5, p. 349-355, mar. 2006
- VERDONK, M. L.; BERDINI, V.; HARTSHORN, M. J.; MOOIJ, W. T. M.; MURRAY, C. W.; TAYLOR, R. D.; WATSON, P. Virtual screening using protein-ligand docking: avoiding artificial enrichment. **Journal of Chemical Information and Computer Sciences**, v. 44, n. 3, p. 793-806, 2004.
- VERDONK, M. L.; COLE, J. C.; HARTSHORN, M. J.; MURRAY, C. W.; TAYLOR, R. D. Improved protein-ligand docking using GOLD. **Proteins**, v. 52, n. 4, p. 609-623, set. 2003.
- VOET, D.; VOET, J. G.; PRATT, C. W. **Fundamentos de bioquímica: a vida em nível molecular**. trad. RODRIGUES, J. J. S. et al.. 2. ed. Porto Alegre: Artmed, 2008.
- WANG, J. L.; CARTER, J.; KIEFER, J. R.; KURUMBAIL, R. G.; PAWLITZ, J. L.; BROWN, D.; HARTMANN, S. J.; GRANETO, M. J.; SEIBERT, K.; TALLEY, J. J. The novel benzopyran class of selective cyclooxygenase-2 inhibitors-part I: the first clinical candidate. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 20, n. 23, p. 7155-7158, dez. 2010.
- WU, W. K. K.; SUNG, J. J. Y.; LEE, C. W.; YU, J.; CHO, C. H. Cyclooxygenase-2 in tumorigenesis of gastrointestinal cancers: an update on the molecular mechanisms. **Cancer Letters**, v. 295, n. 1, p. 7-16, set. 2010.
- WUEST, F.; TANG, X.; KNISS, T.; PIETZSCH, J.; SURESH, M. Synthesis and cyclooxygenase inhibition of various (aryl-1,2,3-triazole-1-yl)-methanesulfonylphenyl derivatives. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 17, n. 3, p. 1146-1151, fev. 2009.

XIAO, G.; TSAI, A.; PALMER, G.; BOYAR, W. C.; MARSHALL, P. J.; KULMACZ, R. J. Analysis of hydroperoxide-induced tyrosyl radicals and lipoxygenase activity in aspirin-treated human prostaglandin H synthase-2. **Biochemistry**, v. 36, n. 7, p. 1836-1845, fev. 1997.

XIE, W.; CHIPMAN, J. G.; ROBERTSON, D. L.; ERIKSON, R. L.; SIMMONS, D. L. Expression of a mitogen-responsive gene encoding prostaglandin synthase is regulated by mRNA splicing. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 88, n. 7, p. 2692-2696, abr. 1991.

APÊNDICES

Apêndice A

Redocking

Nesta seção estão descritos os resultados de redocking.

Como mencionado no Capítulo 2, o processo redocking é aquele onde o pesquisador determina os parâmetros necessários para reconstruir o complexo selecionado do PDB.

Pelos escores de redocking obtidos é possível observar se os ligantes testados se acomodam no sítio receptor da proteína de forma igual, melhor ou pior que o ligante original.

Foram realizadas duas avaliações:

- (a) a primeira descreve as interações do complexo 1cx2 original;
- (b) a segunda, as interações do redocking com os parâmetros de docking utilizado no trabalho.

Complexo SC 558/1cx2

Tabela A.1 Interações do ligante SC 558 no complexo pdb 1cx2.

Átomo do Ligante	Distância (Å)	Átomo do Resíduo	Átomo do Ligante	Distância (Å)	Átomo do Resíduo
:SC 558:BR1	3,09	:GLY526:HA2	:SC 558:H2	2,24	:TYR355:OH
:SC 558:BR1	2,83	:TRP387:HZ2	:SC 558:H3	2,65	:HIS90:NE2
:SC 558:BR1	2,58	:TYR385:HE2	:SC 558:H9	2,51	:VAL523:O
:SC 558:F1	2,54	:VAL349:HG13	:SC 558:O1	2,43	:ALA516:HB1
:SC 558:F2	2,44	:LEU531:HD13	:SC 558:O1	2,60	:PHE518:HD1
:SC 558:F3	2,12	:TYR355:HE2	:SC 558:O1	2,30	:VAL523:HG23
Ligação de hidrogênio					
:SC 558:F3	2,44	:ARG120:HH11			
:SC 558:HN31	2,26	:ARG513:NH1			
:SC 558:HN32	2,21	:HIS90:NE2			
:SC 558:N3	2,27	:HIS90:HE2			
Centroide					
:SC 558:centro A	2,71	:SER353:HA			

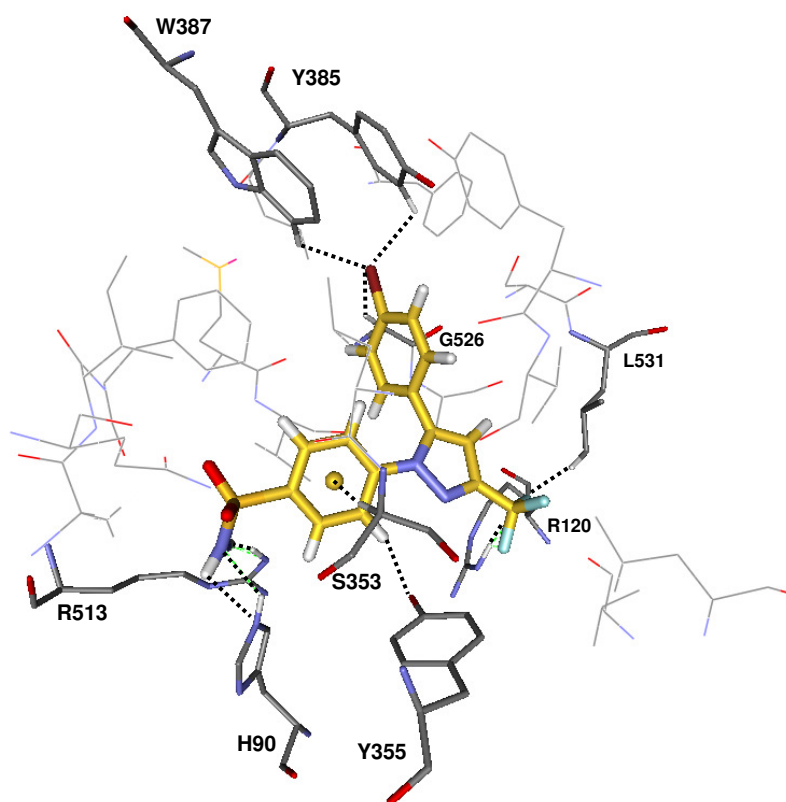


Figura A.1 Principais interações entre o ligante SC 558 (com os carbonos representados em amarelo) e o sítio ciclooxygenase no complexo 1cx2. Os hidrogênios dos resíduos que não estão envolvidos nas interações (representadas em tracejado) foram omitidos.

Redocking

Tabela A.2 Interações do ligante SC 558 no *redocking*.

Átomo do Ligante	Distância (Å)	Átomo do Resíduo	Átomo do Ligante	Distância (Å)	Átomo do Resíduo
:SC 558:BR1	2,69	:GLY526:HA2	:SC 558:H	2,35	:LEU352:O
:SC 558:BR1	3,04	:TRP387:HZ2	:SC 558:H	2,04	:TYR355:OH
:SC 558:BR1	2,88	:TYR385:HE2	:SC 558:N2	2,61	:TYR355:HH
:SC 558:F1	2,42	:ARG120:HD1	:SC 558:O2	2,58	:HIS90:HE2
:SC 558:F1	2,32	:LEU531:HD13	:SC 558:O2	2,23	:VAL523:HG23
:SC 558:F2	2,48	:TYR355:HE2			
Ligação de hidrogênio					
:SC 558:F1	2,36	:ARG120:HH11	:SC 558:O1	1,67	:HIS90:HE2
:SC 558:F2	2,51	:ARG120:HH12	:SC 558:O2	2,04	:ARG513:HH11
:SC 558:HN32	2,64	:GLN192:OE1			
Centroide					
:SC 558:centro A	2,70	:SER353:HA			
:SC 558:centro C	4,33	:ARG120:NH2			

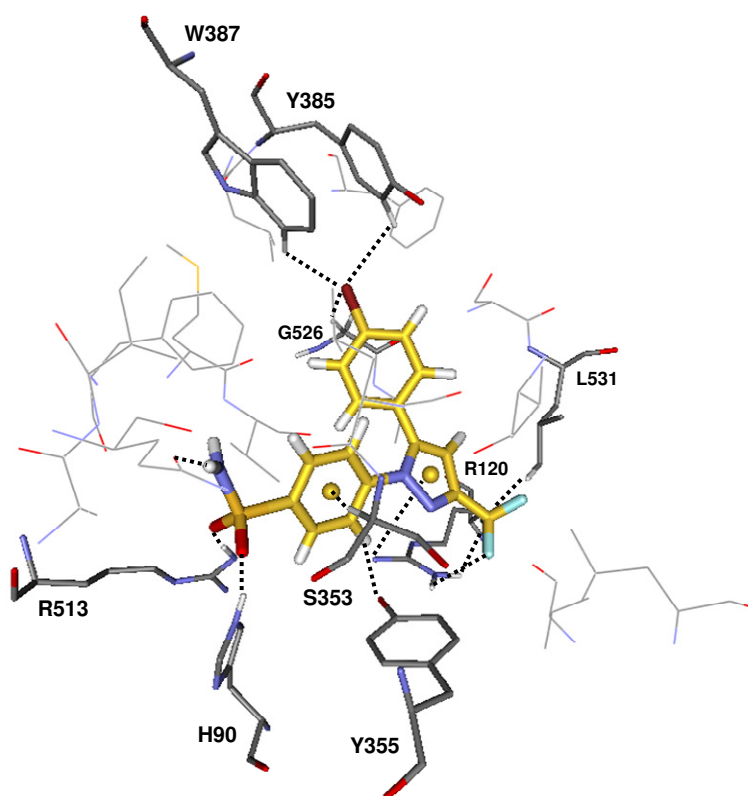


Figura A.2 Principais interações do *redocking* do ligante **SC 558** (com os carbonos representados em amarelo). Os hidrogênios dos resíduos que não estão envolvidos nas interações (representadas em tracejado) foram omitidos.

A análise visual do *redocking* demonstra a manutenção das principais interações encontradas no complexo original. A interação CH... π envolvendo o resíduo serina 353, bem como a interação CH...O com a tirosina 355 esta presente nos dois complexos. As ligações de hidrogênio envolvendo os resíduos histidina 90 e arginina 513, embora com algumas variações, também estão presentes. Todas as interações envolvendo o átomo de bromo e os átomos de flúor, são igualmente preservadas, ocorrendo variações somente com relação às distâncias encontradas para as mesmas. Uma variação em relação ao complexo original, é a presença da interação cátion... π envolvendo o resíduo arginina 120 e o sistema π do anel C, em função da modificação dos ângulos diedrais do resíduo para os cálculos de *redocking*.

Apêndice B

Interações 1cx2/ligantes do grupo 10

Nesta seção estão descritos e discutidos os resultados encontrados para as interações dos ligantes do grupo 10, em conformidade com o Capítulo 3, Seção 3.3.2.

Ligante 10a

Tabela B.1 Interações do ligante 10a.

Átomo do Ligante	Distância (Å)	Átomo do Resíduo	Átomo do Ligante	Distância (Å)	Átomo do Resíduo
:10a:H25	2,44	:HIS90:NE2	:10a:N2	1,83	:TYR355:HH
:10a:H26	2,22	:LEU352:O	:10a:O19	2,29	:ILE517:HG22
:10a:H28	2,45	:ARG120:NE	:10a:O19	2,45	:PHE518:HE1
:10a:H30	2,56	:VAL116:O	:10a:O20	2,22	:ALA516:HB1
:10a:H32	2,28	:GLN192:OE1	:10a:O20	2,26	:VAL523:HG23
:10a:N1	2,10	:TYR355:HH			
Ligação de hidrogênio					
:10a:N3	1,88	:TYR355:HH			
Centroide					
:10a:centro A	2,28	:SER353:HA			
:10a:centro C	1,72	:TYR355:HH			

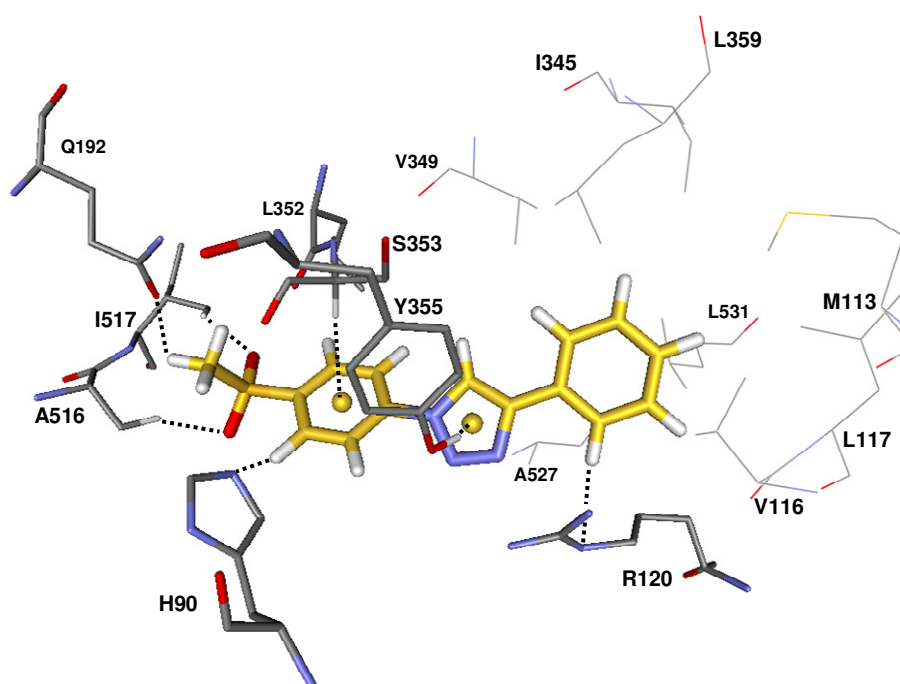


Figura B.1 Principais interações entre o ligante **10a** (com os carbonos representados em amarelo) e os resíduos do sítio ciclooxygenase da COX-2. Os hidrogênios dos resíduos que não estão envolvidos nas interações (representadas em tracejado) foram omitidos.

Ligante 10b

Tabela B.2 Interações do ligante 10b.

Átomo do Ligante	Distância (Å)	Átomo do Resíduo	Átomo do Ligante	Distância (Å)	Átomo do Resíduo
:10b:H26	2,36	:HIS90:NE2	:10b:N3	1,94	TYR355:HH
:10b:H27	2,36	:LEU352:O	:10b:O19	1,87	:ALA516:HB1
:10b:H28	2,36	:ARG120:NE	:10b:O19	2,52	:VAL523:HG23
:10b:H34	2,00	:GLN192:OE1	:10b:O20	2,03	:ILE517:HG22
:10b:N2	2,58	:TYR355:HH			
Ligação de hidrogênio					
:10b:N2	1,89	:TYR355:HH			
Centroide					
:10b:centro A	2,99	:SER353:HA			
:10b:centro C	1,74	:TYR355:HH			

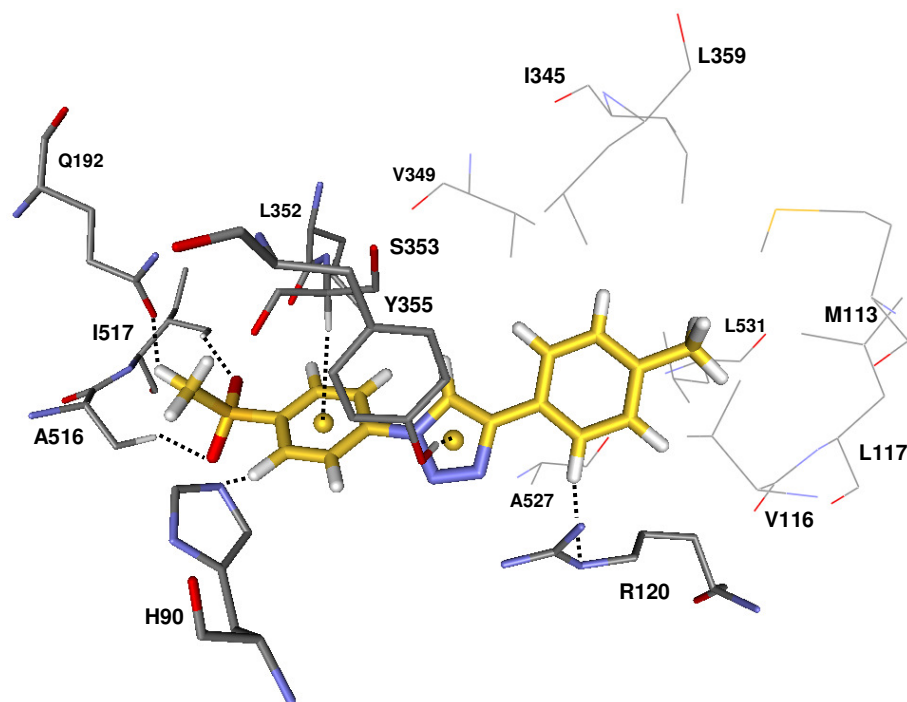


Figura B.2 Principais interações entre o ligante **10b** (com os carbonos representados em amarelo) e os resíduos do sítio ciclooxygenase da COX-2. Os hidrogênios dos resíduos que não estão envolvidos nas interações (representadas em tracejado) foram omitidos.

Ligante 10c

Tabela B.3. Interações do ligante 10c.

Átomo do Ligante	Distância (Å)	Átomo do Resíduo	Átomo do Ligante	Distância (Å)	Átomo do Resíduo
:10c:H27	2,19	:LEU352:O	:10c:O20	2,02	:ALA516:HB1
:10c:H28	2,27	:HIS90:NE2	:10c:O20	2,59	:VAL523:HG23
:10c:H29	2,55	:ARG120:NE	:10c:O22	2,47	:LEU117:HD11
:10c:H33	2,64	:LEU352:O	:10c:O22	2,44	:MET113:HE1
:10c:H34	2,23	:GLN192:OE1	:10c:O22	2,15	:MET113:HE3
:10c:N1	1,87	:TYR355:HH	:10c:O22	2,32	:VAL116:HG21
:10c:N3	2,03	:TYR355:HH	:10c:O22	2,48	:VAL116:HG23
:10c:O19	2,36	:ILE517:HG22			

Ligação de hidrogênio					
:10c:N2	1,80	:TYR355:HH			

Centroide					
:10c:centro A	2,88	:SER353:HA			
:10c:centro C	1,67	:TYR355:HH			

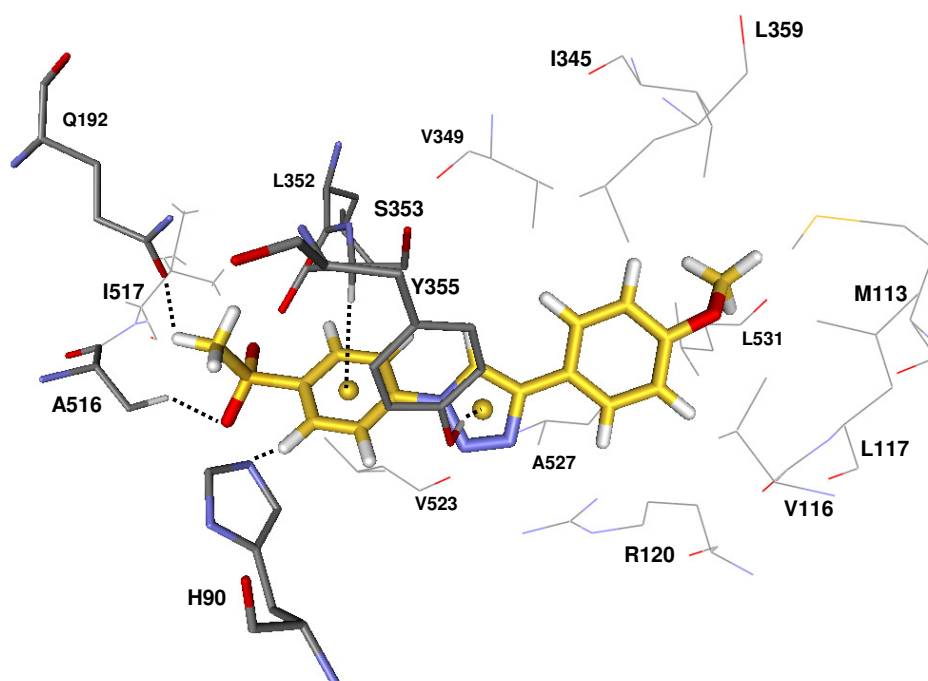


Figura B.3 Principais interações entre o ligante **10c** (com os carbonos representados em amarelo) e os resíduos do sítio ciclooxygenase da COX-2. Os hidrogênios dos resíduos que não estão envolvidos nas interações (representadas em tracejado) foram omitidos.

Ligante 10d

Tabela B.4. Interações do ligante 10d.

Átomo do Ligante	Distância (Å)	Átomo do Resíduo	Átomo do Ligante	Distância (Å)	Átomo do Resíduo
:10d:H31	2,68	:TYR355:OH	:10d:N3	2,10	:VAL523:HG22
:10d:H42	2,48	:ARG120:NH1	:10d:O20	2,34	:ALA516:H
:10d:N2	2,47	:VAL523:HG23	:10d:O20	2,38	:ALA516:HB3
:10d:N22	2,62	:ALA527:HB1	:10d:O20	2,21	:ASP515:H
:10d:N3	2,08	:PHE518:HE1	:10d:O20	1,94	:PRO514:HB2
Centroide					
:10d:centroide B	4,74	:ARG120:NH2			
:10d:centroide C	4,75	:ARG513:NH1			

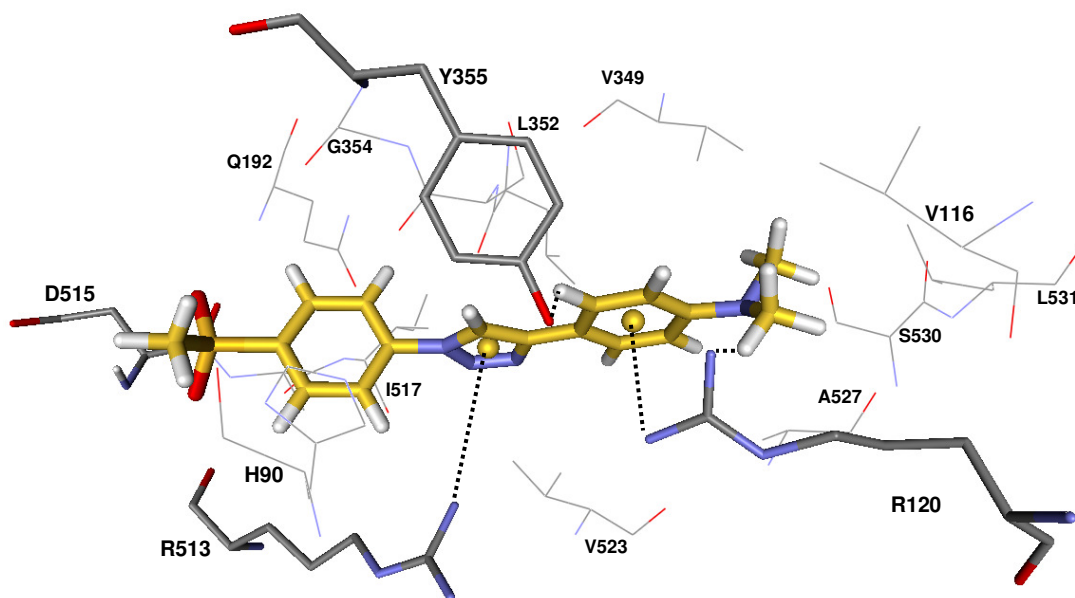


Figura B.4 Principais interações entre o ligante **10d** (com os carbonos representados em amarelo) e os resíduos do sítio ciclooxygenase da COX-2. Os hidrogênios dos resíduos que não estão envolvidos nas interações (representadas em tracejado) foram omitidos.

Ligante 10e

Tabela B.5 Interações do ligante 10e.

Átomo do Ligante	Distância (Å)	Átomo do Resíduo	Átomo do Ligante	Distância (Å)	Átomo do Resíduo
:10e:Cl31	2,23	:LEU117:HD11	:10e:H26	2,40	:HIS90:NE2
:10e:Cl31	2,51	:LEU117:HD12	:10e:H27	2,58	:ARG120:NE
:10e:Cl31	2,77	:LEU117:HD13	:10e:H33	2,23	:GLN192:OE1
:10e:Cl31	2,76	:LEU531:HD11	:10e:H34	2,55	:GLN192:OE1
:10e:Cl31	2,83	:LEU531:HD13	:10e:N1	1,98	:TYR355:HH
:10e:Cl31	2,51	:MET113:HE1	:10e:N3	2,06	:TYR355:HH
:10e:Cl31	2,30	:MET113:HE3	:10e:O19	2,21	:ILE517:HG22
:10e:Cl31	2,48	:VAL116:HG21	:10e:O20	1,96	:ALA516:HB1
:10e:H25	2,30	:LEU352:O	:10e:O20	2,55	:VAL523:HG23
Ligação de hidrogênio					
:10e:N2	1,72	:TYR355:HH			
Centroide					
:10e:centro A	2,88	:SER353:HA			
:10e:centro C	1,82	:TYR355:HH			

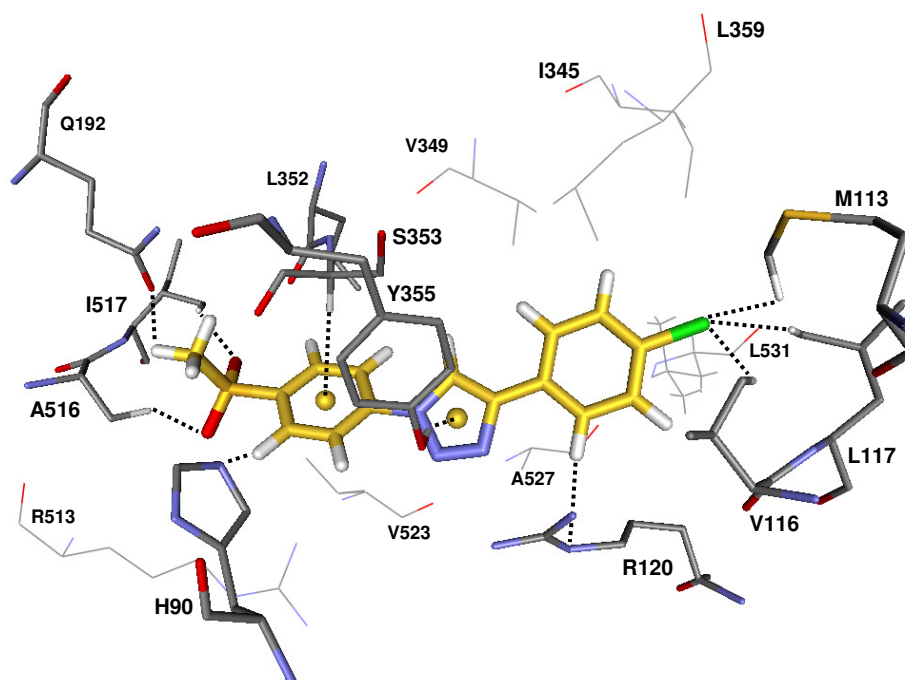


Figura B.5 Principais interações entre o ligante **10e** (com os carbonos representados em amarelo) e os resíduos do sítio ciclooxigenase da COX-2. Os hidrogênios dos resíduos que não estão envolvidos nas interações (representadas em tracejado) foram omitidos.

Ligante 10f

Tabela B.6 Interações do ligante 10f.

Átomo do Ligante	Distância (Å)	Átomo do Resíduo	Átomo do Ligante	Distância (Å)	Átomo do Resíduo
:10f:F31	2,13	:LEU117:HD11	:10f:H28	2,54	:ARG120:NH1
:10f:F31	2,50	:LEU117:HD12	:10f:H33	2,27	:LEU352:O
:10f:F31	2,37	:MET113:HE1	:10f:H34	2,26	:GLN192:OE1
:10f:F31	2,26	:MET113:HE3	:10f:N1	1,87	:TYR355:HH
:10f:F31	2,28	:VAL116:HG21	:10f:N3	2,06	:TYR355:HH
:10f:H23	2,48	:TYR355:OH	:10f:O19	2,33	:PHE518:HE1
:10f:H25	2,33	:HIS90:NE2	:10f:O20	2,39	:ALA516:HB1
:10f:H26	2,21	:LEU352:O	:10f:O20	2,42	:VAL523:HG23
Ligação de hidrogênio					
:10f:N2	1,66	:TYR355:HH			
Centroide					
:10f:centroide A	2,80	:SER353:HA			
:10f:centroide C	1,76	:TYR355:HH			

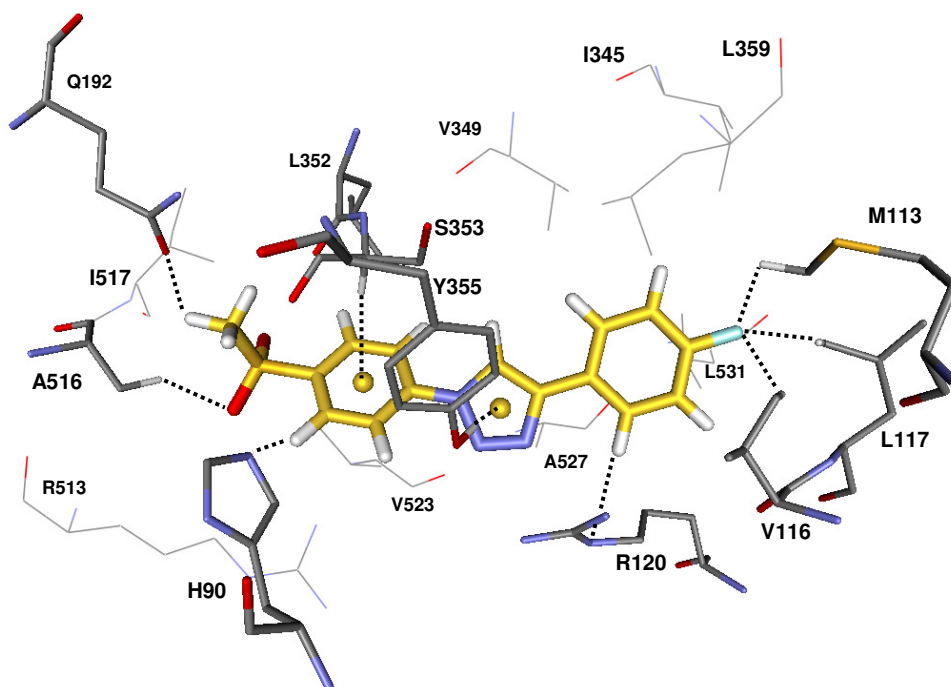


Figura B.6 Principais interações entre o ligante **10f** (com os carbonos representados em amarelo) e os resíduos do sítio ciclooxigenase da COX-2. Os hidrogênios dos resíduos que não estão envolvidos nas interações (representadas em tracejado) foram omitidos.

Apêndice C

Interações 1cx2/ligantes do grupo 11

Nesta seção estão descritos e discutidos os resultados encontrados para as interações dos ligantes do grupo 11, em conformidade com o Capítulo 3, Seção 3.3.3.

Ligante 11a

Tabela C.1 Interações do ligante 11a.

Átomo do Ligante	Distância (Å)	Átomo do Resíduo	Átomo do Ligante	Distância (Å)	Átomo do Resíduo
:11a:H24	2,23	:TYR355:OH	:11a:O20	2,67	:ARG513:HD2
:11a:H25	2,19	:LEU352:O	:11a:O20	2,24	:VAL523:HG23
:11a:H32	2,35	:LEU352:O			
Ligação de hidrogênio					
:11a:N2	2,61	:TYR355:HH			
:11a:O19	2,02	:HIS90:HE2			
:11a:O20	2,16	:ARG513:HH11			
Centroide					
:11a:centro A	2,86	:SER353:HA			
:11a:centro C	4,41	:ARG120:NH2			

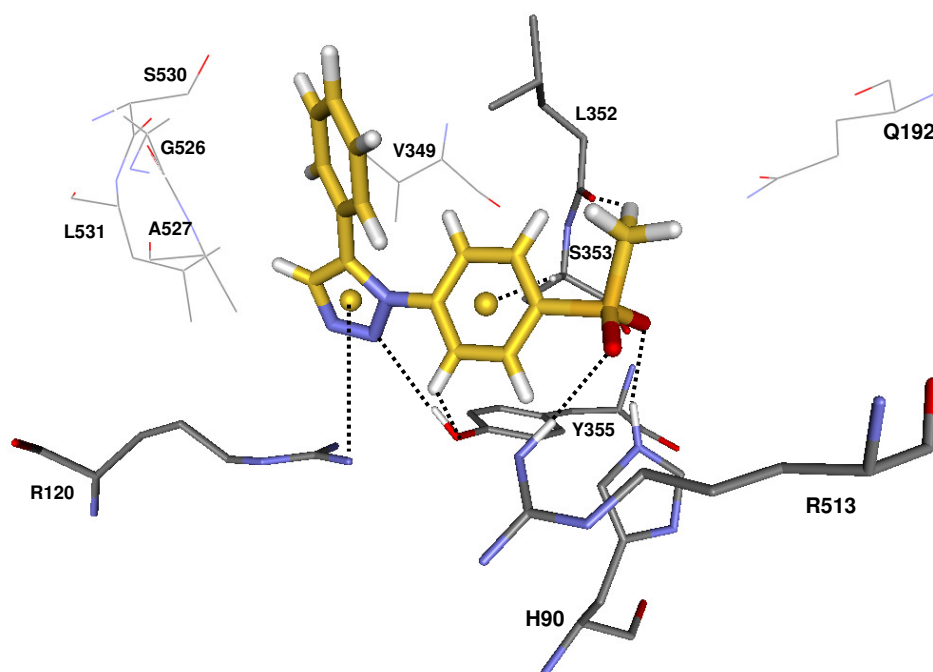


Figura C.1 Principais interações entre o ligante **11a** (com os carbonos representados em amarelo) e os resíduos do sítio ciclooxigenase da COX-2. Os hidrogênios dos resíduos que não estão envolvidos nas interações (representadas em tracejado) foram omitidos.

Ligante 11b

Tabela C.2. Interações do ligante 11b.

Átomo do Ligante	Distância (Å)	Átomo do Resíduo	Átomo do Ligante	Distância (Å)	Átomo do Resíduo
:11b:H24	2,15	:TYR355:OH	:11b:O19	2,67	:ARG513:HD2
:11b:H27	2,29	:LEU352:O	:11b:O19	2,28	:VAL523:HG23
:11b:H32	2,45	:LEU352:O			
Ligação de hidrogênio					
:11b:N2	2,50	:TYR355:HH			
:11b:O19	2,07	:ARG513:HH11			
:11b:O20	2,05	:HIS90:HE2			
Centroide					
:11b:centro A	2,84	:SER353:HA			
:11b:centro C	4,36	:ARG120:NH2			

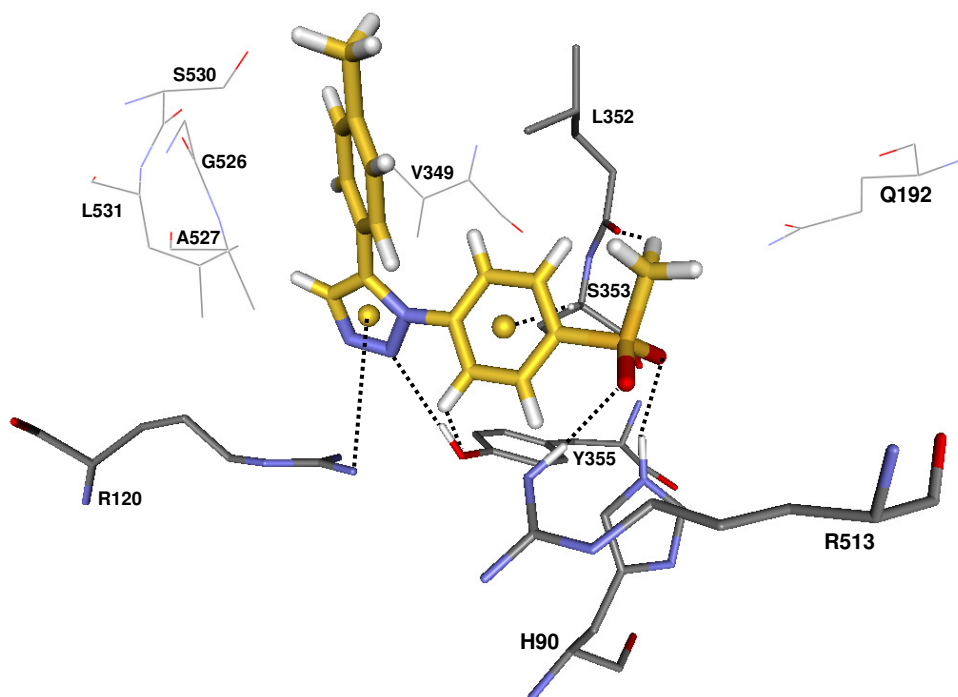


Figura C.2 Principais interações entre o ligante **11b** (com os carbonos representados em amarelo) e os resíduos do sítio ciclooxigenase da COX-2. Os hidrogênios dos resíduos que não estão envolvidos nas interações (representadas em tracejado) foram omitidos.

Ligante 11c

Tabela C.3. Interações do ligante 11c.

Átomo do Ligante	Distância (Å)	Átomo do Resíduo	Átomo do Ligante	Distância (Å)	Átomo do Resíduo
:11c:H26	2,20	:TYR355:OH	:11c:O20	2,30	:VAL523:HG23
:11c:H27	2,18	:LEU352:O	:11c:O22	2,69	:TRP387:HH2
:11c:H34	2,33	:LEU352:O	:11c:O22	2,73	:TRP387:HZ2
Ligação de hidrogênio					
:11c:N2	2,43	:TYR355:HH			
:11c:O19	1,97	:HIS90:HE2			
:11c:O20	2,17	:ARG513:HH1			
Centroide					
:11c:centro A	2,84	:SER353:HA			
:11c:centro C	4,37	:ARG120:NH2			

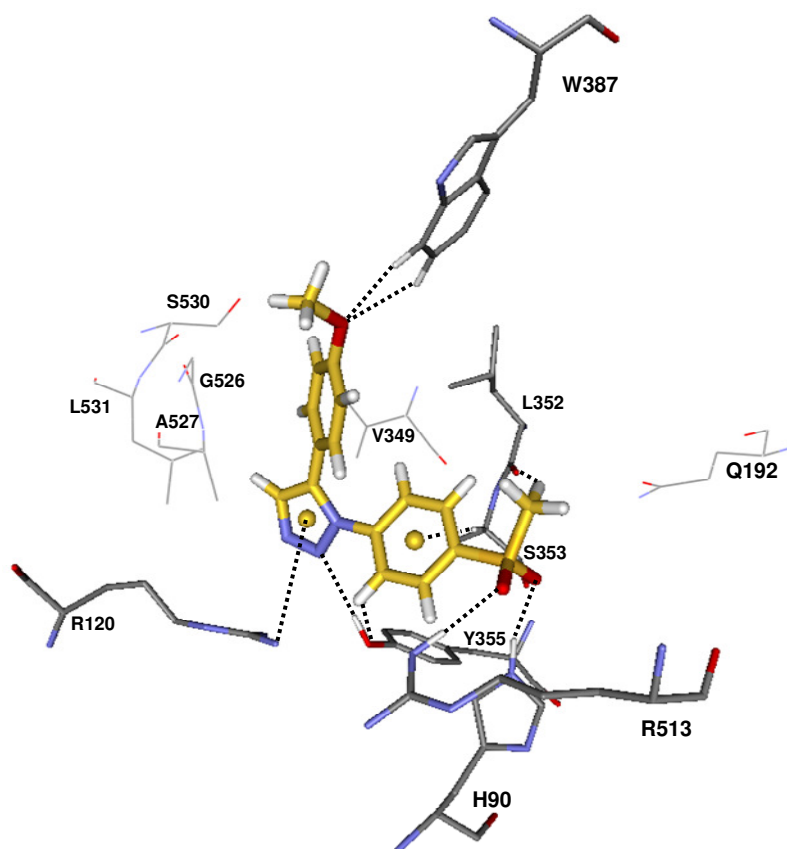


Figura C.3 Principais interações entre o ligante **11c** (com os carbonos representados em amarelo) e os resíduos do sítio ciclooxygenase da COX-2. Os hidrogênios dos resíduos que não estão envolvidos nas interações (representadas em tracejado) foram omitidos.

Ligante 11d

Tabela C.4 Interações do ligante 11d.

Átomo do Ligante	Distância (Å)	Átomo do Resíduo	Átomo do Ligante	Distância (Å)	Átomo do Resíduo
:11d:H26	1,99	:TYR355:OH	:11d:H38	2,38	:TYR385:OH
:11d:H29	2,38	:LEU352:O	:11d:O19	2,65	:ARG513:HD2
:11d:H35	2,22	:LEU352:O	:11d:O19	2,23	:VAL523:HG23
:11d:H37	2,26	:TYR385:OH			
Ligação de hidrogênio					
:11d:N2	2,09	:TYR355:HH			
:11d:O19	2,25	:ARG513:HH11			
:11d:O20	2,05	:HIS90:HE2			
Centroide					
:11d:centro A	2,91	:SER353:HA			
:11d:centro C	3,93	:ARG120:NH2			

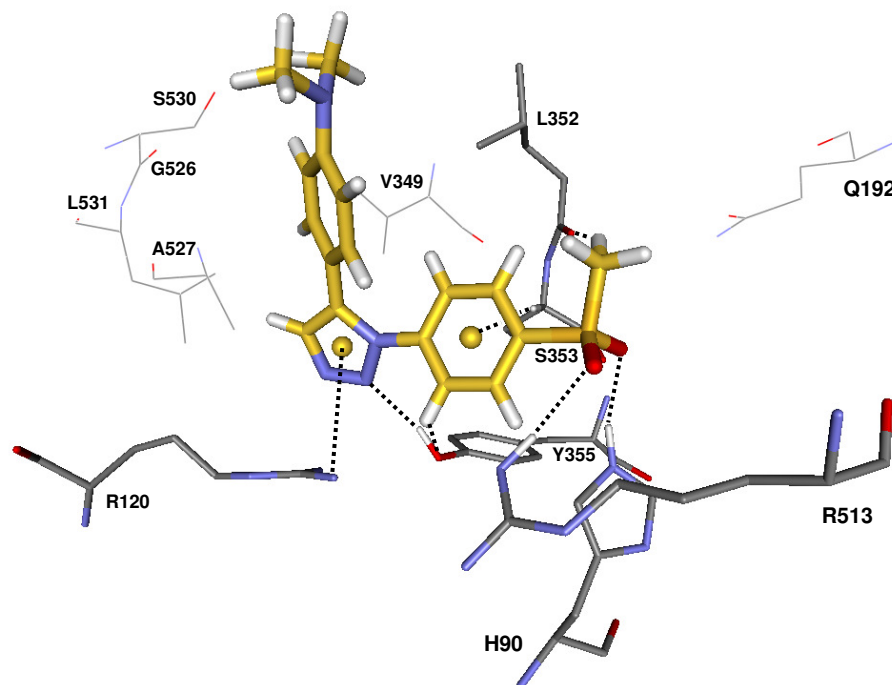


Figura C.4 Principais interações entre o ligante **11d** (com os carbonos representados em amarelo) e os resíduos do sítio ciclooxigenase da COX-2. Os hidrogênios dos resíduos que não estão envolvidos nas interações (representadas em tracejado) foram omitidos.

Ligante 11e

Tabela C.5 Interações do ligante 11e.

Átomo do Ligante	Distância (Å)	Átomo do Resíduo	Átomo do Ligante	Distância (Å)	Átomo do Resíduo
:11e:Cl31	2,93	:TRP387:HH2	:11e:H26	2,17	:LEU352:O
:11e:Cl31	2,83	:TRP387:HZ2	:11e:H34	2,41	:LEU352:O
:11e:H23	2,15	:TYR355:OH	:11e:O19	2,65	:ARG513:HD2
:11e:H25	2,59	:ARG513:NH1	:11e:O19	2,25	:VAL523:HG23
Ligação de hidrogênio					
:11e:N2	2,26	:TYR355:HH			
:11e:O19	2,10	:ARG513:HH11			
:11e:O20	2,07	:HIS90:HE2			
Centroide					
:11e:centro A	2,87	:SER353:HA			
:11e:centro C	4,42	:ARG120:NH2			

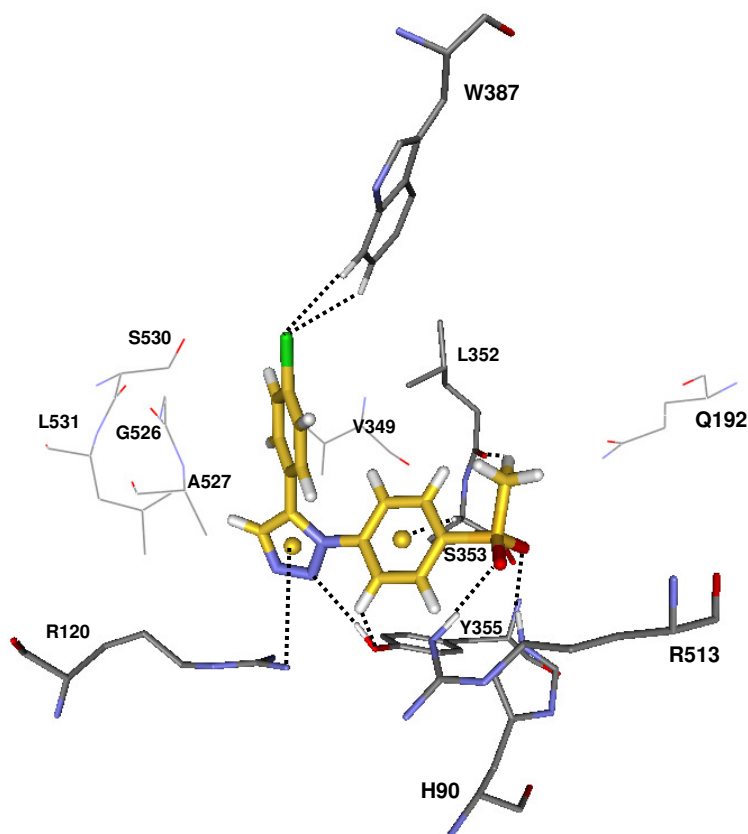


Figura C.5 Principais interações entre o ligante **11e** (com os carbonos representados em amarelo) e os resíduos do sítio ciclooxigenase da COX-2. Os hidrogênios dos resíduos que não estão envolvidos nas interações (representadas em tracejado) foram omitidos.

Ligante 11f

Tabela C.6 Interações do ligante 11f.

Átomo do Ligante	Distância (Å)	Átomo do Resíduo	Átomo do Ligante	Distância (Å)	Átomo do Resíduo
:11f:F31	2,55	:TRP387:HH2	:11f:H25	2,21	:LEU352:O
:11f:F31	2,71	:TRP387:HZ2	:11f:H33	2,34	:LEU352:O
:11f:H24	2,25	:TYR355:OH	:11f:O19	2,35	:VAL523:HG23
Ligação de hidrogênio					
:11f:N2	2,56	:TYR355:HH			
:11f:O19	2,24	:ARG513:HH11			
:11f:O20	2,08	:HIS90:HE2			
Centroide					
:11f:centro A	2,88	:SER353:HA			
:11f:centro C	4,26	:ARG120:NH2			

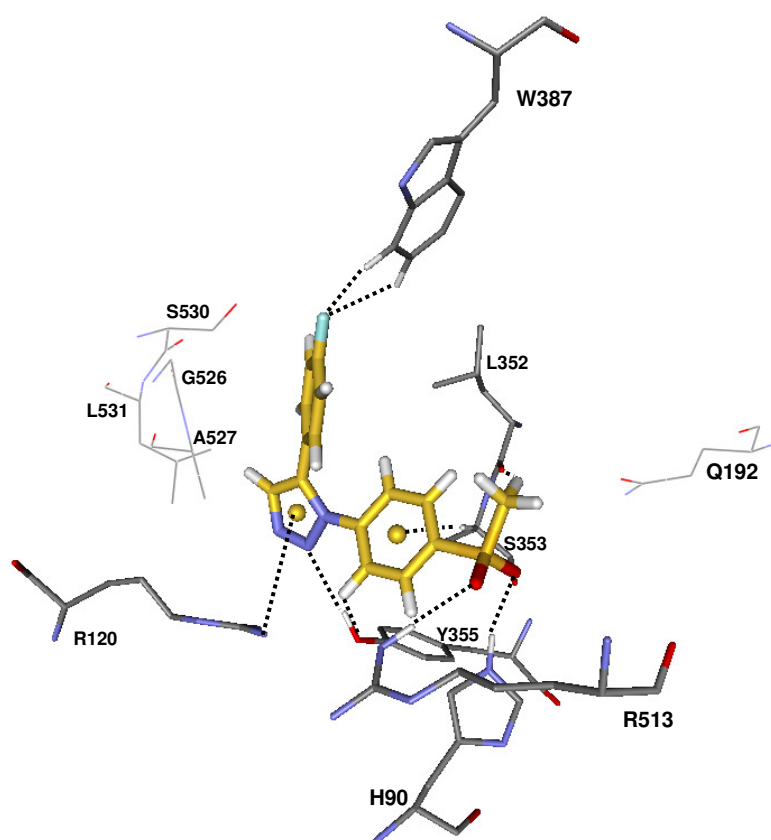


Figura C.6 Principais interações entre o ligante **11f** (com os carbonos representados em amarelo) e os resíduos do sítio ciclooxigenase da COX-2. Os hidrogênios dos resíduos que não estão envolvidos nas interações (representadas em tracejado) foram omitidos.

Apêndice D

Interações 1x2/ligantes do grupo R

Nesta seção estão descritos e discutidos os resultados encontrados para as interações dos ligantes do grupo R, em conformidade com o Capítulo 3, Seção 3.3.4.

Resveratrol

Tabela D.1 Interações do Resveratrol.

Átomo do Ligante	Distância (Å)	Átomo do Resíduo	Átomo do Ligante	Distância (Å)	Átomo do Resíduo
:Resv:H18	2,36	:TYR355:OH	:Resv:O2	2,35	:ARG513:HD1
:Resv:H20	2,56	:ARG513:NH1	:Resv:O2	2,39	:ARG513:HD2
:Resv:H21	2,35	:LEU352:O	:Resv:O2	2,64	:VAL523:HG23
:Resv:O1	2,64	:LEU352:HG	:Resv:O3	2,03	:LEU531:HD13
:Resv:O1	2,23	:PHE518:HE1			
Ligação de hidrogênio					
:Resv:H27	2,90	:GLN192:OE1			
:Resv:O2	1,91	:ARG513:HH11			
:Resv:O2	2,38	:HIS90:HE2			
Centroide					
:Resv:centro B	3,42	:ARG120:NH1			
:Resv:centro B	4,12	:ARG120:NH2			

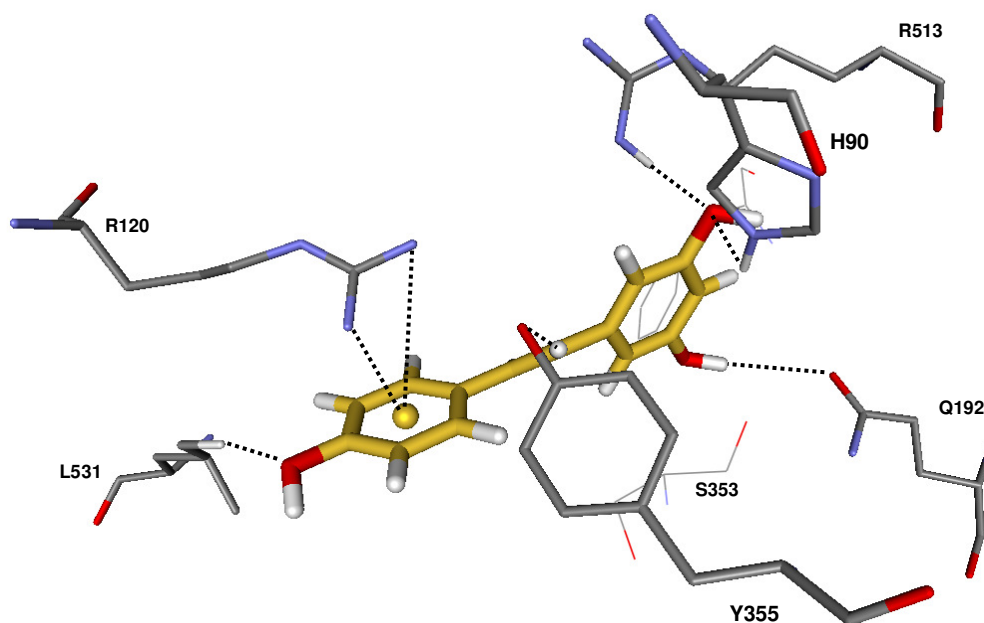


Figura D.1 Principais interações entre o **resveratrol** (com os carbonos representados em amarelo) e os resíduos do sítio ciclooxigenase da COX-2. Os hidrogênios dos resíduos que não estão envolvidos nas interações (representadas em tracejado) foram omitidos.

Ligante 1H6

Tabela D.2 Interações do ligante 1H6.

Átomo do Ligante	Distância (Å)	Átomo do Resíduo	Átomo do Ligante	Distância (Å)	Átomo do Resíduo
:1H6:H24	2,32	:HIS90:NE2	:1H6:O2	2,57	:ARG120:HH12
:1H6:H30	2,65	:ARG513:NH1	:1H6:O3	2,44	:SER530:HB2
:1H6:O1	2,54	:SER353:HA	:1H6:O3	2,05	:TYR385:HE2
Ligação de hidrogênio					
:1H6:H29	2,05	:SER530:OG			
:1H6:O1	2,13	:HIS90:HE2			
:1H6:O2	1,49	:ARG120:HH22			
:1H6:O2	1,88	:TYR355:HH			
:1H6:O3	1,94	:TYR385:HH			
Centroide					
:1H6:centro A	3,92	:ARG513:NH1			

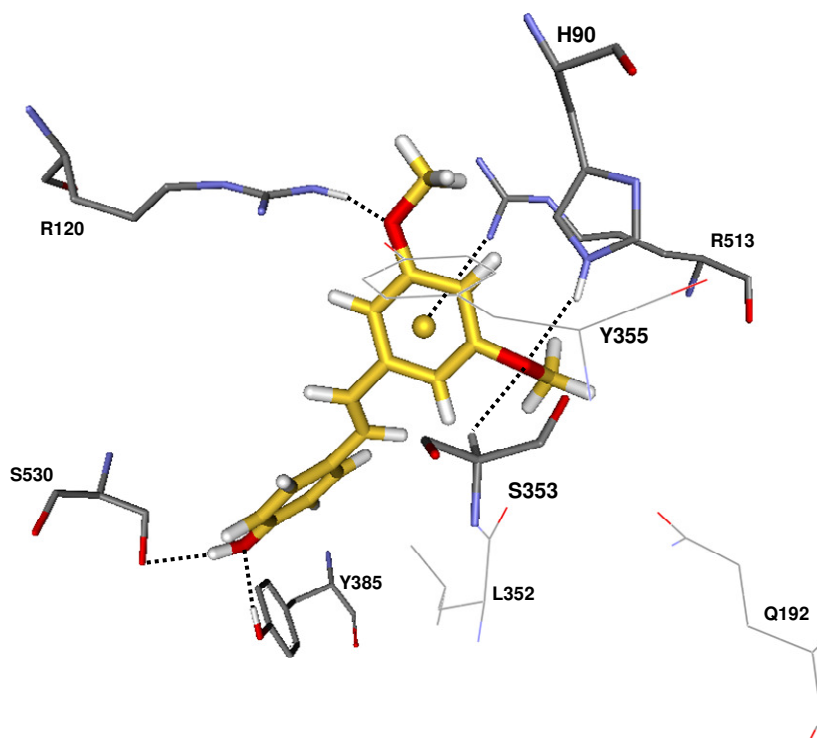


Figura D.2 Principais interações entre o ligante **1H6** (com os carbonos representados em amarelo) e os resíduos do sítio ciclooxigenase da COX-2. Os hidrogênios dos resíduos que não estão envolvidos nas interações (representadas em tracejado) foram omitidos.

Ligante 2H5

Tabela D.3 Interações do ligante 2H5.

Átomo do Ligante	Distância (Å)	Átomo do Resíduo	Átomo do Ligante	Distância (Å)	Átomo do Resíduo
:2H5:H18	2,22	:TYR355:OH	:2H5:O1	2,59	:LEU352:HG
:2H5:H20	2,681	:ARG513:NH1	:2H5:O1	2,03	:PHE518:HE1
:2H5:H21	2,49	:LEU352:O	:2H5:O2	2,394	:ARG513:HD1
:2H5:H27	2,33	:LEU352:O	:2H5:O2	2,465	:ARG513:HD2
:2H5:O1	2,56	:LEU352:HD21	:2H5:O3	2,240	:LEU531:HD13
Ligação de hidrogênio					
:2H5:O2	1,82	:ARG513:HH11			
:2H5:O2	2,29	:HIS90:HE2			
Centroide					
:2H5:centro B	3,12	:ARG120:NH1			
:2H5:centro B	3,98	:ARG120:NH2			

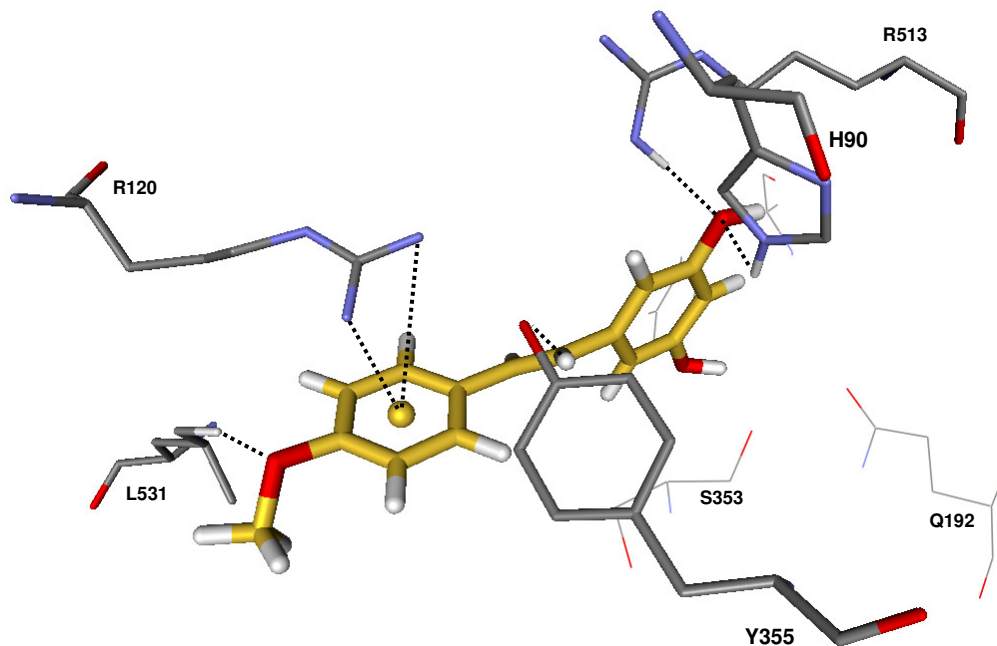


Figura D.3 Principais interações entre o ligante 2H5 (com os carbonos representados em amarelo) e os resíduos do sítio ciclooxigenase da COX-2. Os hidrogênios dos resíduos que não estão envolvidos nas interações (representadas em tracejado) foram omitidos.

Ligante 2H7

Tabela D.4 Interações do ligante 2H7.

Átomo do Ligante	Distância (Å)	Átomo do Resíduo	Átomo do Ligante	Distância (Å)	Átomo do Resíduo
:2H7:H18	2,41	:TYR355:OH	:2H7:O2	2,61	:PHE518:HE1
:2H7:H20	2,05	:LEU352:O	:2H7:O25	2,62	:ALA527:HA
:2H7:H21	2,56	:ARG513:NH1	:2H7:O25	2,50	:ALA527:HB1
:2H7:H34	2,31	:ALA527:O	:2H7:O25	2,56	:LEU531:HG
:2H7:O1	2,42	:ARG513:HD2	:2H7:O3	1,96	:LEU531:HD13
:2H7:O1	2,25	:HIS90:HE2	:2H7:O3	2,57	:LEU531:HD23
:2H7:O2	2,46	:ILE517:HG22			
Ligação de hidrogênio					
:2H7:H28	2,52	:GLN192:OE1			
:2H7:O1	2,25	:ARG513:HD1			
:2H7:O1	1,89	:ARG513:HH11			
Centroide					
:2H7:centro B	3,76	:ARG120:NH1			
:2H7:centro B	4,35	:ARG120:NH2			

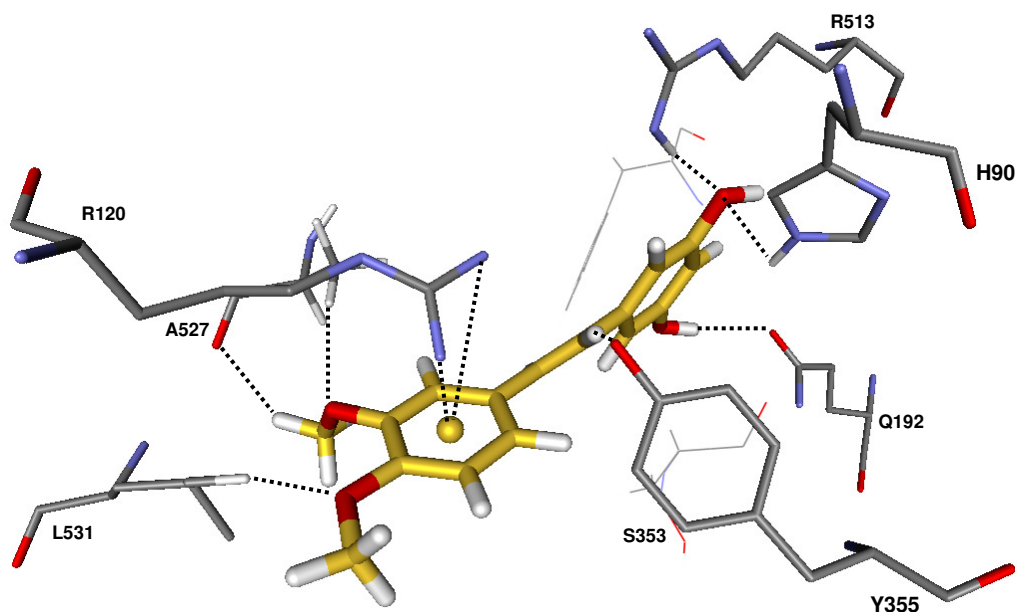


Figura D.4 Principais interações entre o ligante 2H7 (com os carbonos representados em amarelo) e os resíduos do sítio ciclooxygenase da COX-2. Os hidrogênios dos resíduos que não estão envolvidos nas interações (representadas em tracejado) foram omitidos.

Ligante 2H14

Tabela D.5 Interações do ligante 2H14.

Átomo do Ligante	Distância (Å)	Átomo do Resíduo	Átomo do Ligante	Distância (Å)	Átomo do Resíduo
:2H14:H21	2,48	:ARG513:NH1	:2H14:O2	2,41	:LEU352:HG
:2H14:H28	2,37	:LEU352:O	:2H14:O2	2,10	:PHE518:HE1
:2H14:N3	2,25	:LEU531:HD13	:2H14:O30	2,30	:ARG120:HD1
:2H14:O1	2,54	:ARG513:HD1	:2H14:O30	2,20	:LEU531:HD13
:2H14:O1	2,58	:ARG513:HD2	:2H14:O30	2,27	:VAL116:HB
:2H14:O2	2,37	:LEU352:HD21			
Ligação de hidrogênio					
:2H14:O1	2,01	:ARG513:HH11			
:2H14:O1	2,30	:HIS90:HE2			
:2H14:O30	2,62	:ARG120:HH11			
Centroide					
:2H14:centro B	3,46	:ARG120:NH1			

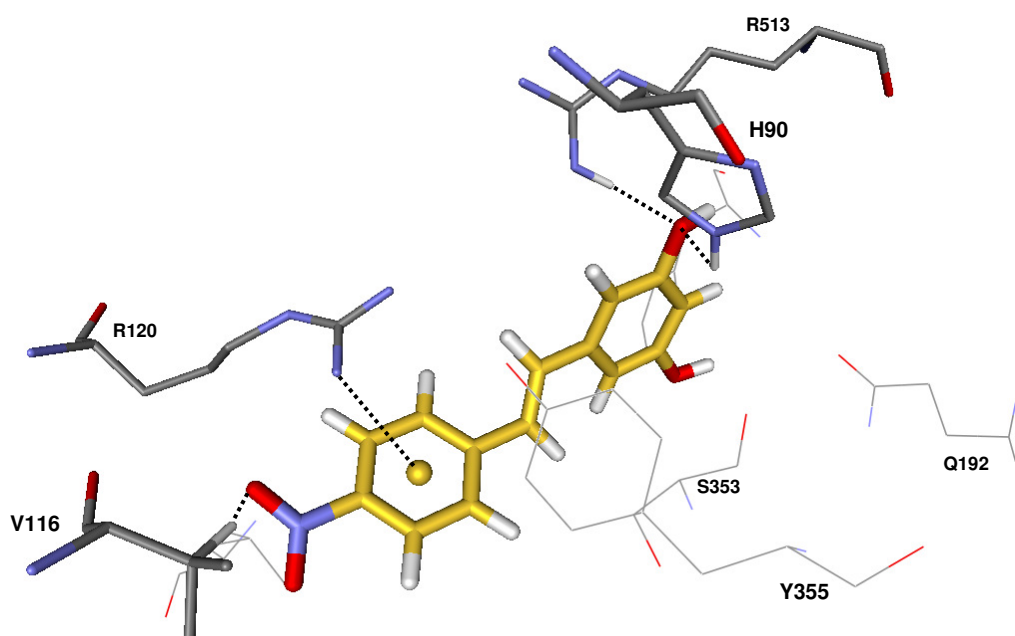


Figura D.5 Principais interações entre o ligante **2H14** (com os carbonos representados em amarelo) e os resíduos do sítio ciclooxygenase da COX-2. Os hidrogênios dos resíduos que não estão envolvidos nas interações (representadas em tracejado) foram omitidos.

Ligante 6H14

Tabela D.6 Interações do ligante 6H14.

Átomo do Ligante	Distância (Å)	Átomo do Resíduo	Átomo do Ligante	Distância (Å)	Átomo do Resíduo
:6H14:H24	2,24	:HIS90:NE2	:6H14:O29	1,75	:TYR385:HE2
:6H14:N3	2,26	:SER530:HB2	:6H14:O30	2,47	:PHE381:HZ
:6H14:O1	2,61	:ARG120:HH12	:6H14:O30	2,14	:SER530:HB2
:6H14:O2	2,55	:SER353:HA	:6H14:O30	1,94	:TYR385:HE2
:6H14:O29	1,97	:PHE381:HE1			
Ligação de hidrogênio					
:6H14:O1	1,63	:ARG120:HH22			
:6H14:O2	2,04	:HIS90:HE2			
:6H14:O30	1,85	:TYR385:HH			
Centroide					
:6H14:centro A	3,79	:ARG513:NH1			

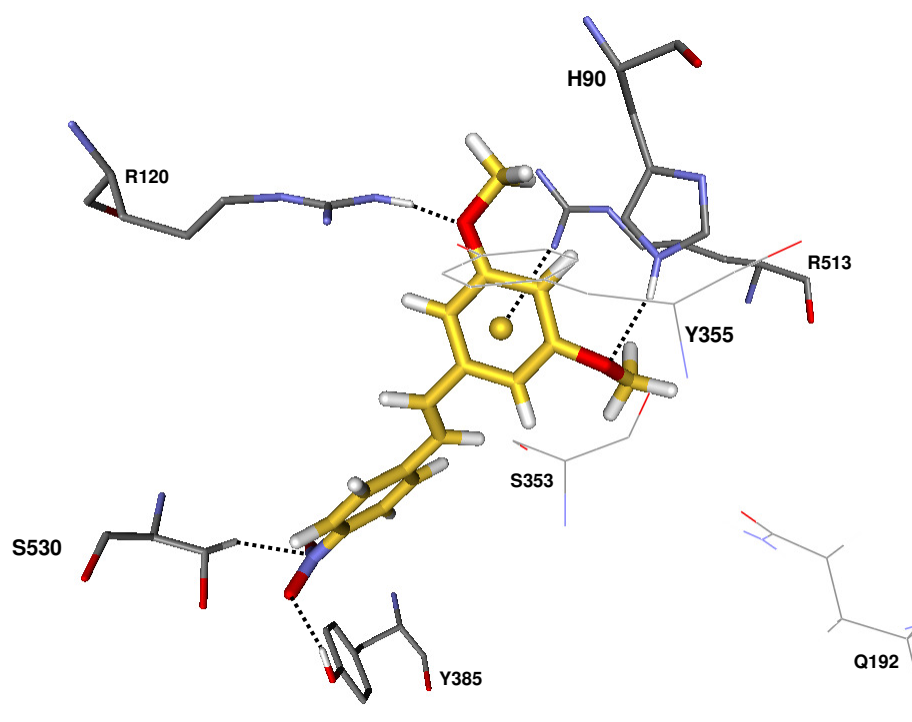


Figura D.6 Principais interações entre o ligante **6H14** (com os carbonos representados em amarelo) e os resíduos do sítio ciclooxigenase da COX-2. Os hidrogênios dos resíduos que não estão envolvidos nas interações (representadas em tracejado) foram omitidos.

Ligante 1M2

Tabela D.7 Interações do ligante 1M2.

Átomo do Ligante	Distância (Å)	Átomo do Resíduo	Átomo do Ligante	Distância (Å)	Átomo do Resíduo
:1M2:H18	2,31	:TYR355:OH	:1M2:O1	2,23	:ARG513:HD1
:1M2:H20	2,28	:LEU352:O	:1M2:O1	2,25	:ARG513:HD2
:1M2:H21	2,48	:ARG513:NH1	:1M2:O2	2,19	:PHE518:HE1
:1M2:H26	2,48	:ARG120:NE	:1M2:O3	2,52	:VAL116:HB
Ligação de hidrogênio					
:1M2:H28	1,42	:LEU352:O			
:1M2:O1	1,90	:ARG513:HH11			
:1M2:O1	2,48	:HIS90:HE2			
Centroide					
:1M2:centro B	3,57	:ARG120:NH1			

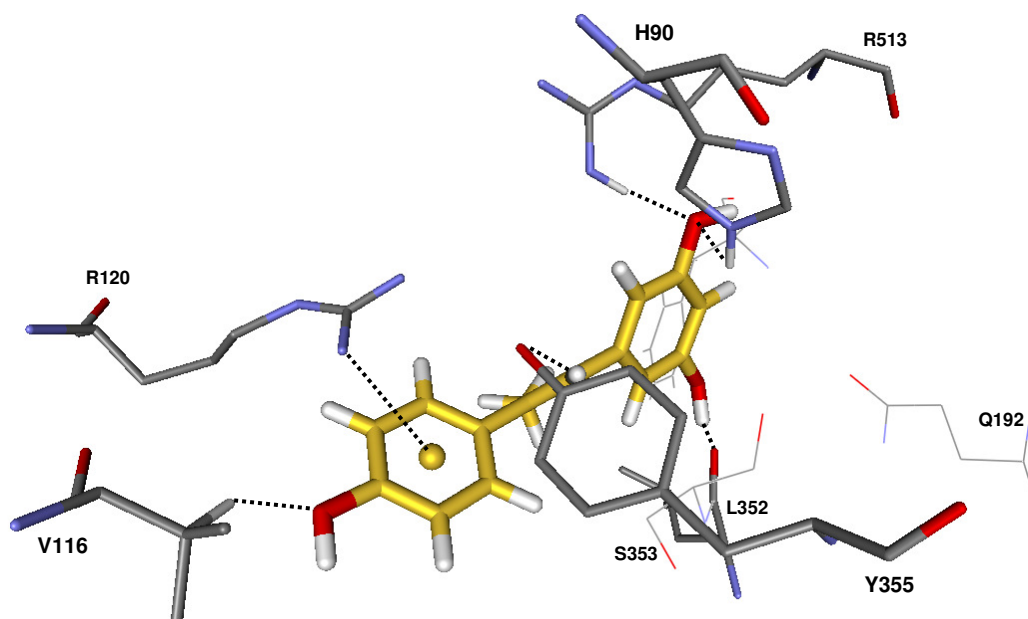


Figura D.7 Principais interações entre o ligante **1M2** (com os carbonos representados em amarelo) e os resíduos do sítio ciclooxigenase da COX-2. Os hidrogênios dos resíduos que não estão envolvidos nas interações (representadas em tracejado) foram omitidos.

Ligante 1M13

Tabela D.8 Interações do ligante 1M13.

Átomo do Ligante	Distância (Å)	Átomo do Resíduo	Átomo do Ligante	Distância (Å)	Átomo do Resíduo
:1M13:F31	1,94	:ALA516:HB1	:1M13:H1	2,65	:HIS90:NE2
:1M13:F32	2,42	:ILE517:HG22	:1M13:H18	2,33	:TYR355:OH
:1M13:F32	2,32	:PHE518:HD1	:1M13:H2	2,07	:LEU532:O
:1M13:F33	2,05	:ALA516:HB1	:1M13:O3	2,53	:LEU531:HD13
:1M13:F33	2,34	:VAL523:HG23	:1M13:O3	2,43	:VAL116:HB
Ligação de hidrogênio					
:1M13:F31	2,54	:ILE517:H			
:1M13:F32	2,45	:PHE518:H			
Centroide					
:1M13:centro A	2,66	:SER353:HA			
:1M13:centro B	3,26	:ARG120:NH1			

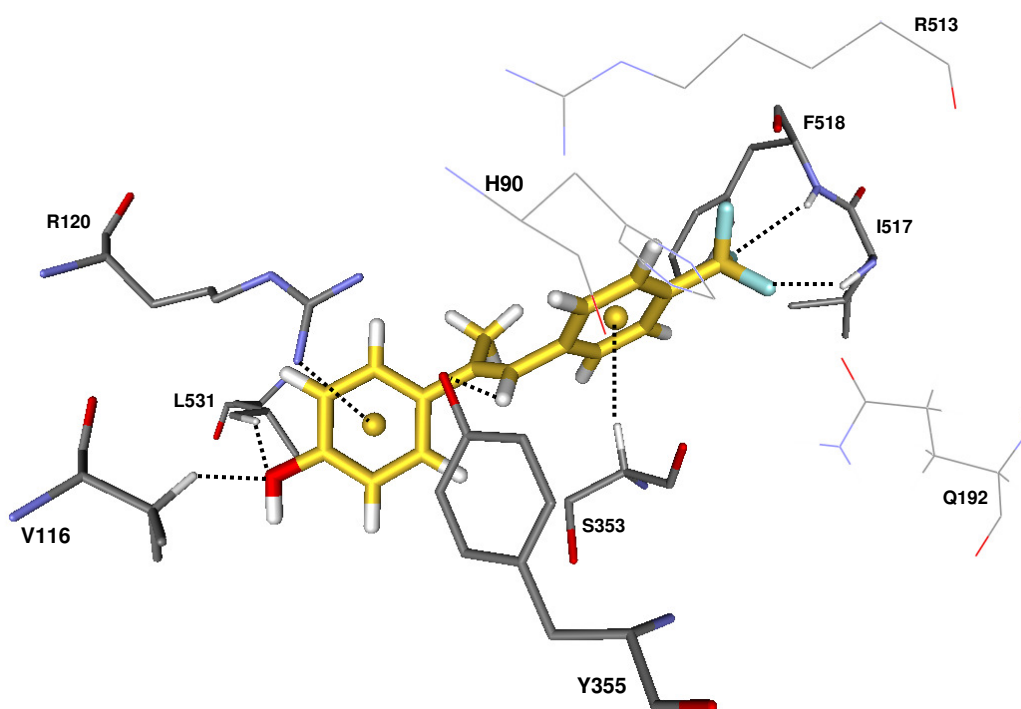


Figura D.8 Principais interações entre o ligante **1M13** (com os carbonos representados em amarelo) e os resíduos do sítio ciclooxigenase da COX-2. Os hidrogênios dos resíduos que não estão envolvidos nas interações (representadas em tracejado) foram omitidos.

Ligante 2M1

Tabela D.9 Interações do ligante 2M1.

Átomo do Ligante	Distância (Å)	Átomo do Resíduo	Átomo do Ligante	Distância (Å)	Átomo do Resíduo
:2M1:H19	2,13	:TYR355:OH	:2M1:O1	2,56	:PHE518:HE1
:2M1:H21	2,21	:LEU352:O	:2M1:O2	2,46	:ARG513:HD1
:2M1:H26	2,56	:ARG120:NE	:2M1:O2	2,53	:HIS90:HD2
:2M1:O1	2,36	:ILE517:HG22	:2M1:O3	2,19	:LEU531:HD13
Ligação de hidrogênio					
:2M1:H27	2,50	:GLN192:OE1			
:2M1:O2	1,74	:ARG513:HH11			
:2M1:O2	2,08	:HIS90:HE2			
Centroide					
:2M1:centro B	3,32	:ARG120:NH1			

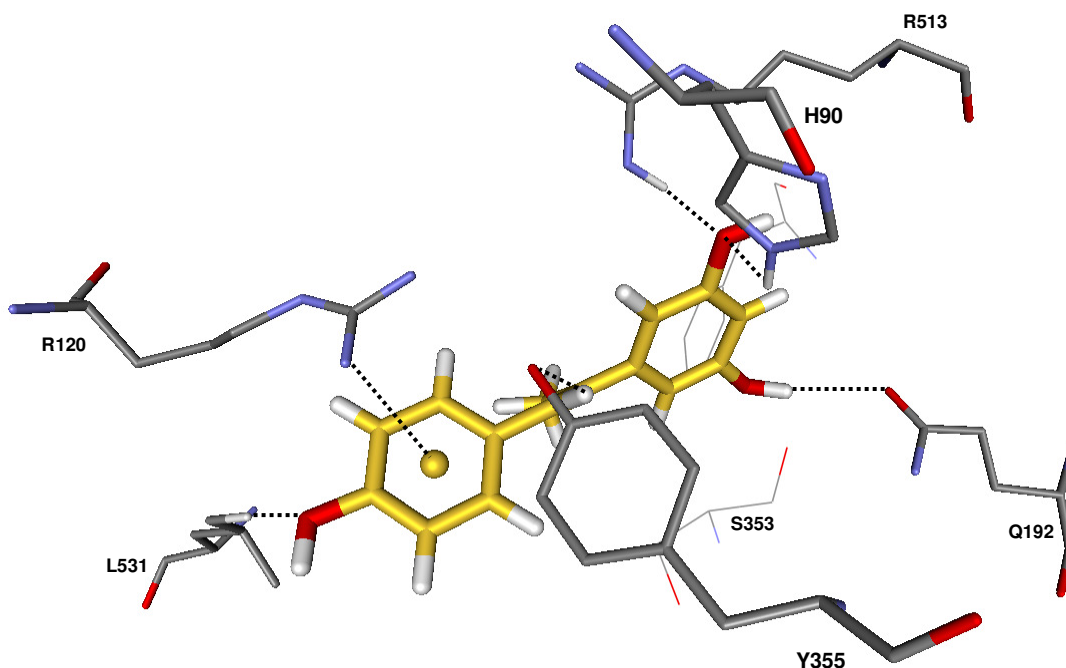


Figura D.9 Principais interações entre o ligante **2M1** (com os carbonos representados em amarelo) e os resíduos do sítio ciclooxigenase da COX-2. Os hidrogênios dos resíduos que não estão envolvidos nas interações (representadas em tracejado) foram omitidos.

Ligante 2M7

Tabela D.10 Interações do ligante 2M7.

Átomo do Ligante	Distância (Å)	Átomo do Resíduo	Átomo do Ligante	Distância (Å)	Átomo do Resíduo
:2M7:H19	2,25	:TYR355:OH	:2M7:O1	2,55	:ARG513:HD2
:2M7:H20	1,94	:LEU352:O	:2M7:O2	2,09	:ILE517:HG22
:2M7:H21	2,40	:ARG513:NH1	:2M7:O26	2,28	:VAL349:HG13
:2M7:H22	2,27	:TYR355:OH	:2M7:O3	2,22	:ARG120:HG2
:2M7:H25	2,45	:ARG120:NE	:2M7:O3	2,22	:LEU531:HD13
:2M7:O1	2,20	:ARG513:HD1			
Ligação de hidrogênio					
:2M7:H28	1,95	:GLN192:OE1			
:2M7:O1	2,17	:ARG513:HH11			
:2M7:O1	2,10	:HIS90:HE2			

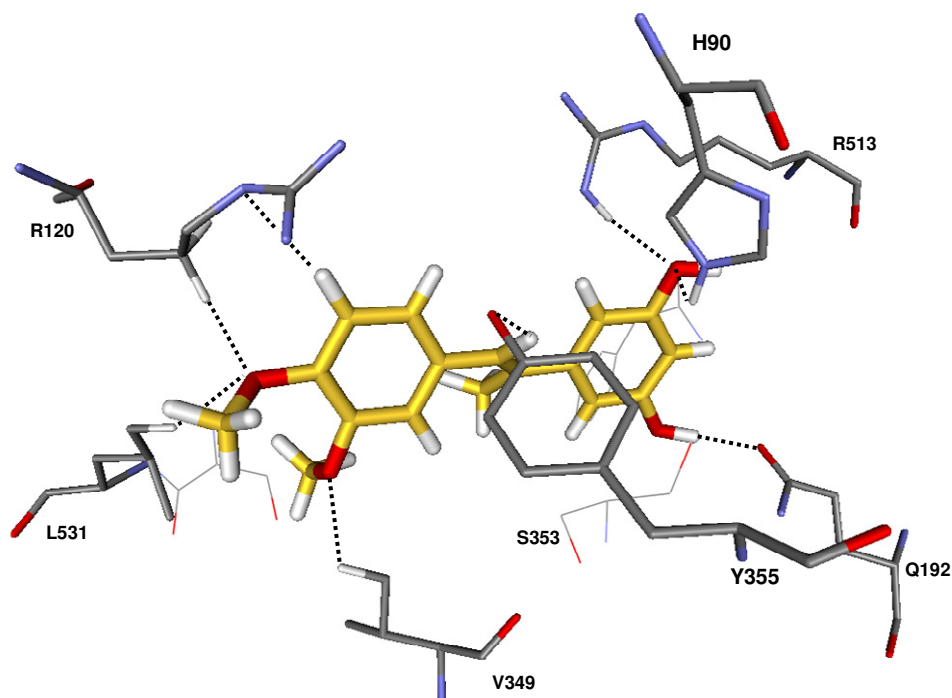


Figura D.10 Principais interações entre o ligante **2M7** (com os carbonos representados em amarelo) e os resíduos do sítio ciclooxigenase da COX-2. Os hidrogênios dos resíduos que não estão envolvidos nas interações (representadas em tracejado) foram omitidos.

Ligante 2M16

Tabela D.11 Interações do ligante 2M16.

Átomo do Ligante	Distância (Å)	Átomo do Resíduo	Átomo do Ligante	Distância (Å)	Átomo do Resíduo
:2M16:H19	2,31	:TYR355:OH	:2M16:O1	2,59	:PHE518:HE1
:2M16:H21	2,12	:LEU352:O	:2M16:O2	2,47	:ARG513:HD1
:2M16:N3	2,13	:LEU531:HD13	:2M16:O2	2,56	:ARG513:HD2
:2M16:O1	2,16	:ILE517:HG22			
Ligação de hidrogênio					
:2M16:H27	1,61	:LEU352:O			
:2M16:O2	1,74	:ARG513:HH11			
:2M16:O2	2,22	:HIS90:HE2			
Centroide					
:2M16:centro B	3,40	:ARG120:NH1			

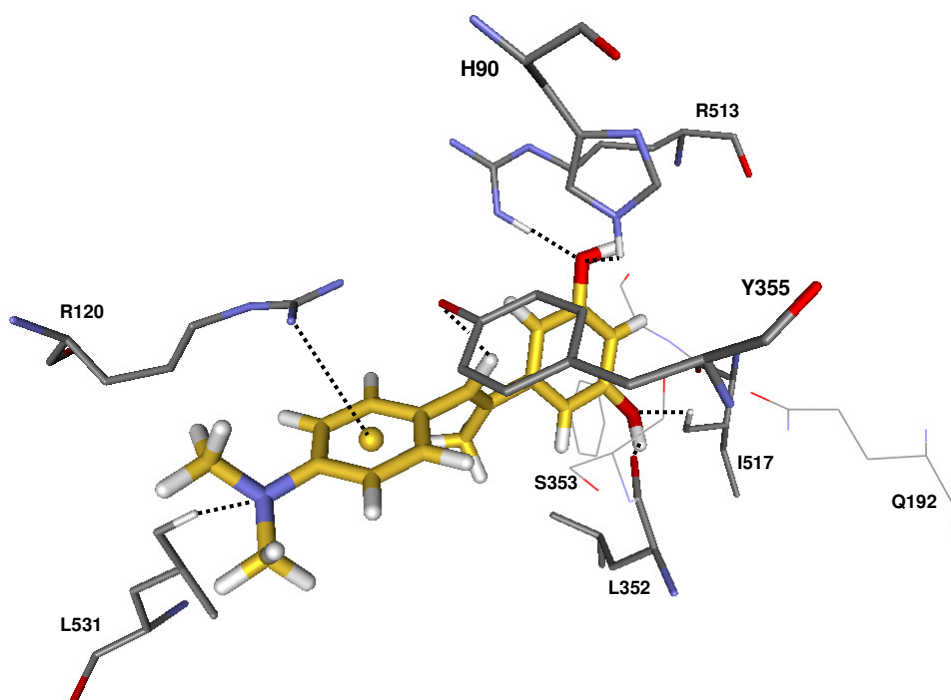


Figura D.11 Principais interações entre o ligante 2M16 (com os carbonos representados em amarelo) e os resíduos do sítio ciclooxigenase da COX-2. Os hidrogênios dos resíduos que não estão envolvidos nas interações (representadas em tracejado) foram omitidos.

Ligante 5M2

Tabela D.12 Interações do ligante 5M2.

Átomo do Ligante	Distância (Å)	Átomo do Resíduo	Átomo do Ligante	Distância (Å)	Átomo do Resíduo
:5M2:H18	2,42	:TYR355:OH	:5M2:O1	2,20	:PHE518:HE1
:5M2:H20	2,51	:ARG513:NH1	:5M2:O2	2,28	:ARG513:HD1
:5M2:H21	2,27	:LEU352:O	:5M2:O2	2,29	:ARG513:HD2
:5M2:H26	2,45	:ARG120:NE	:5M2:O3	2,29	:LEU531:HD13
Ligação de hidrogênio					
:5M2:H27	2,90	:GLN192:OE1			
:5M2:O2	1,88	:ARG513:HH11			
:5M2:O2	2,46	:HIS90:HE2			
Centroide					
:5M2:centro B	3,60	:ARG120:NH1			

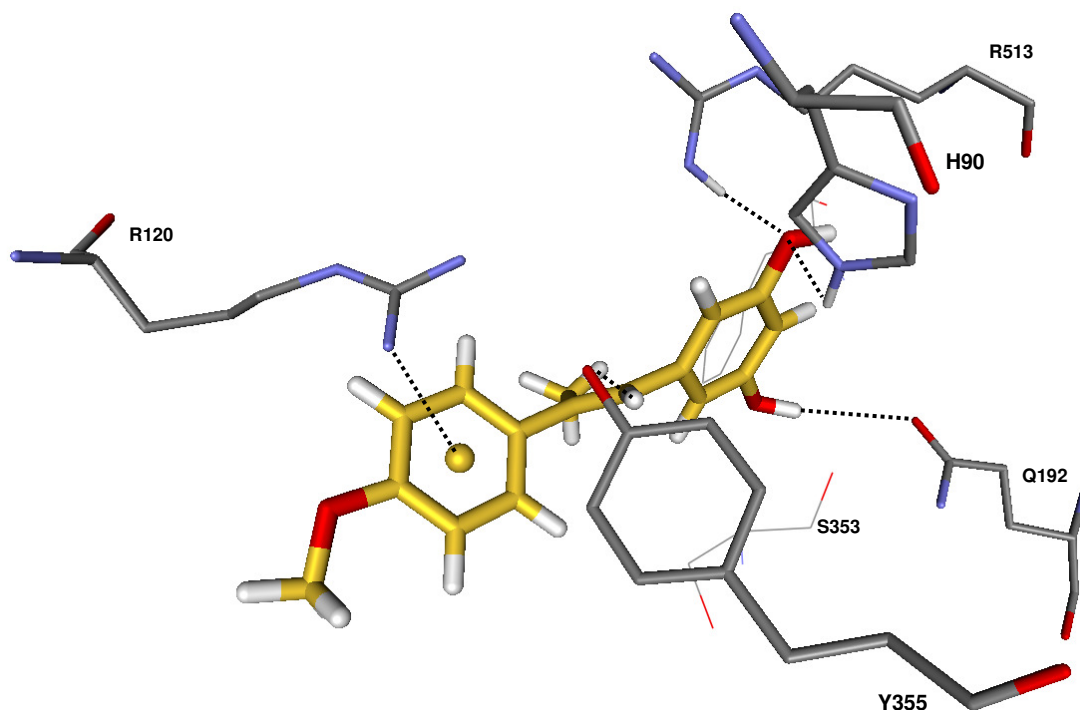


Figura D.12 Principais interações entre o ligante **5M2** (com os carbonos representados em amarelo) e os resíduos do sítio ciclooxigenase da COX-2. Os hidrogênios dos resíduos que não estão envolvidos nas interações (representadas em tracejado) foram omitidos.

Ligante 10M2

Tabela D.13 Interações do ligante 10M2.

Átomo do Ligante	Distância (Å)	Átomo do Resíduo	Átomo do Ligante	Distância (Å)	Átomo do Resíduo
:10M2:F26	2,30	:ALA527:HB1	:10M2:H27	2,18	:LEU352:O
:10M2:F26	2,27	:ARG120:HD1	:10M2:O1	2,51	:LEU352:HG
:10M2:F26	1,96	:ARG120:HG2	:10M2:O1	2,23	:PHE518:HE1
:10M2:H18	2,34	:TYR355:OH	:10M2:O2	2,35	:ARG513:HD1
:10M2:H20	2,52	:ARG513:NH1	:10M2:O2	2,35	:ARG513:HD2
:10M2:H21	2,29	:LEU352:O			
Ligação de hidrogênio					
:10M2:O2	2,04	:ARG513:HH11			
:10M2:O2	2,49	:HIS90:HE2			
Centroide					
:10M2:centro B	3,37	:ARG120:NH1			
:10M2:centro B	3,90	:ARG120:NH2			
:10M2:centro B	2,67	:TYR355:HH			

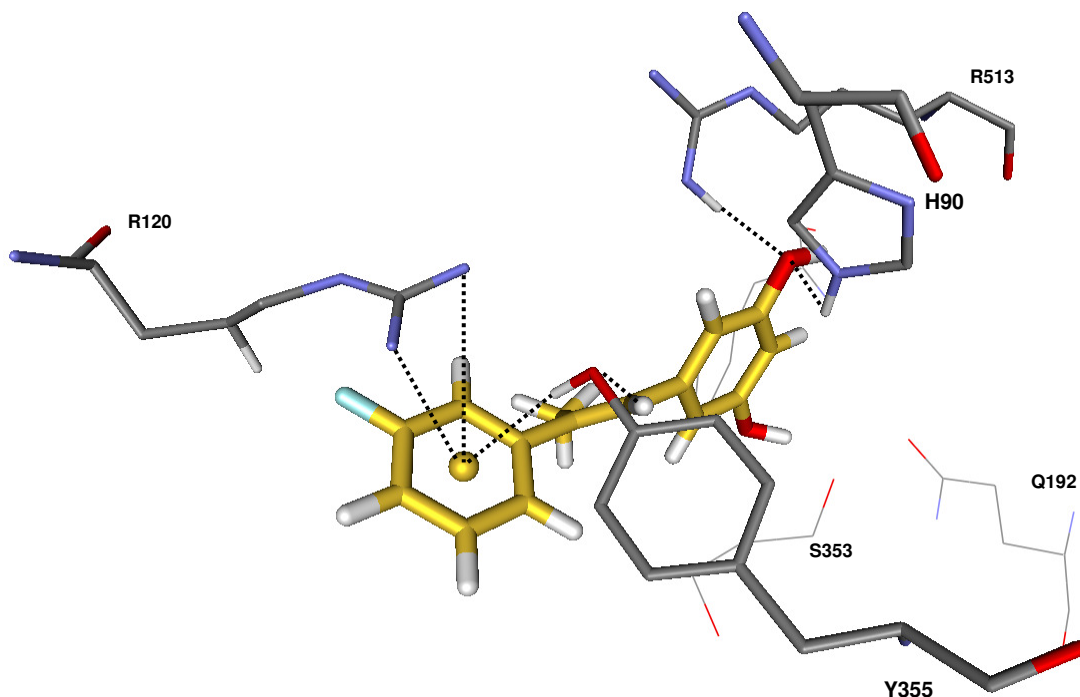


Figura D.13 Principais interações entre o ligante **10M2** (com os carbonos representados em amarelo) e os resíduos do sítio ciclooxigenase da COX-2. Os hidrogênios dos resíduos que não estão envolvidos nas interações (representadas em tracejado) foram omitidos.

Ligante 2E16

Tabela D.14 Interações do ligante 2E16.

Átomo do Ligante	Distância (Å)	Átomo do Resíduo	Átomo do Ligante	Distância (Å)	Átomo do Resíduo
:2E16:H19	2,35	:TYR355:OH	:2E16:O1	2,12	:ILE517:HG22
:2E16:H21	2,11	:LEU352:O	:2E16:O2	2,44	:ARG513:HD1
:2E16:N3	2,15	:LEU531:HD13	:2E16:O2	2,55	:ARG513:HD2
Ligação de hidrogênio					
:2E16:H27	1,68	:LEU352:O			
:2E16:O2	1,73	:ARG513:HH11			
:2E16:O2	2,21	:HIS90:HE2			
Centroide					
:2E16:centro B	3,58	:ARG120:NH1			

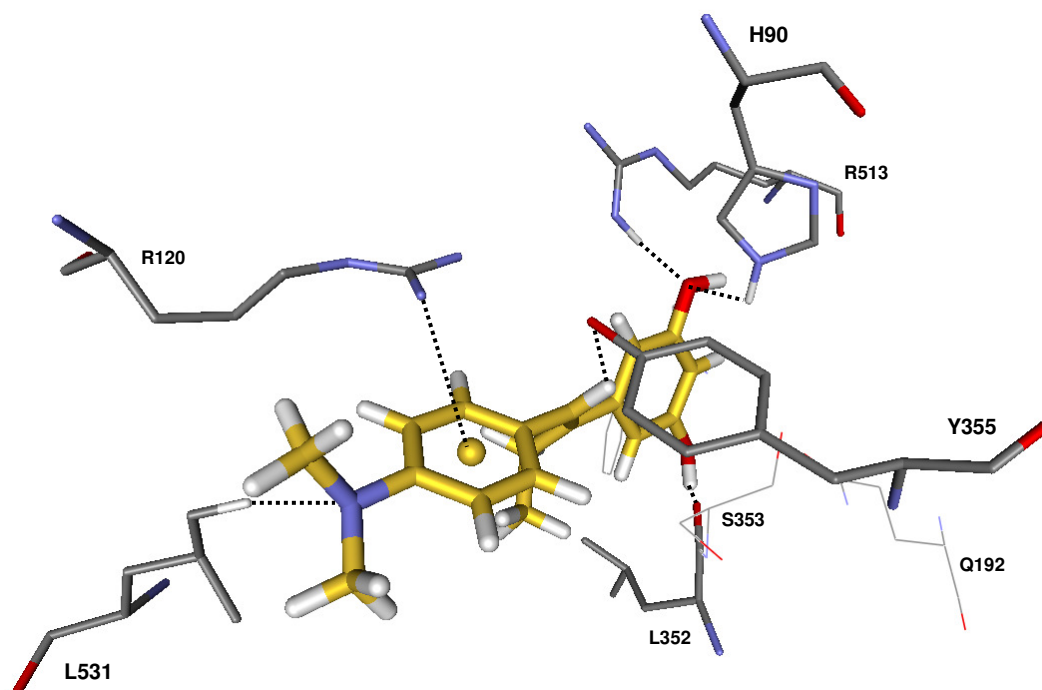


Figura D.14 Principais interações entre o ligante **2E16** (com os carbonos representados em amarelo) e os resíduos do sítio ciclooxigenase da COX-2. Os hidrogênios dos resíduos que não estão envolvidos nas interações (representadas em tracejado) foram omitidos.

Ligante 10E2

Tabela D.15 Interações do ligante 10E2.

Átomo do Ligante	Distância (Å)	Átomo do Resíduo	Átomo do Ligante	Distância (Å)	Átomo do Resíduo
:10E2:F25	2,21	:LEU359:HD13	:10E2:O1	2,56	:LEU352:HG
:10E2:F25	2,56	:LEU359:HD23	:10E2:O1	2,29	:PHE518:HE1
:10E2:H18	2,35	:TYR355:OH	:10E2:O2	2,33	:ARG513:HD1
:10E2:H20	2,52	:ARG513:NH1	:10E2:O2	2,33	:ARG513:HD2
:10E2:H21	2,26	:LEU352:O	:10E2:O2	2,61	:VAL523:HG23
:10E2:H26	2,43	:ARG120:NE			
Ligação de hidrogênio					
:10E2:H27	2,92	:GLN192:OE1			
:10E2:O2	1,91	:ARG513:HH11			
:10E2:O2	2,46	:HIS90:HE2			
Centroide					
:10E2:centro B	3,46	:ARG120:NH1			
:10E2:centro B	4,00	:ARG120:NH2			

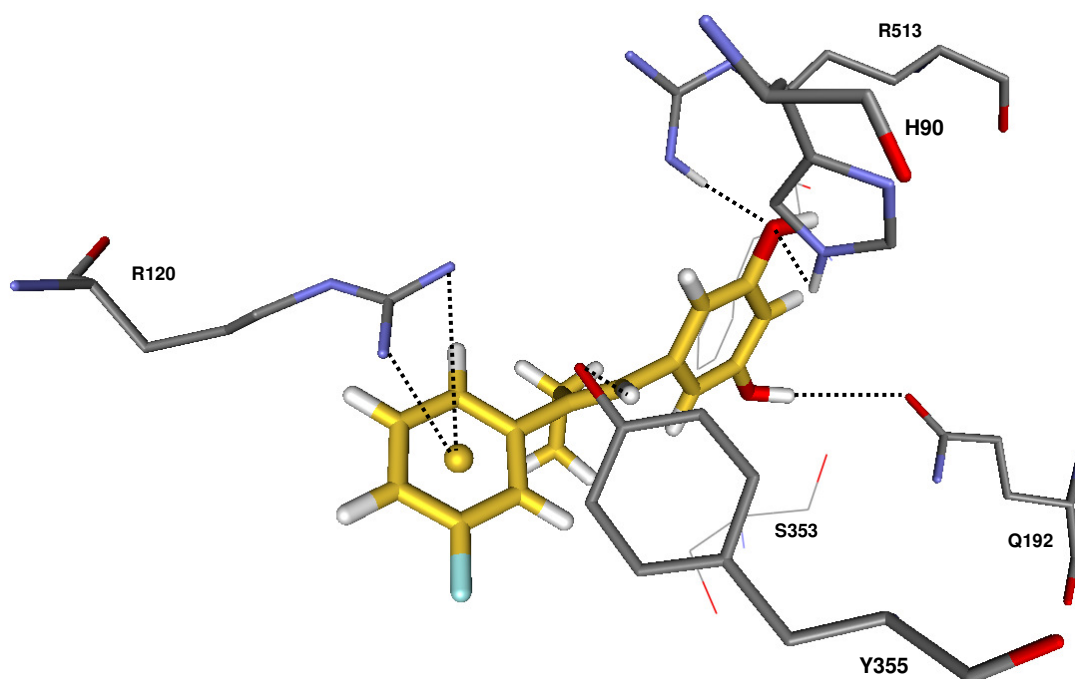


Figura D.15 Principais interações entre o ligante **10E2** (com os carbonos representados em amarelo) e os resíduos do sítio ciclooxigenase da COX-2. Os hidrogênios dos resíduos que não estão envolvidos nas interações (representadas em tracejado) foram omitidos.

Ligante 15E2

Tabela D.16 Interações do ligante 15E2.

Átomo do Ligante	Distância (Å)	Átomo do Resíduo	Ligante	Distância (Å)	Átomo do Resíduo
:15E2:H18	2,40	:TYR355:OH	:15E2:O1	2,53	:ILE517:HG22
:15E2:H20	2,31	:ARG513:NH1	:15E2:O1	2,57	:PHE518:HE1
:15E2:H21	2,19	:LEU352:O	:15E2:O2	2,23	:ARG513:HD1
:15E2:H26	2,33	:ARG120:NE	:15E2:O2	2,28	:ARG513:HD2
Ligação de hidrogênio					
:15E2:H27	2,63	:GLN192:OE1			
:15E2:O2	2,07	:ARG513:HH11			
:15E2:O2	2,51	:HIS90:HE2			
Centroide					
:15E2:centro B	4,43	:ARG120:NH2			
:15E2:centro C	4,14	:ARG120:NH1			

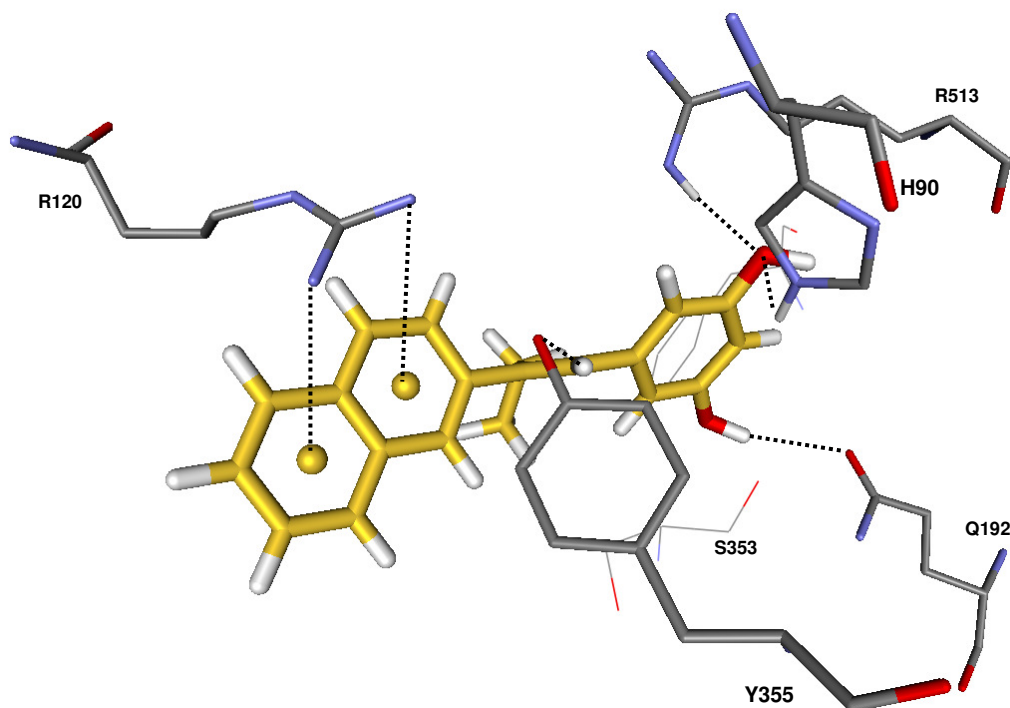


Figura D.16 Principais interações entre o ligante **15E2** (com os carbonos representados em amarelo) e os resíduos do sítio ciclooxigenase da COX-2. Os hidrogênios dos resíduos que não estão envolvidos nas interações (representadas em tracejado) foram omitidos.

Ligante 16E2

Tabela D.17 Interações do ligante 16E2.

Átomo do Ligante	Distância (Å)	Átomo do Resíduo	Átomo do Ligante	Distância (Å)	Átomo do Resíduo
:16E2:H18	2,46	:TYR355:OH	:16E2:N3	2,62	:VAL116:HB
:16E2:H20	2,10	:LEU352:O	:16E2:O1	2,16	:ARG513:HD1
:16E2:H21	2,46	:ARG513:NH1	:16E2:O1	2,18	:ARG513:HD2
:16E2:H23	2,60	:ARG120:NH2	:16E2:O2	2,53	:ILE517:HG22
:16E2:H26	2,58	:ARG120:NE	:16E2:O2	2,29	:PHE518:HE1
Ligação de hidrogênio					
:16E2:H28	1,45	:LEU352:O			
:16E2:O1	1,98	:ARG513:HH11			
Centroide					
:16E2:centro B	2,63	:TYR355:HH			

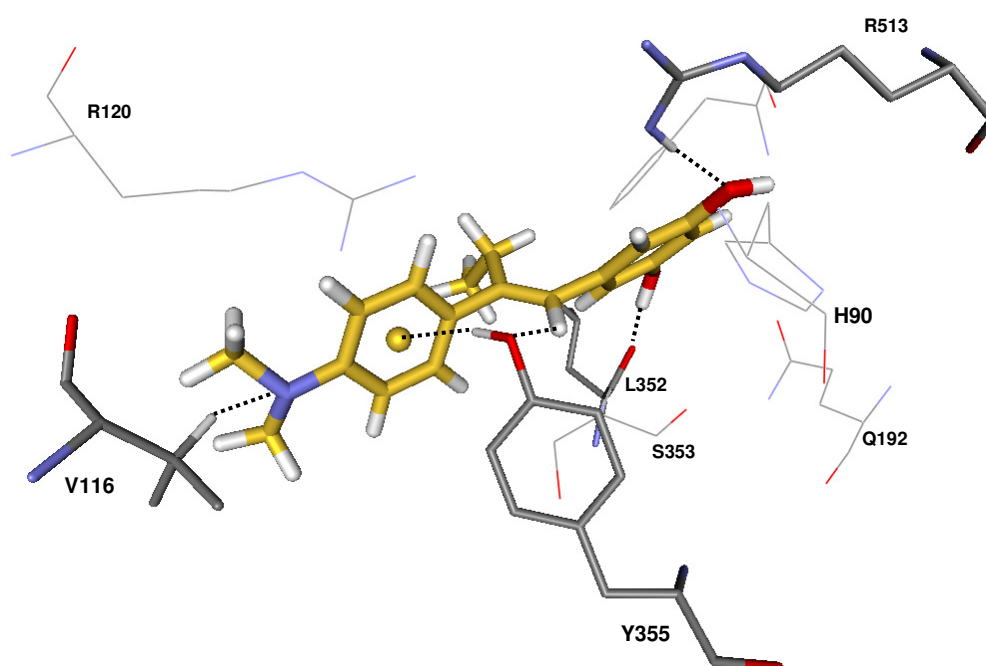


Figura D.17 Principais interações entre o ligante **16E2** (com os carbonos representados em amarelo) e os resíduos do sítio ciclooxigenase da COX-2. Os hidrogênios dos resíduos que não estão envolvidos nas interações (representadas em tracejado) foram omitidos.