

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

PAULO ROBERTO GABBAI ARMELIN

MODELAGEM MOLECULAR DE DERIVADOS
PIRIMIDÍNICOS E ESTUDOS DE *DOCKING*
NAS ENZIMAS CICLOOXIGENASE 1 E
CICLOOXIGENASE 2

São Carlos
2010

PAULO ROBERTO GABBAI ARMELIN

MODELAGEM MOLECULAR DE DERIVADOS
PIRIMIDÍNICOS E ESTUDOS DE *DOCKING*
NAS ENZIMAS CICLOOXIGENASE 1 E
CICLOOXIGENASE 2

Dissertação de Mestrado apresentada
ao Programa de Mestrado em
Biotecnologia da Universidade Federal
de São Carlos para obtenção do título
de Mestre em Biotecnologia.

Orientadora: Profa. Dra. Ignez Caracelli
Orientador: Prof. Dr. Julio Zukerman Schpector

São Carlos
2010

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

A728mm

Armelin, Paulo Roberto Gabbai.

Modelagem molecular de derivados pirimidínicos e estudos de docking nas enzimas ciclooxigenase 1 e ciclooxigenase 2 / Paulo Roberto Gabbai Armelin. -- São Carlos : UFSCar, 2011.

124 f.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2010.

1. Biotecnologia. 2. Ciclooxigenase 1. 3. Ciclooxigenase 2. 4. Pirimidinas. 5. Docking. 6. Modelagem molecular. I. Título.

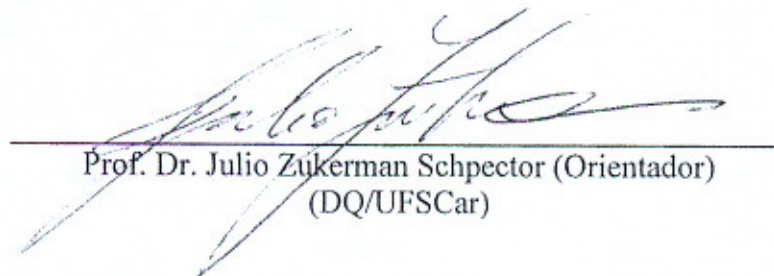
CDD: 660.6 (20^a)

Paulo Roberto Gabbai Armelin

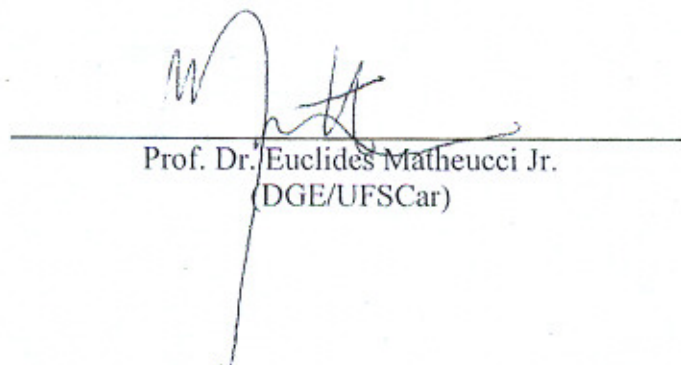
Dissertação de Mestrado submetida
à Coordenação do Programa de
Pós-Graduação em Biotecnologia,
da Universidade Federal de São
Carlos, como requisito parcial para
a obtenção do título de Mestre em
Biotecnologia

Aprovado em: 23/11/2010

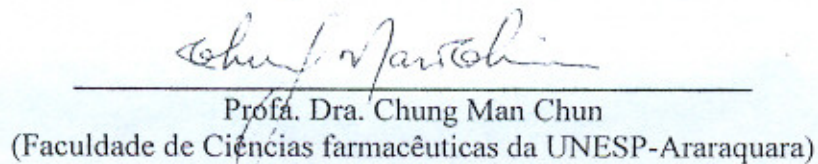
BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. Julio Zukerman Schpector (Orientador)
(DQ/UFSCar)



Prof. Dr. Euclides Matheucci Jr.
(DGE/UFSCar)



Prof. Dra. Chung Man Chun
(Faculdade de Ciências farmacêuticas da UNESP-Araraquara)

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho com todo amor, afeto e respeito a meu pai Paulo Roberto Armelin e a minha mãe Vera Gabbai Armelin que sempre me apoiaram em minhas empreitadas. Sou o homem que sou graças a meus pais que me ajudaram e ainda me ajudam a ter e exercitar as virtudes dos homens de bem.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a meus orientadores Iñez Caracelli e Julio Zukerman Schpector, incansáveis em seus papéis de tutores, que muito me ajudaram, tornando possível a conclusão dessa dissertação.

Agradeço a minha irmã Paula, pelas conversas... sempre me apoiando e aconselhando. Essa baixinha sempre me deu muito orgulho! Gosto de ser seu irmão mais velho, que às vezes parece mais novo.

Agradeço a meus colegas do laboratório LaCrEMM Lucas, Josi, Stella, Sergio, Denis e André que acabaram se tornando grandes amigos, pois estavam sempre presentes e dispostos nas horas em que mais precisei. Muitas vezes “várias cabeças” pensam melhor que uma. Nas horas em que jogamos conversa fora, eles também se fizeram presentes... estas também foram maravilhosas horas.

Agradeço a toda comissão do programa de pós-graduação em Biotecnologia-UFSCar, principalmente ao coordenador Prof. Dr. Fernando Araújo-Moreira e a secretária Claudia, que cuidam com muito carinho do nosso programa e de toda sua burocracia.

Agradeço a CAPES que patrocinou parte de meu trabalho... e este patrocínio foi muito bem vindo.

ARMELIN, P. R. G. **Modelagem molecular de derivados pirimidínicos e estudos de docking nas enzimas ciclooxigenase 1 e ciclooxigenase 2**. 2010. 124f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia)- Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2010.

RESUMO

Neste trabalho, o *docking* molecular foi utilizado para o estudo da formação de complexos alvo-ligante das enzimas Ciclooxigenase 1 (COX-1) e Ciclooxigenase 2 (COX-2) com derivados pirimidínicos, com a finalidade de entender os possíveis mecanismos de ação e, assim, propor modificações nos compostos visando diminuir prováveis efeitos colaterais. Os ligantes escolhidos foram uma série de 25 pirimidinas substituídas com atividade conhecida. As estruturas tridimensionais destas moléculas foram obtidas por modelagem molecular e as das enzimas dos bancos de dados *PDB* e *PDBSum* sob o código 2OYE e 1CX2 para COX-1 e COX-2 respectivamente. Os sítios de ligação escolhidos para os cálculos de *docking* foram de 20 Å ao redor dos ligantes cristalográficos IM8-700 (2OYE) e SC-558 (1CX2). Das pirimidinas analisadas as que formaram complexo com a COX-1 se orientaram com a porção SO₂Me formando ligações de hidrogênio com a Ile517 e Phe518. Sendo o benzo[b]tiofen-2-ilmetil-2-(4-metanosulfonilfenil)-6-trifluorometilpirimidina-4-il]amina o mais favorável para a formação de complexo com a COX-1. Para a COX-2, os compostos que se ligaram mostram um padrão que inclui ligações de hidrogênio entre a porção SO₂Me e a His90 e Arg513 do bolso lateral e entre a Arg120 e Tyr355 com os grupos substituintes do anel pirimidínico. A presença de um pequeno bolso lipofílico na COX-2 e os resultados de *docking* permitem sugerir que os ligantes **2**, **15**, **17**, **22** e **23** poderiam mostrar melhor atividade mediante a adição de um grupo hidrofóbico no anel fenila ou tiofenila para que este grupo se posicione dentro desse bolso. Em ambos os casos o tipo de inibição provável é o competitivo. Como a busca por novos fármacos anti-inflamatórios deve lidar com um equilíbrio entre a inibição de COX-2 e COX-1, os ligantes **2** e **22** que apresentaram resultados favoráveis para a COX-2 e não tanto para a COX-1 seriam os mais promissores e, portanto, aqueles que poderiam ser testados *in vivo*.

Palavras-Chaves: Ciclooxigenase 1, Ciclooxigenase 2, Pirimidinas, Docking, Modelagem Molecular.

ARMELIN, P. R. G. **Molecular Modeling of pyrimidine derivatives and docking studies in the enzymes cyclooxygenases 1 and 2.** 2010. 124f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia)- Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2010.

ABSTRACT

In this research molecular docking was used to study enzyme-ligand complexes of Cyclooxygenase 1 (COX-1) and Cyclooxygenase 2 (COX-2) with pyrimidine derivatives, aiming at understanding the possible mechanisms of action of these compounds and, thus, suggest modifications that could increase their specificity. The chosen ligands were a series of 25 substituted pyrimidines with known activity. The three-dimensional structures of these compounds were obtained by molecular modeling and that of the enzymes from the PDB and PDBSum under the codes 2OYE and 1CX2 for COX-1 and COX-2 respectively. The binding sites chosen for the docking studies were 20 Å around the crystallographic ligands IM8-700 (2OYE) and SC-558 (1CX2). In the COX-1 formed complexes the SO₂Me moiety is positioned in such a way as to form hydrogen bonds with Ile517 and Phe518. The benzo[b]thiophen-2-ylmethyl-[2-(4-methanesulfonylphenyl)-6-trifluoromethylpyrimidin-4-yl]amine formed the most favorable complex with COX-1. In COX-2, the enzyme-ligand interaction pattern shows the SO₂Me group in the side pocket, forming hydrogen bonds with His90 and Arg513 and the different substituent groups of the pyrimidine ring form hydrogen bonds with Arg120 and Tyr355. The presence of a small lipophilic pocket in COX-2 and the docking results suggest that the ligands **2**, **15**, **17**, **22** and **23** may have their activity enhanced by the addition of a hydrophobic group on the phenyl or thiophenyl rings so this group can interact within this pocket. In both cases the mechanism of inhibition is probably competitive. As the search for new anti-inflammatory drugs must deal with a subtle balance of COX-2 and COX-1 inhibitions, the ligands **2** and **22** that showed better results for COX-2 rather than for COX-1 would be the most promising ones and therefore, those that should be tested *in vivo*.

Keywords: Cyclooxygenase 1, Cyclooxygenase 2, Pyrimidines, Docking, Molecular Modeling.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1 -	Alguns AINEs.....	13
Figura 1.1.1 -	Estruturas das prostaglandinas.....	15
Figura 1.1.1.1 -	A cascata do ácido araquidônico.....	16
Figura 1.1.1.2 -	Estrutura tridimensional do ácido araquidônico indicando a numeração dos átomos.....	17
Figura 1.1.1.3 -	Sequência para conversão do ácido araquidônico a prostaglandina G ₂	17
Figura 1.1.1.4 -	COX-1 complexada com flurbiprofeno (3n8z).....	18
Figura 1.1.1.5 -	COX-1 com o ácido araquidônico em seu sítio ativo ciclooxigenase..	19
Figura 1.1.1.6 -	Sítio ativo da COX-1 com seu substrato ácido araquidônico e algumas de suas interações.....	20
Figura 1.1.1.7 -	Bolso catalítico da COX-1.....	20
Figura 1.1.1.8 -	Ligante IM8-700 no sítio ativo da COX-1.....	21
Figura 1.1.1.9 -	COX-2 com o ácido araquidônico em seu sítio ativo.....	22
Figura 1.1.1.10 -	Ácido araquidônico no sítio ativo da COX-2.....	23
Figura 1.1.1.11 -	Inibidor SC-558 no sítio da COX-2.....	24
Figura 1.1.2.1 -	Representação do sítio ativo das enzimas COX-1 e COX-2.....	26
Figura 1.1.2.2 -	Representação esquemática do sítio da ciclooxigenase 2.....	27
Figura 1.3.1 -	Inibidor de COX-2 baseado em pirimidina.....	29
Figura 1.3.2 -	Pirimidinas escolhidas para o estudo de <i>docking</i> nas enzimas COX-1 e COX-2.....	30
Figura 3.1.1 -	<i>Docking</i>	34
Figura 3.1.2 -	Representação esquemática de um GA básico.....	35
Figura 3.3.1 -	Estrutura selecionada como ponto de partida para a modelagem dos compostos desejados.....	38
Figura 3.3.2 -	Derivados pirimidínicos de 1 a 25 utilizados nos cálculos de <i>docking</i> .	39
Figura 4.1.1 -	Resultados para o <i>redocking</i> dos ligantes cristalográfico IM8-700 (COX-1) e SC-558 (COX-2).....	42
Figura 4.2.1.1 -	Pirimidina 4 e ácido araquidônico sobrepostos no sítio de ligação da ciclooxigenase 1.....	45
Figura 4.2.1.2 -	Composto 4 no sítio de ligação da COX-1.....	46
Figura 4.3.1.1 -	Pirimidina 2 e ácido araquidônico sobrepostos no sítio de ligação da ciclooxigenase 2.....	49
Figura 4.3.1.2 -	Pirimidinas 2 , 15 , 17 , 22 e 23 sobrepostas no sítio de ligação da COX-2.....	50
Figura 4.3.1.3 -	Composto 17 no sítio de ligação da COX-2.....	51

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.3.1 -	Atividades inibitórias da COX-2 para as pirimidinas de 1 a 25	32
Tabela 4.2.1 -	Valores de <i>score de fitness</i> para as pirimidinas de 1 a 25 em complexo com a COX-1.....	43
Tabela 4.2.1.1 -	Interações das pirimidinas com os resíduos de aminoácido do sítio da COX-1.....	44
Tabela 4.3.1 -	Valores de <i>score de fitness</i> para as pirimidinas de 1 a 25 em complexo com a COX-2.....	47
Tabela 4.3.1.1 -	Interações das pirimidinas com os resíduos de aminoácido do sítio da COX-2.....	48
Tabela 5.1 -	<i>Scores</i> e dados de inibição das pirimidinas 2, 15, 17, 22 e 23	53
Tabela 5.2 -	Valores de <i>score</i> , IC ₅₀ e IS das pirimidinas 4, 5, 7, 13, 19, 21 e 25	54

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AA	Ácido Araquidônico
AINEs	Antiinflamatórios não-esteróides
COX-1	Ciclooxigenase-1
COX-2	Ciclooxigenase-2
CSD	Cambridge Structural Database
EBI	European Bioinformatics Institute
EGF	Fator de Crescimento Epidermal
GA	Algoritmo Genético
GOLD	Genetic Optimization for Ligand Docking
IS	Índice de seletividade
km	Constante de Michaelis
MBD	Domínio de Ligação à Membrana
Me	Metil (CH ₃)
PDB	Protein Data Bank
PGs	Prostaglandinas
PGD₂	Prostaglandina D ₂
PGE₂	Prostaglandina E ₂
PGF_{2α}	Prostaglandina F _{2α}
PGG₂	Prostaglandina G ₂
PGH₂	Prostaglandina H ₂
PGI₂	Prostaglandina I ₂
PQS	Protein Quaternary Structure
RE	Retículo Endoplasmático
SNC	Sistema Nervoso Central
TXA₂	Tromboxana A ₂

SUMÁRIO

1. Introdução	13
1.1 Ciclooxigenase	14
1.1.1 Mecanismo Catalítico e Estrutura Tridimensional das COXs.....	15
1.1.2 Semelhanças e Diferenças entre COX-1 e COX-2.....	24
1.2 Antiinflamatórios não-esteróides (AINEs).....	28
1.3 Derivados Pirimidínicos.....	29
2. Objetivo	33
3. Materiais e Métodos	34
3.1 <i>Docking</i>	34
3.2 Obtenção das Estruturas Tridimensionais das Proteínas.....	37
3.3 Obtenção das Estruturas Tridimensionais e Modelagem Molecular dos Ligantes.....	38
3.4 Análises das Orientações dos Compostos.....	41
4. Resultados e Discussão	42
4.1 <i>Redocking</i> (Validação).....	42
4.2 COX-1.....	43
4.2.1 Análise geral sobre os complexos pirimidinas-COX-1.....	44
4.3 COX-2.....	47
4.3.1 Análise geral sobre os complexos pirimidinas-COX-2.....	48
5. Comparação com os Resultados Experimentais da Literatura	53
6. Conclusões	55
7. Referências Bibliográficas	56
8. Anexo A: Descrição completa das pirimidinas complexadas com a COX-1 (figuras e tabelas de interações).....	59
9. Anexo B: Descrição completa das pirimidinas complexadas com a COX-2 (figuras e tabelas de interações).....	89

1. INTRODUÇÃO

Os antiinflamatórios não-esteróides (AINEs) estão entre os agentes terapêuticos mais amplamente utilizados no mundo inteiro. Geralmente são prescritos para aliviar dores musculoesqueléticas “reumáticas” e muitas vezes tomados sem prescrição médica para outras dores. Há mais de 50 AINEs diferentes no mercado, alguns dos quais são mostrados na Figura 1.1, no entanto nenhum deles é ideal para controlar ou modificar os sinais e sintomas da inflamação, particularmente aqueles observados nas doenças articulares inflamatórias, e mais ainda, todos apresentam efeitos colaterais indesejáveis (VONKEMAN e van de LAAR, 2010).

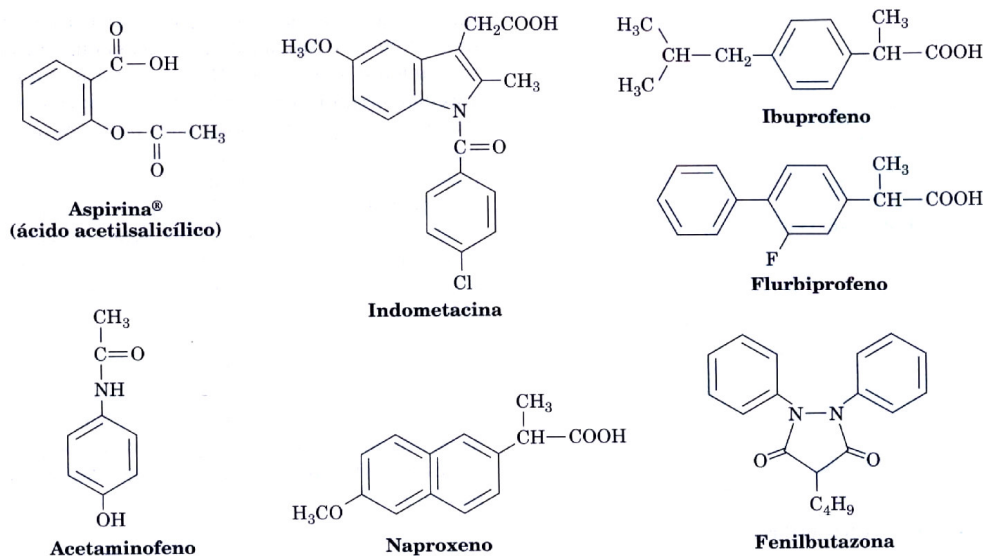


Figura 1.1 Alguns AINEs (DrugBank).

Esta classe de compostos foi planejada com a finalidade de inibir a isoforma 2 da ciclooxigenase (COX-2) enzima que é induzida por estímulos inflamatórios e traumas tissulares. Entretanto, a inibição também da isoforma 1 (COX-1), que é constitutiva e está envolvida na produção de prostaglandinas para citoproteção gástrica e manutenção da homeostase renal e plaquetária, é responsável pelos efeitos colaterais (BATLOUNI, 2010; VONKEMAN e van de LAAR, 2010). Um caso, relativamente recente, envolveu o 4-[4-

(metilsulfonil)-fenil]-3-fenil-2(5H)-furanona (Vioxx[®]) que foi finalmente retirado do mercado pela possibilidade de causar danos ao miocárdio (McGETTIGAN e HENRY, 2006).

Portanto, existe ainda a necessidade de estudos que levem a descoberta de novos compostos, cujos efeitos colaterais sejam mínimos, e isto envolve um equilíbrio sutil da inibição das COX-1 e COX-2, o que implica no conhecimento de correlações estrutura-mecanismo de ação-atividade que permitam propor modificações estruturais dos AINEs tendo como resultado a minimização dos efeitos colaterais.

Para contribuímos ao entendimento dos possíveis mecanismos de inibição escolhemos uma série de pirimidinas com atividade inibitória conhecida (ORJALES *et al.*, 2008). Estes compostos foram modelados e estudados *via docking* molecular, que é uma simulação computacional da formação de complexos enzima-ligante. Ambos os estudos deverão servir de base para o desenho de novos inibidores. No presente trabalho, os receptores escolhidos para os cálculos foram as enzimas COX-1 e COX-2, de códigos 2oye e 1cx2, e os ligantes escolhidos foram os compostos da família das pirimidinas.

1.1 Ciclooxygenase

A enzima ciclooxygenase (COX) é uma glicoproteína dimérica integral de membrana encontrada, principalmente, no retículo endoplasmático (RE). A COX em complexo com seu substrato ácido araquidônico leva à biossíntese de prostaglandinas (Figura 1.1.1) e tromboxanos. Neste trabalho foram utilizadas para os cálculos as isoformas COX-1 e COX-2. Com relação à COX-3, variante de *splice* da COX-1, na literatura encontra-se que é improvável que tenha participação crucial na produção de prostaglandinas (HEIN e BANION, 2009; MUÑOZ *et al.*, 2010).

A COX-1 foi classificada fisiologicamente como constitutiva, sendo expressa na maioria dos tecidos e nas plaquetas. Está envolvida na produção de prostaglandinas para a homeostasia tecidual, como, por exemplo, citoproteção gástrica e manutenção da homeostase renal e plaquetária (BATLOUNI, 2010; VONKEMAN e van de LAAR, 2010). A COX-2 é induzida na maioria dos tecidos por estímulos inflamatórios e traumas tissulares, sendo responsável pela produção de mediadores prostanóides da inflamação. No entanto, a COX-2 está presente em níveis detectáveis no sistema nervoso

central (SNC) (ANDREASSON, 2010), rim (HÖRL, 2010) e coração (BATLOUNI, 2010; SCHEIMAN e HINDLEY, 2010; VONKEMAN e van de LAAR, 2010).

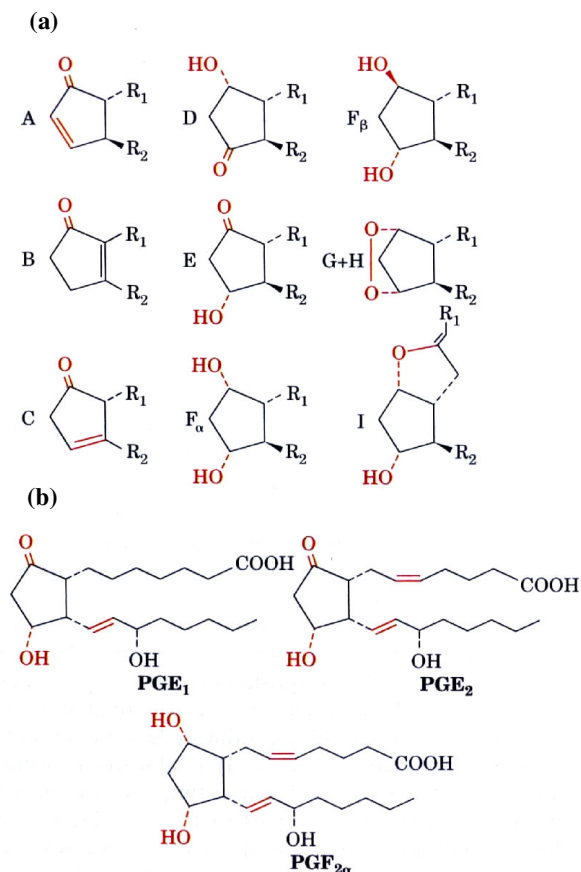


Figura 1.1.1 Estruturas das prostaglandinas. (a) Prostaglandinas A-I. (b) Prostaglandinas E₁, E₂ e F_{2α} (primeiras prostaglandinas identificadas) (Adaptado de VOET e VOET, 2000).

A descoberta desta segunda forma de ciclooxigenase foi um dos eventos mais importante na biologia do prostanóide. A indução desta isoforma, COX-2, por vários estímulos associados com inflamação e ativação celular, garantiu a relevância desta descoberta para doenças inflamatórias em geral (VANE, BAKHLE E BOTTING, 1998).

1.1.1 Mecanismo Catalítico e Estrutura Tridimensional das COXs

A COX é uma enzima que catalisa as duas primeiras etapas na biossíntese de prostaglandinas (PGs) a partir do substrato ácido araquidônico (AA). Estas etapas são a

oxidação de AA a hidropoxi endoperóxido (PGG₂) e sua redução subsequente a hidroxí endoperóxido (PGH₂). O PGH₂ é transformado por um grupo de mecanismos enzimáticos e não-enzimáticos em prostanóides primários, PGE₂, PGF_{2α}, PGD₂, PGI₂ e TXA₂ (Figura 1.1.1.1) (VANE, BAKHLE E BOTTING, 1998; SMITH, DEWITT e GARAVITO, 2000).

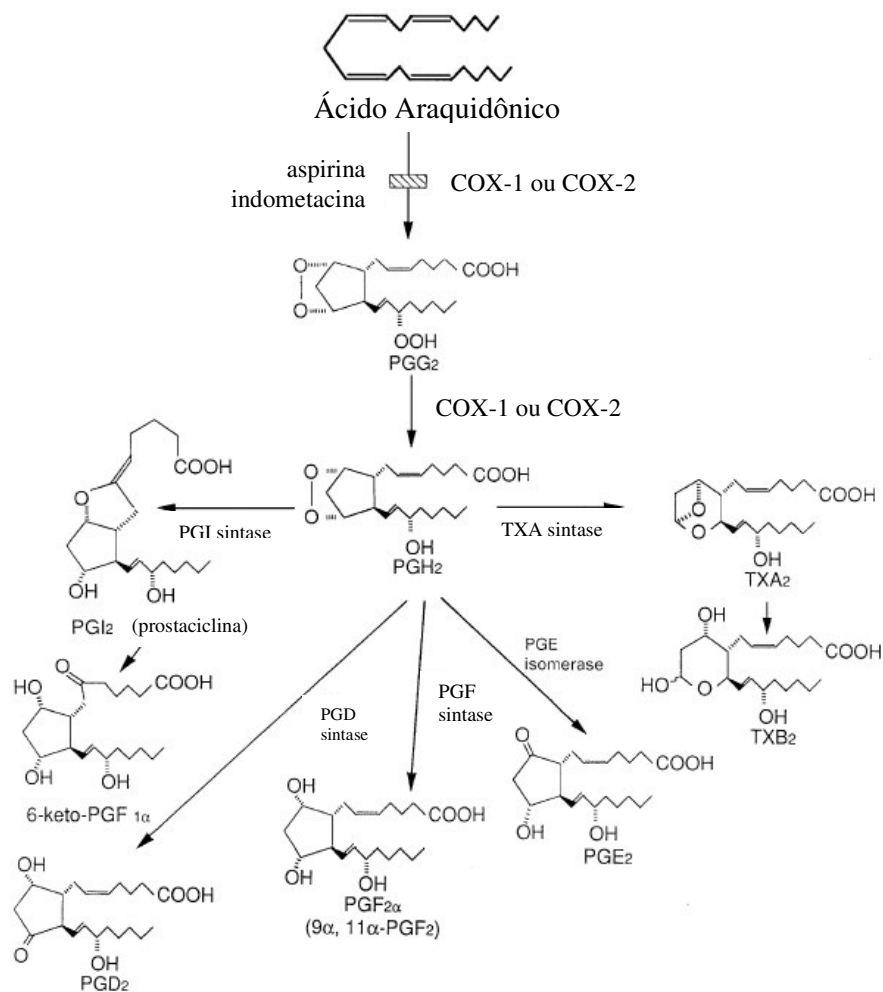


Figura 1.1.1.1 A cascata do ácido araquidônico (Adaptado de VANE, BAKHLE E BOTTING, 1998).

Características chaves do modelo da formação de prostaglandinas a partir do ácido araquidônico são o posicionamento apropriado do (a) carboxilato do AA a interagir com Arg120; (b) o hidrogênio 13-proS do ácido araquidônico para abstração pelo radical Tyr385; (c) o C-11 e C-9 (Figura 1.1.1.2) do ácido araquidônico para a formação de uma ponte endoperóxido entre eles; e (d) o final ω do AA (C-14 ao C-20) em um bolso lateral do canal que termina na Gly533 (SMITH, DEWITT e GARAVITO, 2000).

Na sequência para conversão do AA a PGG₂ pelas COXs (Figura 1.1.1.3) há a abstração do hidrogênio 13-proS pelo o radical tirosil que leva a migração do radical ao C-11 no AA. Ataque do oxigênio molecular, vindo da base do canal COX, ocorre do lado oposto daquele da abstração do H. Enquanto o radical 11 R-peroxil se move sobre o C-8 para um ataque sobre o C-9 para formar uma ponte endoperóxido, o C-12 é trazido mais próximo ao C-8 via rotação sobre a ligação C-10/C-11 permitindo a formação do anel ciclopentano. O movimento do C-12 também posiciona o C-15 para adição de uma segunda molécula de oxigênio, formação de PGG₂ e a migração do radical de volta para Tyr385 (MALKOWSKI *et al.*, 2000).

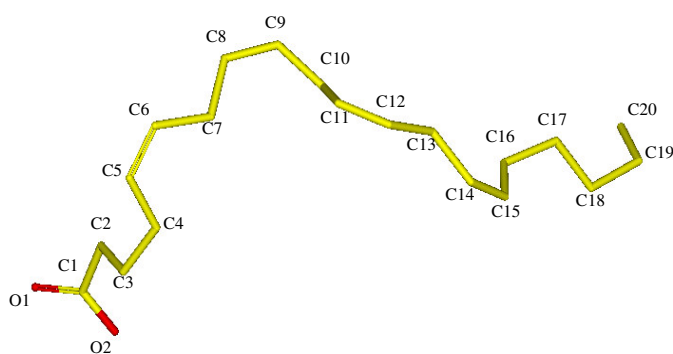


Figura 1.1.1.2 Estrutura tridimensional do ácido araquidônico indicando a numeração dos átomos. Os hidrogênios não estão representados.

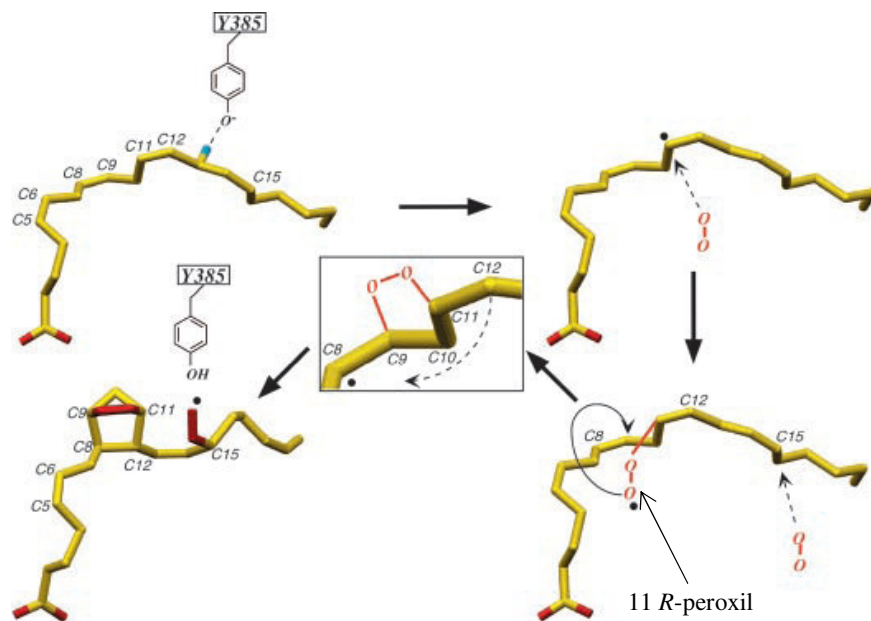


Figura 1.1.1.3 Sequência para conversão do ácido araquidônico a prostaglandina G₂ (Adaptado de MALKOWSKI *et al.*, 2000).

A estrutura por difração de raio X mostra que cada subunidade de 576 resíduos desse homodímero consiste em domínios (Figura 1.1.1.4): um módulo N-terminal de 48 resíduos, estruturalmente semelhante ao fator de crescimento epidérmico (EGF, de *epidermal growth factor*, polipeptídeo hormonal que estimula a proliferação celular), um motivo central de ligação à membrana formado por 44 resíduos e um domínio enzimático C-terminal com 484 resíduos e o grupo heme. O motivo de ligação à membrana tem quatro hélices α anfipáticas organizadas em um espiral à direita, cuja superfície hidrofóbica está voltada para fora do corpo da proteína (VOET e VOET, 2000). Estas hélices também cercam uma abertura pela qual o substrato ácido graxo e AINE parecem entrar no sítio de ligação da ciclooxigenase.

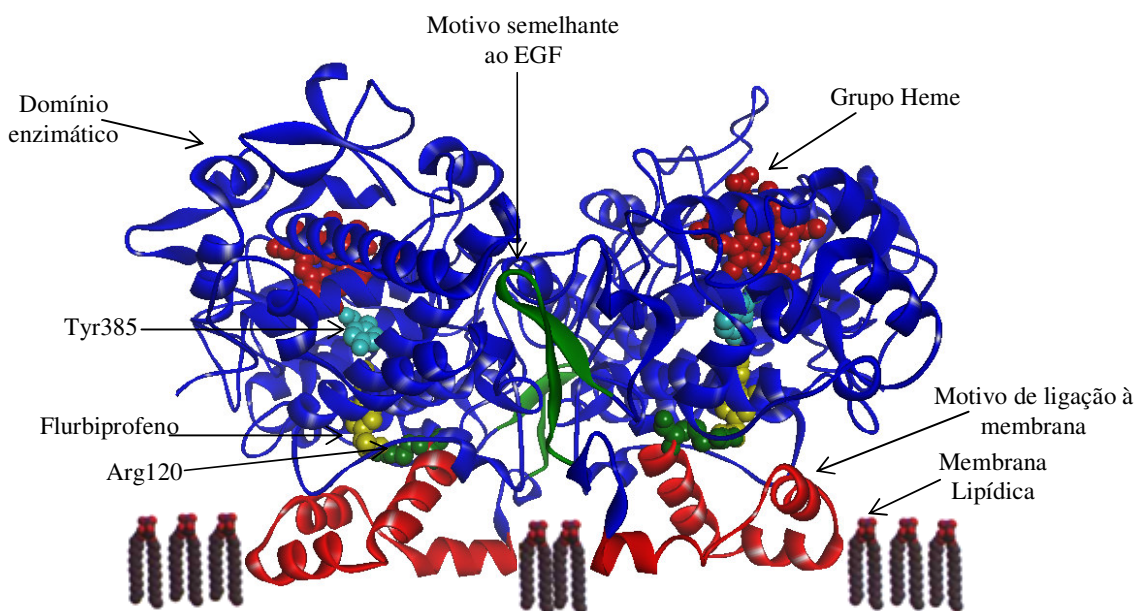


Figura 1.1.1.4 COX-1 complexada com flurbiprofeno (3n8z). Em verde está o motivo semelhante ao EGF, em vermelho o motivo de ligação à membrana, em azul está o domínio enzimático. O grupo heme do sítio ativo está em vermelho, os resíduos catalíticos Arg120 e Tyr385 estão em verde e azul claro respectivamente, e em amarelo está o flurbiprofeno. As representações das membranas lipídicas foram agregadas para ilustração.

As estruturas de COX contêm vários canais de água, incluindo um canal que se estende do sítio ciclooxigenase próximo a Gly533 à interface do dímero (SMITH, DEWITT e GARAVITO, 2000).

Ciclooxigenase 1

A ciclooxigenase-1 é uma oxirredutase, que tem como substrato o ácido araquidônico, precursor de prostaglandinas. Apresenta-se como um dímero funcional e faz parte da classe enzimática E.C.1.14.99.1, por ser uma prostaglandina endoperóxido sintase. Em sua classificação estrutural apresenta duas classes cada uma com uma arquitetura: **1-** Classe principalmente beta e arquitetura de fita; **2-** Classe principalmente alfa e arquitetura de feixe ortogonal. Há o predomínio de α -hélices e folhas β (*PDB, PDBsum*).

A Figura 1.1.1.5 mostra a enzima COX-1, de código PDB 1DIY (MALKOWSKI *et al.*, 2000), com o ácido araquidônico em seu sítio de ciclooxigenação. As figuras a seguir mostram detalhes das interações do substrato com a enzima. A Figura 1.1.1.6 mostra as ligações de hidrogênio entre o carboxilato do ácido araquidônico e os resíduos Arg120 e Tyr355. O C13 do ácido araquidônico está próximo ao oxigênio fenólico da Tyr385 orientado justamente para abstração do H proS. O final ω do substrato fica entre a Ser530 e Gly533. Na Figura 1.1.1.7 estão os resíduos Phe381, Leu384, Trp387, Phe518 e Met522 que formam um bolso que poderia acomodar as transições conformacionais do C8 até o C12 durante a adição e formação do anel endoperóxido.

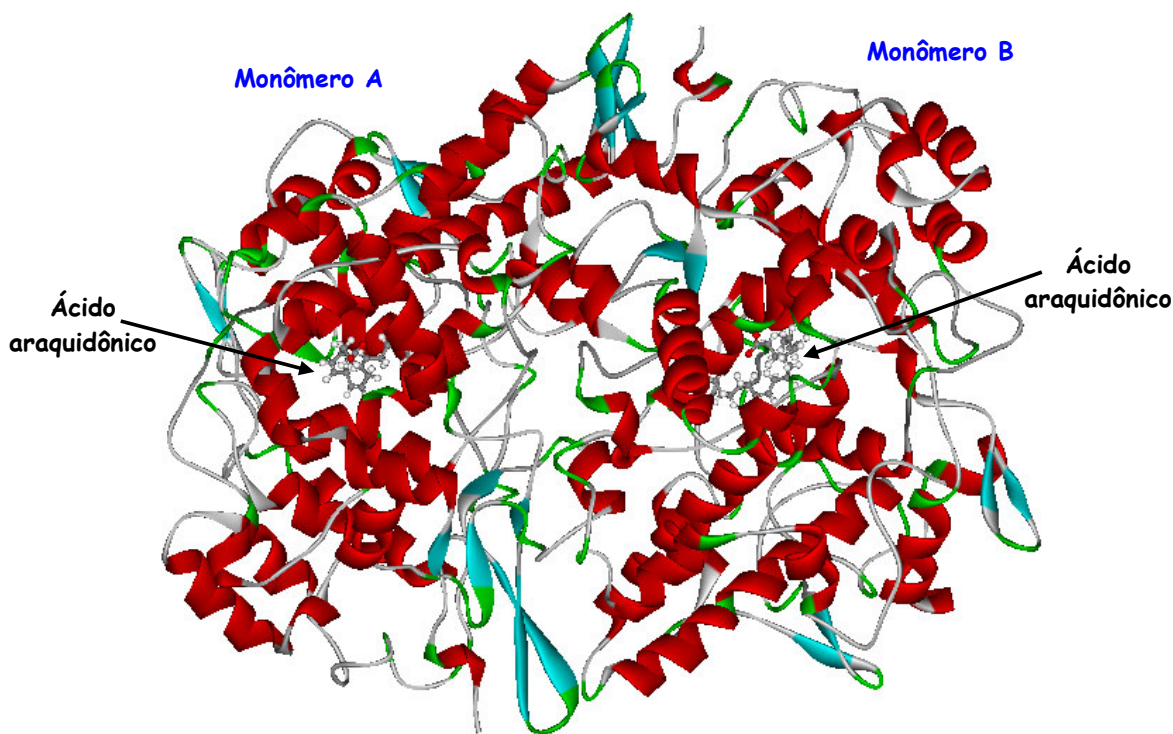


Figura 1.1.1.5 COX-1 com o ácido araquidônico em seu sítio ativo ciclooxigenase (código PDB: 1DIY).

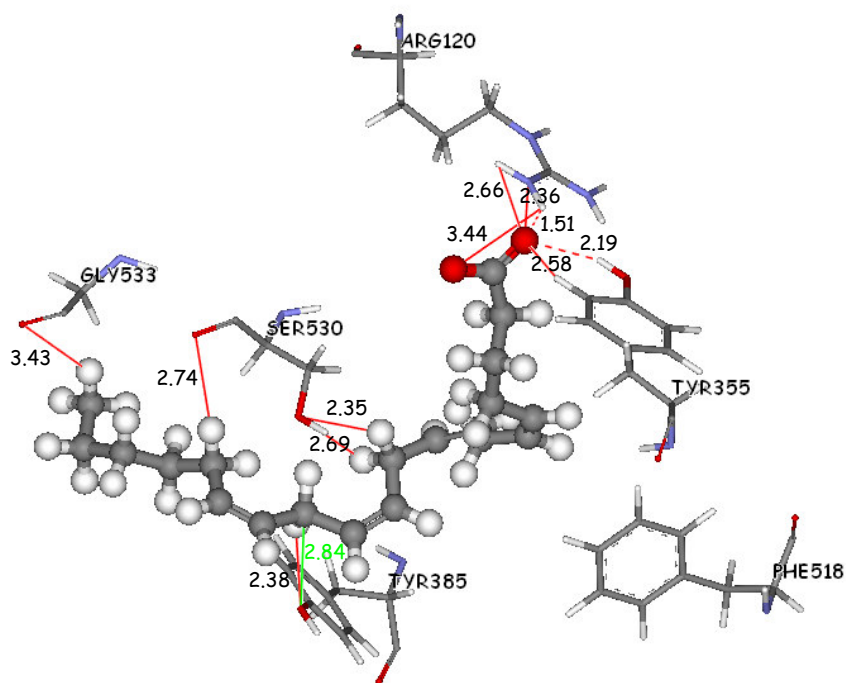


Figura 1.1.1.6 Sítio ativo da COX-1 com seu substrato ácido araquidônico e algumas de suas interações (representadas por linhas vermelhas com respectivas distâncias em Å). Note as ligações de H entre o ácido araquidônico e os resíduos Arg120 e Tyr355 (em tracejado). Em verde está a distância (2.84 Å) entre o C13 e o oxigênio fenólico da Tyr385.

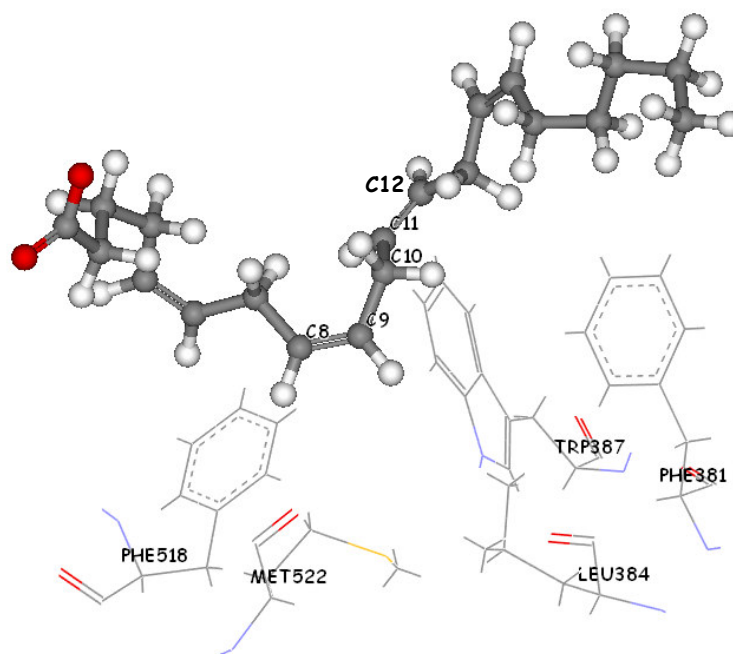


Figura 1.1.1.7 Bolso catalítico da COX-1.

A estrutura utilizada nos cálculos de *docking* para a COX-1 foi a de código 2OYE do PDB, determinada por difração de raio X com resolução de 2.85 Å, na qual a enzima está complexada com o ligante IM8-700 que é uma indometacina etanolamida. O grupo hidroxil da porção etanolamida de IM8-700 forma ligações de H com a Arg120 e com o carboxilato do Glu524. O grupo metoxi do anel indol aponta para o bolso lateral (Leu517, Phe518, Ile523, Gln192 e Ser516) e o grupo clorobenzoil está orientado no eixo do canal próximo a Tyr385 e Tyr387 (Figura 1.1.1.8).

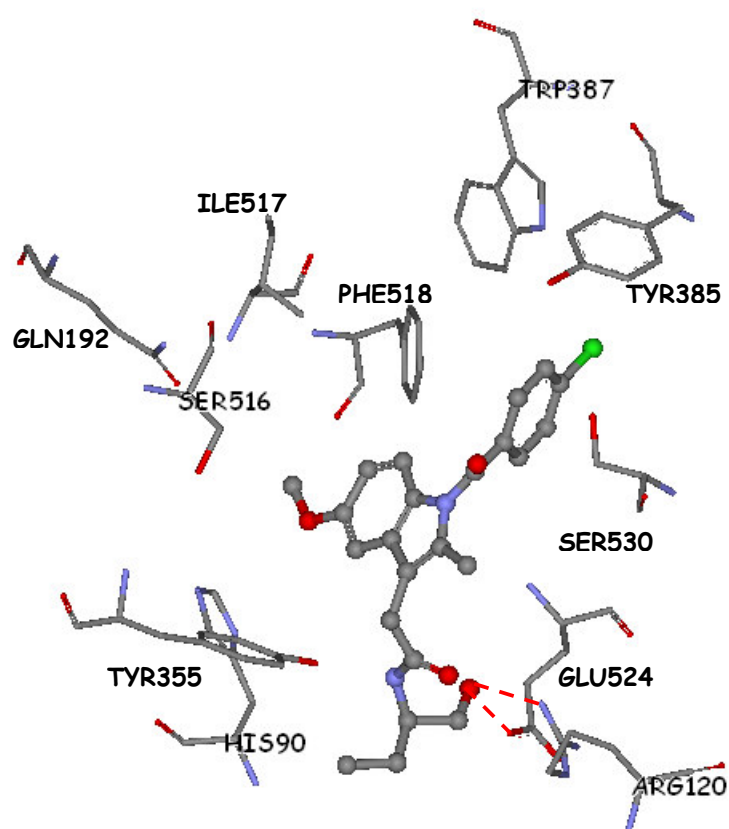


Figura 1.1.1.8 Ligante IM8-700 no sítio ativo da COX-1 (2OYE). Vários resíduos do sítio são mostrados, além das ligações de hidrogênio com a Arg120 e Glu524 (tracejado vermelho).

Ciclooxigenase 2

A enzima ciclooxigenase 2 também tem como substrato o ácido araquidônico e na sua classificação estrutural CATH apresenta dois domínios: classe principalmente beta, arquitetura de fita e classe principalmente alfa, arquitetura de feixe ortogonal (*PDB, PDBsum*). A Figura 1.1.1.9 corresponde a estrutura cristalográfica de código 1DCX (KIEFER *et al.*, 2000), que é a COX-2 complexada com o ácido araquidônico.

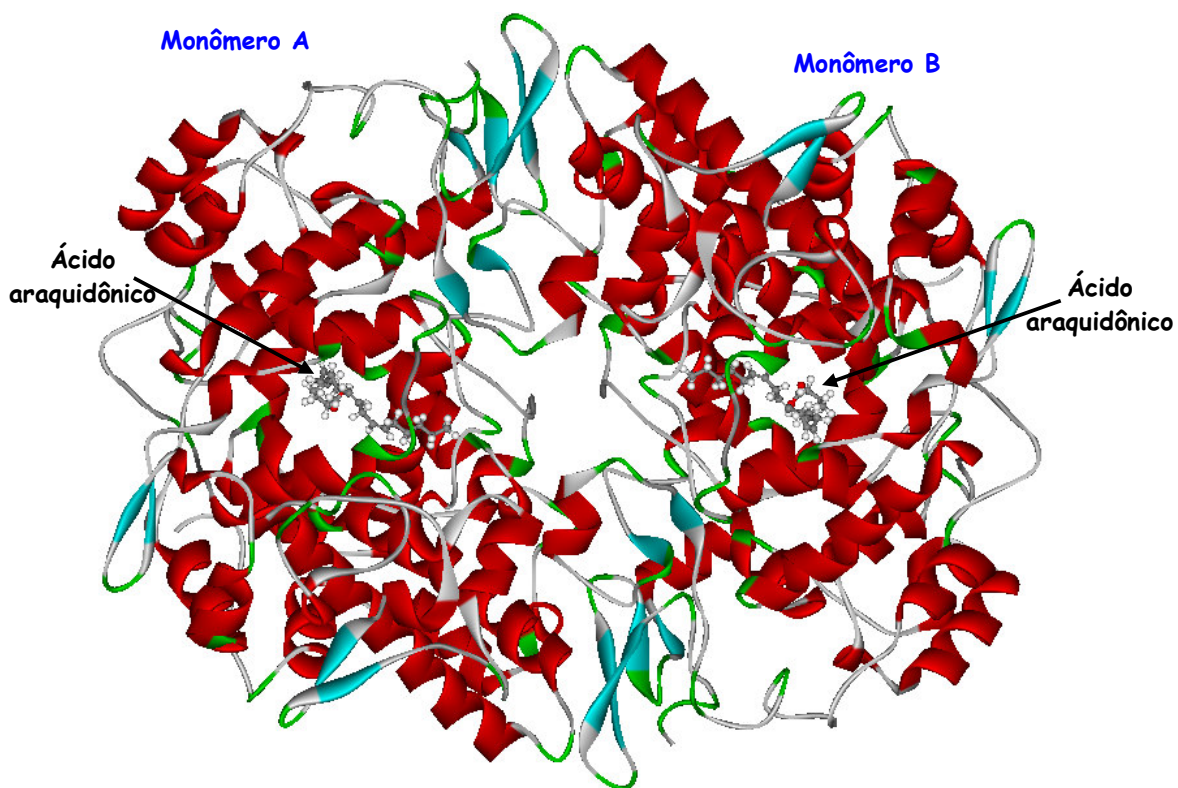


Figura 1.1.1.9 COX-2 com o ácido araquidônico em seu sítio ativo (1DCX).

A Figura 1.1.1.10 mostra as interações do ácido araquidônico no sítio ativo da COX-2. O grupo carboxilato é coordenado pela Arg120 e Tyr355. Um dos átomos de H do C13, muito provavelmente o H 13proS está a 2.3 Å da Tyr385, permitindo a abstração do H

por este resíduo. São formadas, ainda, ligações de H entre o O1 e O2 e os resíduos Tyr355 e Arg120 e o OG da Ser530 também faz algumas interações com o ácido araquidônico.

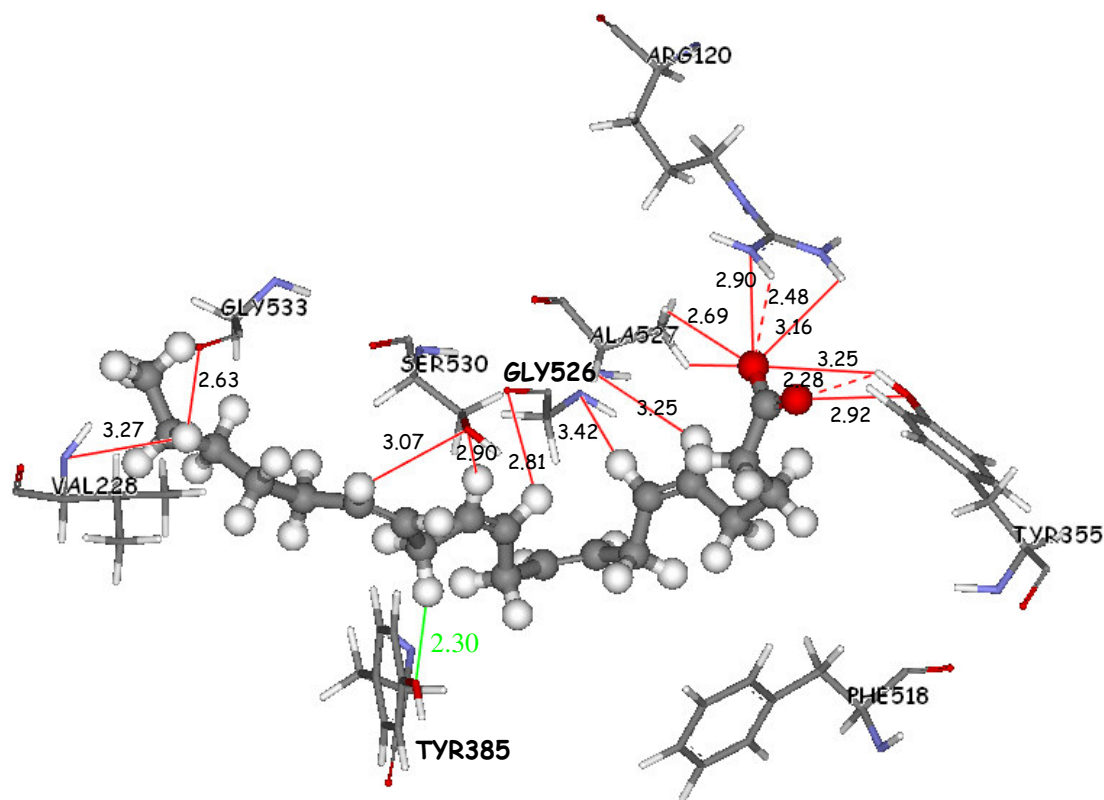


Figura 1.1.1.10 Ácido araquidônico no sítio ativo da COX-2. São mostrados alguns resíduos e interações (linhas vermelhas com distâncias em Å) que compõem o complexo. Em tracejado vermelho estão as ligações de H com a Arg120 e Tyr355, e em linha verde a distância (2.30 Å) entre o HproS e o OH da Tyr385.

A estrutura usada para os cálculos de *docking* no sítio de ciclooxygenação da COX-2 foi a de código 1CX2 (PDB, PDBSum), determinada por difração de raio X com resolução de 3.00 Å (KURUMBAIL *et al.*, 2006), a qual está complexada com o inibidor SC-558, cujas interações são mostradas na Figura 1.1.1.11. O anel bromofenil está posicionado em uma cavidade hidrofóbica formada por Phe381, Leu384, Tyr385, Trp387 e Ser350. O grupo trifluorometil se dispõe em um bolso adjacente (Met113, Val116, Val349, Tyr355, Leu359 e Leu531). O anel fenila é rodeado pelos resíduos hidrofóbicos Leu352, Tyr355,

Phe518, Val523 e Ser353, finalmente o grupo sulfonamida forma ligações de H com os resíduos His90 e Arg513.

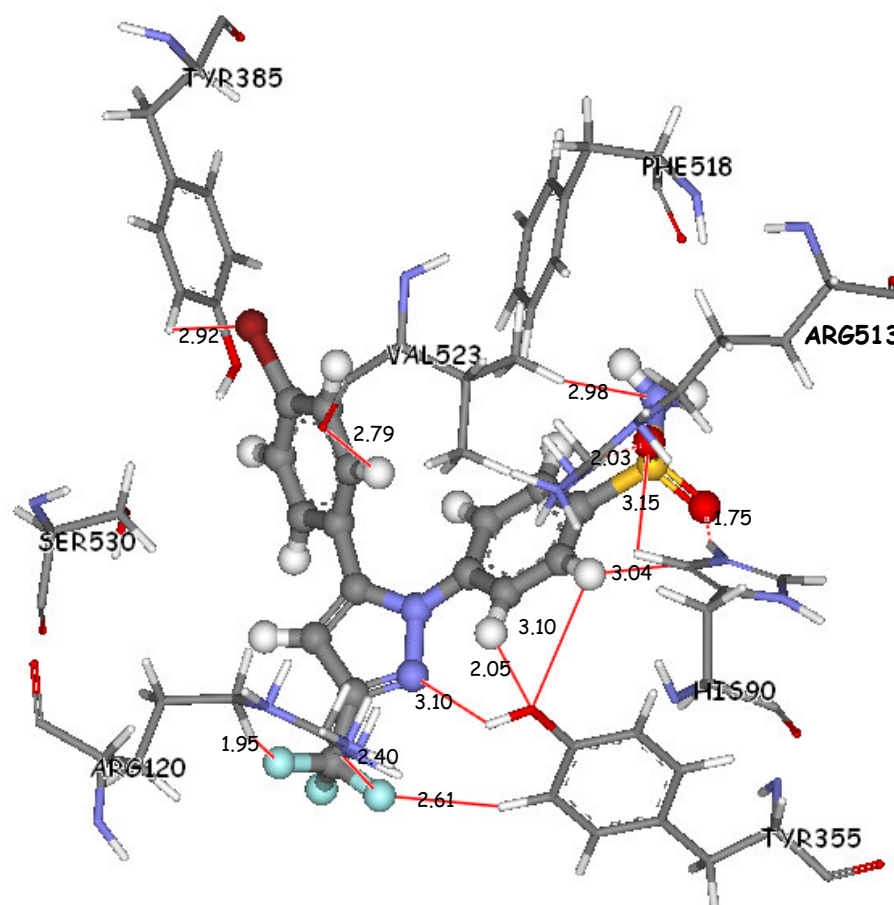


Figura 1.1.1.11 Inibidor SC-558 no sítio da COX-2.

1.1.2 Semelhanças e Diferenças entre COX-1 e COX-2

Ambas isoformas de COX têm um peso molecular de 71 K e são quase idênticas no comprimento, com apenas 600 aminoácidos, dos quais 63% são idênticos em sequência. Entretanto, o gene da COX-2 humana é um gene pequeno de 8.3 kb, enquanto a COX-1 humana se origina de um gene muito maior de 22 kb. Os produtos gênicos também diferem, com o RNAm para a enzima COX-2 sendo aproximadamente de 4.5 kb e da enzima

COX-1 sendo de 2.8 kb. A sobreposição das estruturas tridimensionais da COX-2 com a COX-1 mostra que os resíduos que formam o canal de ligação do substrato, os sítios catalíticos e os resíduos imediatamente adjacentes são todos idênticos, exceto por duas pequenas variações: Ile em COX-1 é substituída por Val na COX-2 nas posições 434 e 523 (aos resíduos da COX-2 são dados os mesmos números de seus equivalentes na COX-1) (VANE, BAKHLE e BOTTING, 1998).

COX-1 e COX-2 mostram diferenças no *splicing* de RNAm, estabilidade e eficiência translacional. A regulação de COX-2 a nível de RNAm parece ser um importante mecanismo pelo qual alguns mediadores fisiológicos, notavelmente os corticosteróides agem para regular a produção de PG (DUBOIS *et al.*, 1998).

Apesar de suas semelhanças estruturais, há diferenças bioquímicas claras entre as isoformas e estas diferenças têm sido atribuídas às mudanças resultantes das substituições Ile/Val nas posições 434 e 523. A mutação de Ile523 para Val na proteína COX-1 permite inibidores seletivos de COX-2 se ligarem e inibirem a formação de PGH₂ sem alterar a Constante de Michaelis (K_m) para o ácido araquidônico e o mutante reverso de COX-2 em que a Val523 é trocada por Ile mostra os perfis de seletividade e ligação do inibidor comparáveis àqueles do tipo nativo da COX-1. A base estrutural para isto tem sido mostrada claramente nas análises das estruturas cristalinas de COX-2, que usaram tanto proteína de roedor como humana, cada uma ligada a um inibidor não-seletivo de COX-1 ou seletivo de COX-2. O tamanho menor da Val523 permite o inibidor acessar o bolso lateral hidrofílico do canal principal do substrato na COX-2- acesso que não é possível por impedimento estérico devido à cadeia lateral maior da Ile na COX-1 (Figura 1.1.2.1) (SMITH, DEWITT e GARAVITO, 2000; VANE, BAKHLE e BOTTING, 1998).

A substituição da Ile na COX-1 por uma Val na COX-2, na posição 434, contribui para a abertura do bolso lateral na COX-2. É provável que esta variação controle a seletividade pelo substrato da COX-2. Este resíduo é mais próximo a Ser530 acetilável e o menor volume da valina poderia prover espaço adicional nesta região do canal do substrato e permitir uma maior variação de substratos na COX-2 nativa e na COX-2 acetilada. Suportes para estas sugestões podem ser obtidos a partir dos resultados com o duplo mutante de COX-1, Ile523Val e His513Arg, que exibiu um aumento de inibidores possíveis seletivos de COX-2 (VANE, BAKHLE e BOTTING, 1998). A substituição de His513 na COX-1 com Arg513 na COX-2 (Figura 1.1.2.1) altera o ambiente químico do bolso lateral, já que esta substituição resulta em uma carga positiva estável no centro deste bolso, que pode interagir com porções polares dos ligantes (SMITH, DEWITT e GARAVITO, 2000).

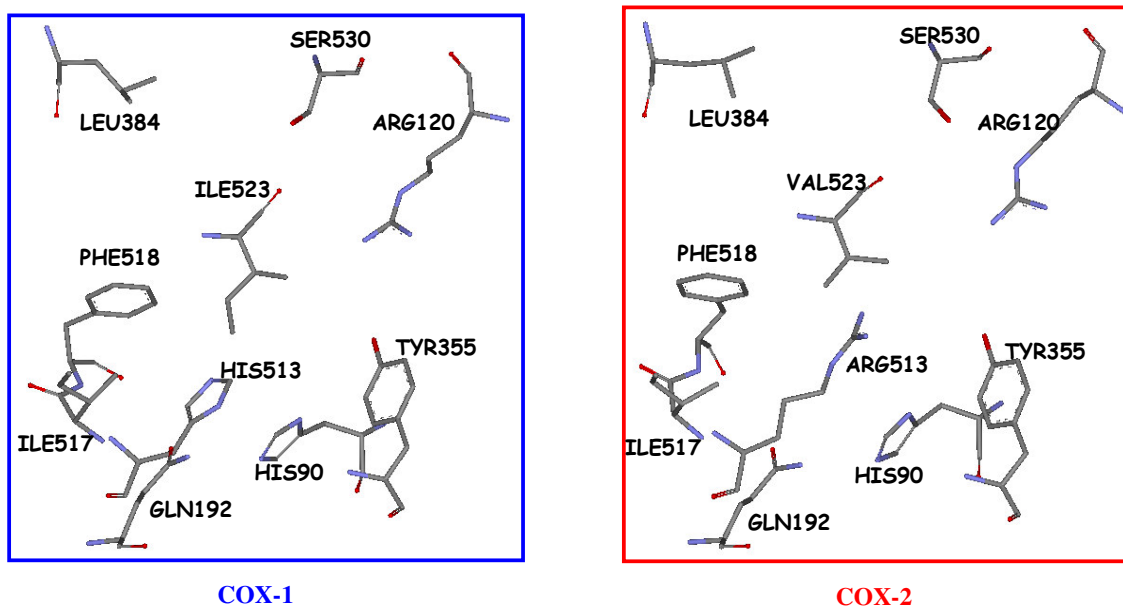


Figura 1.1.2.1 Representação do sítio ativo das enzimas COX-1 (box azul) e COX-2 (box vermelho). A substituição Ile523Val confere um tamanho extra ao bolso hidrofílico na COX-2. A outra substituição mostrada é da His513 na COX-1 por Arg513 na COX-2.

Outra diferença estrutural está relacionada à Leu384 que apresenta diferente orientação nas enzimas ciclooxygenase 1 e ciclooxygenase 2. Na COX-1, a Phe503 com seu tamanho maior “empurra” a cadeia lateral da Leu384 para parte de cima do canal. Na COX-2, a menor Leu503 permite a Leu384 se orientar fora do sítio ativo, gerando um pequeno bolso lipofílico (MICHAUX *et al.*, 2005) (Figura 1.1.2.2). Há também uma diferença estrutural na posição da hélice D, a última das quatro hélices do domínio de ligação à membrana (MBD). Na COX-2 este segmento de hélice está de uma forma que provê uma abertura maior do MBD e como consequência, a Arg120 é deslocada (SMITH, DEWITT e GARAVITO, 2000).

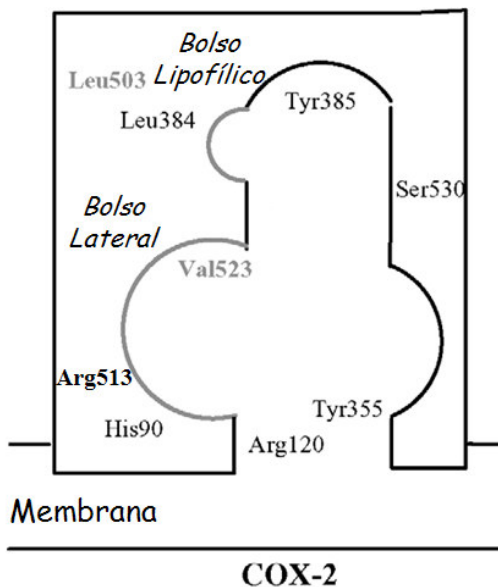


Figura 1.1.2.2 Representação esquemática do sítio da ciclooxygenase 2. Bolso lipofílico formado devido a substituição da Phe503 por Leu503. A menor Leu503 permite a Leu384 se orientar fora do sítio ativo, gerando o bolso lipofílico (Adaptado de MICHAUX *et al.*, 2005).

Outra diferença estrutural interessante entre as isoformas, mas de significância desconhecida, é a ausência de uma sequência de 17 aminoácidos no N-terminal e a inserção de uma sequência de 18 aminoácidos no C-terminal da COX-2 em comparação com a COX-1. A inserção C-terminal na COX-2 não altera os quatro últimos resíduos de aminoácidos, que em ambas as proteínas formam o sinal para a ligação com a membrana do RE. Entretanto, a COX-2 está localizada na membrana nuclear, assim como no RE, enquanto a COX-1 é encontrada unida apenas as membranas do RE. A razão para esta localização seletiva pode estar na diferença de sequência do C-terminal (VANE, BAKHLE e BOTTING, 1998).

Embora tenha se dado ênfase as diferenças entre as duas isoformas, há certas similaridades, sendo que ambas usam o mesmo substrato endógeno, ácido araquidônico, e formam o mesmo produto pelo mesmo mecanismo catalítico. Sua principal diferença está relacionada às suas funções patofisiológicas (VANE, BAKHLE e BOTTING, 1998). Essas diferenças, embora não estejam totalmente bem definidas, têm relevância para o mecanismo de ação dos agentes antiinflamatórios não-esteróides (AINEs), sendo que a ação antiinflamatória destes AINEs deve-se, principalmente, ao fato de inibirem a ação da COX-2.

1.2 Antiinflamatórios não-esteróides (AINEs)

Como já mencionado os antiinflamatórios não-esteróides (AINEs) estão entre os agentes terapêuticos mais amplamente utilizados havendo mais de 50 diferentes no mercado, alguns dos quais são mostrados na Figura 1.1. Esta classe de compostos inibe a metabolização do ácido araquidônico pelas COXs. No entanto, nenhum deles é ideal para controlar ou modificar os sinais e sintomas da inflamação, particularmente aqueles observados nas doenças articulares inflamatórias (VONKEMAN e van de LAAR, 2010), bem como apresentam efeitos colaterais significativos (RANG *et al.*, 2004).

A ação antiinflamatória dos AINEs se relaciona principalmente à inibição da COX-2 e seus efeitos indesejáveis são, em grande parte, devidos à inibição da COX-1 (RANG *et al.*, 2004). O uso de doses altas e por tempo prolongado de AINEs, como, por exemplo, em doenças articulares, resulta na ocorrência de efeitos colaterais, como ulceração do trato gastrointestinal, alteração na hemodinâmica renal e infarto de miocárdio (BATLOUNI, 2010; HÖRL, 2010; SCHEIMAN e HINDLEY, 2010; VONKEMAN e van de LAAR, 2010).

Estudos para a descoberta de novos inibidores seletivos de COX-2 são de grande importância, pois buscam a inibição desta forma induzida para que se tenha uma atividade analgésica e antiinflamatória com a diminuição dos efeitos colaterais gastrintestinais e renais provocados pela inibição simultânea da forma constitutiva COX-1. Embora o rofecoxib (Vioxx[®]), um inibidor seletivo da COX-2, tenha sido retirado do mercado devido ao aumento do risco de eventos cardiovasculares, principalmente infarto do miocárdio (MERCK), as aplicações terapêuticas potenciais de inibidores seletivos de COX-2 têm se expandido para certos tipos de câncer (DIVVELA, CHALLA e TAGARAM, 2010; WU *et al.*, 2010) e desordens neurodegenerativas, como Alzheimer (HEIN e BANION, 2009; HENEKA *et al.*, 2010).

1.3 Derivados Pirimidínicos

As pirimidinas são compostos heterocíclicos aromáticos com dois átomos de nitrogênio na posição 1,3 formando um anel de 6 membros (SOLOMONS e FRYHLE, 2009). Os derivados pirimidínicos têm um amplo espectro de atividades biológicas, entre elas, antiinflamatórias e anticonvulsivantes (PALWINDER, KAMALDEEP e WOLFGANG, 2006), assim são um alvo atrativo para indústria farmacêutica. Na Figura 1.3.1 é mostrada a estrutura geral dos inibidores de COX-2 baseados em um núcleo central pirimidínico que foram utilizados nesse trabalho.

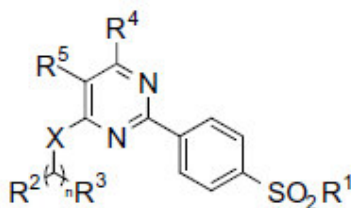


Figura 1.3.1 Inibidor de COX-2 baseado em pirimidina. R¹, R², R³, R⁴ e R⁵ representam os radicais substituintes (Adaptado de ORJALES *et al.*, 2008).

A Figura 1.3.2 mostra as pirimidinas utilizadas para o estudo de *docking* nas enzimas ciclooxigenase 1 e 2. Estes compostos apresentam alto grau de seletividade para a COX-2 sendo inclusive mais seletivos que o Rofecoxib (Vioxx[®]). Os dados experimentais de atividades inibitórias *in vitro* para COX-2 estão na Tabela 1.3.1 (ORJALES *et al.* 2008).

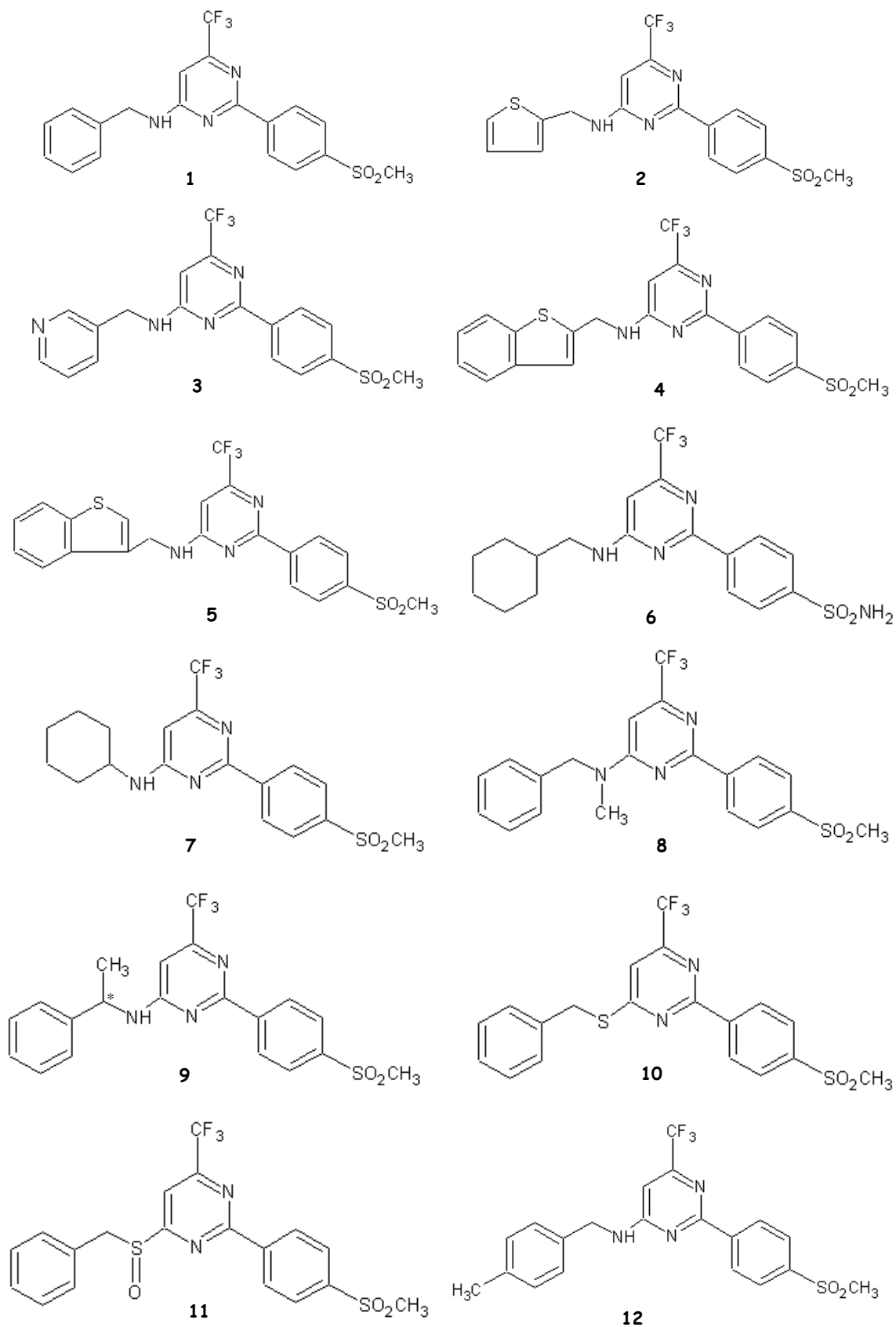
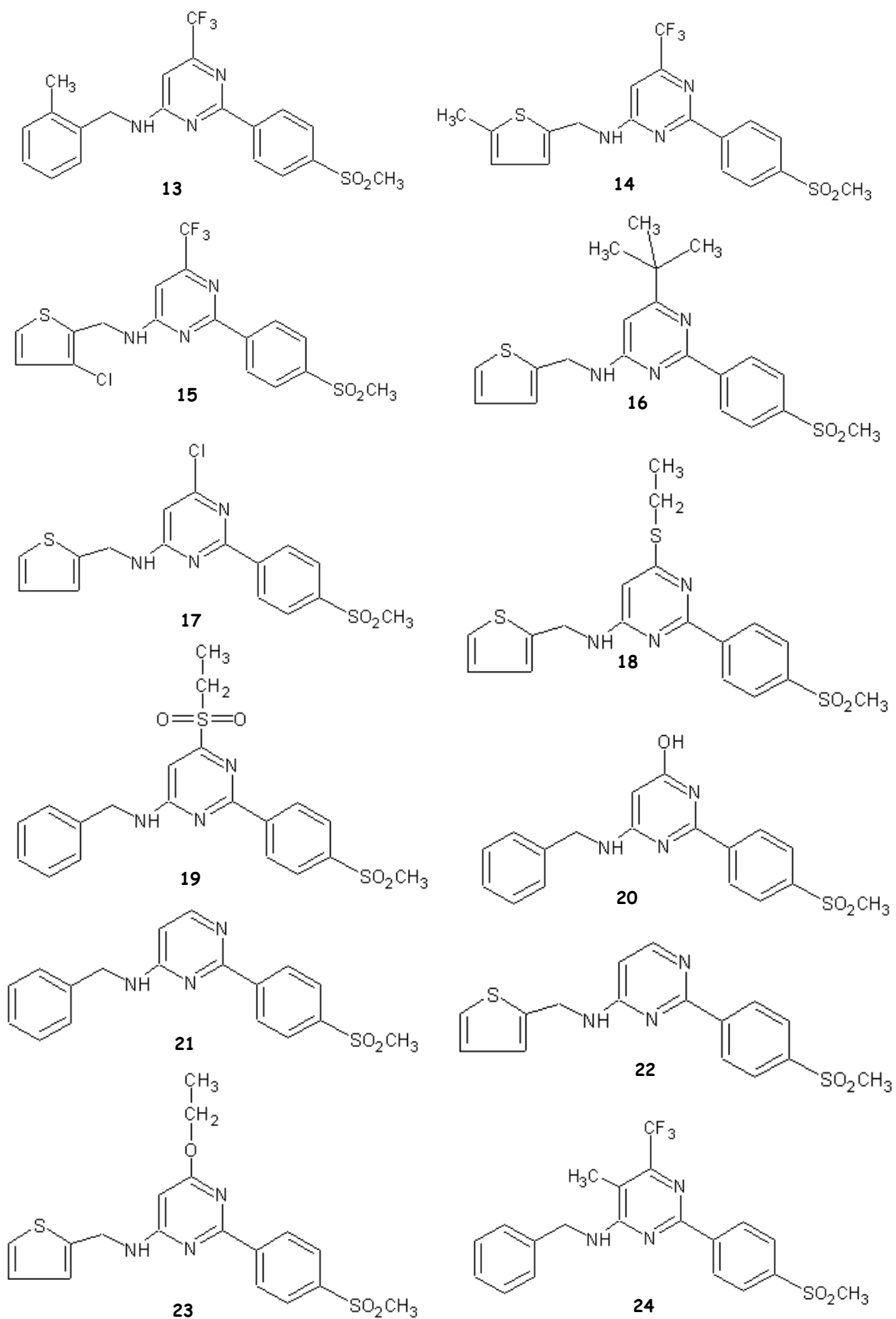
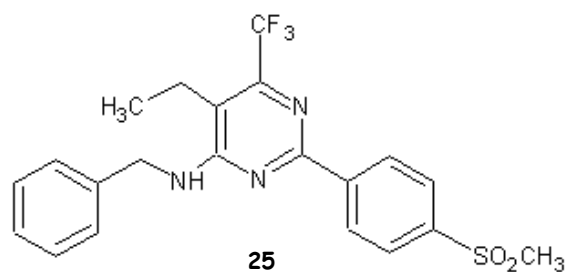


Figura 1.3.2 Pirimidinas escolhidas para o estudo de *docking* nas enzimas COX-1 e COX-2.



Continuação Figura 1.3.2



Continuação Figura 1.3.2

Tabela 1.3.1 Atividades inibitórias da COX-2 para pirimidinas de 1-25 (Adaptado de Orjales *et al.*, 2008)

Compostos	IC ₅₀ (nM)	IS*
1	71.0	1408
2	2.1	10,702
3	>10,000	>1
4	293.4	341
5	>10,000	>1
6	803.5	>124
7	238.5	419
8	454.5	22
9	521.8	74
10	527.8	>189
11	>10,000	>1
12	48.4	>2065
13	5720	>17
14	527.8	189
15	5.4	>18,622
16	31.1	>322
17	1.2	>81,300
18	1.2	>8403
19	90.7	>110
20	49.3	>2030
21	>10,000	>1
22	9.2	>10,905
23	0.3	>33,333
24	18.0	>556
25	120.9	>83

* Índice de Seletividade (SI) = a razão entre os IC_{50s} COX-1/COX-2.

2. OBJETIVO

O objetivo deste trabalho foi estudar a formação de complexos de uma série de compostos da família das pirimidinas com as enzimas ciclooxigenases 1 e 2, utilizando o método de *docking*, para analisar os aspectos estereoquímicos desses ligantes e sua relação com a atividade biológica e desta forma entender os mecanismos moleculares envolvidos na ação desses compostos, e assim, propor novos compostos com atividade antiinflamatória e analgésica.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Docking

O *docking* molecular é uma simulação computacional com a qual é possível avaliar e analisar detalhadamente a formação de complexos receptor-ligante e então utilizar os resultados para *screening virtual* e/ou entender mecanismos de reação (VEGA-TEIJIDO, CARACELLI e ZUKERMAN-SCHPECTOR, 2006; CUNHA *et al.*, 2006; ARMELIN, 2007). O objetivo é encontrar o melhor ajuste para o encaixe entre duas moléculas (complexo receptor-ligante). Uma representação esquemática do cálculo de *docking* é apresentada na Figura 3.1.1 Inicialmente o *docking* era feito visualizando as moléculas em programas gráficos e se tentava manualmente obter o melhor ajuste para o complexo entre as duas, cujas conformações permaneciam invariáveis. Atualmente, há vários algoritmos que são utilizados para realizar essa busca permitindo diferentes graus de flexibilidade conformacional. Nesses trabalhos uma molécula é chamada de receptor (proteínas, enzimas, DNA) e a outra molécula é chamada de ligante (em geral, uma pequena molécula).

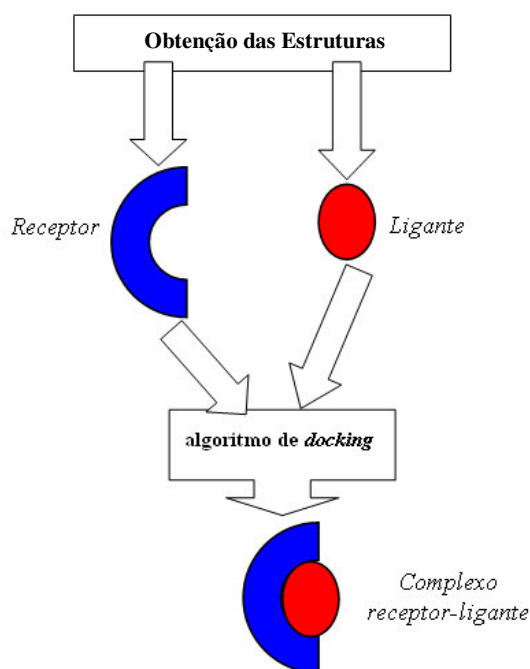


Figura 3.1.1 Docking. Obtenção do complexo receptor-ligante a partir de duas estruturas tridimensionais.

A simulação da formação dos complexos receptor-ligantes foi feito com o programa de *docking* GOLD 4.0.1, que procura possíveis soluções utilizando operadores genéticos -mutações, *crossovers* e migrações- para obter uma população final, trabalhando com a otimização de uma função *Fitness* pré-definida (JONES, WILLETT e GLEN, 1995; JONES *et al.*, 1997). O Algoritmo Genético (GA) é um algoritmo estocástico utilizado para solucionar problemas de otimização (BROOIJMANS e KUNTZ, 2003). A estrutura básica de um GA está representada na Figura 3.1.2.

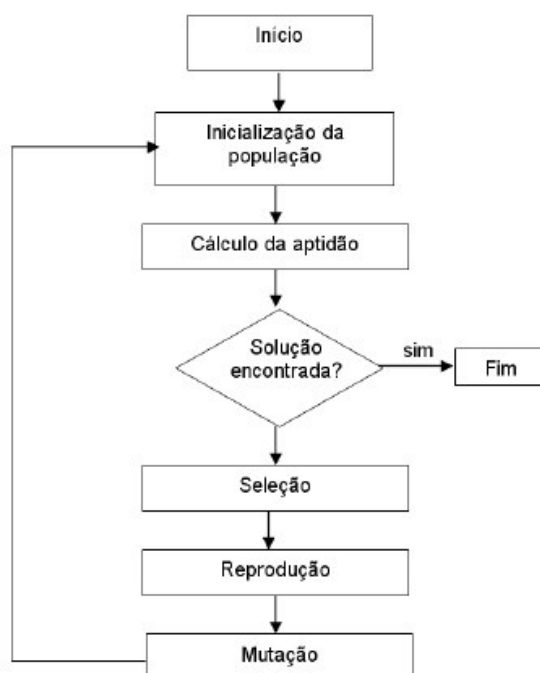


Figura 3.1.2 Representação esquemática de um GA básico (Adaptado de MIRANDA, 2000).

Os principais conceitos utilizados em GA são:

- a) gene- representa cada parâmetro a ser explorado na otimização. Neste caso, os parâmetros são a orientação e conformação do ligante no sítio alvo;
- b) cromossomo- chamado de indivíduo, que é a cadeia de genes que representa uma possível solução para determinado problema. Neste caso refere-se a um possível complexo molecular;
- c) população- conjunto de soluções no espaço de busca.

O procedimento básico de um GA consiste em inicializar uma população de n indivíduos aleatoriamente. Cada indivíduo representa uma conformação do ligante no sítio da proteína e para cada complexo formado (saída) é atribuída uma pontuação (ou *score*) a qual permite o cálculo da aptidão do indivíduo. Os indivíduos mais aptos da geração atual são selecionados, formando uma nova população por cruzamento, de forma que cada indivíduo tem uma probabilidade de ser selecionado proporcional à sua aptidão. Já a operação de mutação consiste em alterar de maneira aleatória o valor de um determinado gene para garantir uma maior varredura do espaço de soluções e evitar que o algoritmo genético convirja precocemente para mínimos locais (MIRANDA, 2000).

Como as estruturas tridimensionais depositadas no PDB não possuem os átomos de hidrogênio a primeira etapa foi adicioná-los usando o programa GOLD 4.0.1 (JONES, WILLETT e GLEN, 1995; JONES *et al.*, 1997) e todos os resíduos de histidina foram considerados como protonados no átomo ND1.

Para os cálculos de *docking* é necessária a escolha do sítio receptor. Assim, foram considerados os resíduos dentro de um raio de 20 Å ao redor do ligante cristalográfico, IM8-700 da enzima 2OYE (COX-1) e SC-558 da 1CX2 (COX-2). E em seguida foram adicionados pares de elétrons isolados aos átomos aceptores de ligação de hidrogênio.

Os cálculos de *docking* foram feitos utilizando a função *GoldScore* e foram considerados os parâmetros evolucionários automáticos baseados nas características dos ligantes. Neste ponto, o programa GOLD 4.0.1 (JONES, WILLETT e GLEN, 1995; JONES *et al.*, 1997) calcula automaticamente o número de operadores genéticos a serem aplicados, dependendo da flexibilidade do ligante, número de ligações rotacionáveis, volume do sítio receptor e número de moléculas de água consideradas.

A função *GoldScore*, conhecida também como função *fitness*, compreende quatro componentes (JONES, WILLETT e GLEN, 1995; JONES *et al.*, 1997):

$$Fitness = S(hb_ext) + 1.3750 * S(vdw_ext) + S(hb_int) + S(vdw_int)$$

Onde- $S(hb_ext)$: energia de ligação de hidrogênio entre proteína-ligante;

$S(vdw_ext)$: energia de van der Waals entre proteína-ligante;

$S(vdw_int)$: energia de van der Waals no ligante;

$S(hb_int)$: energia de ligação de hidrogênio intramolecular do ligante.

Após a simulação computacional foi feita uma análise em tela gráfica dos resultados obtidos utilizando o programa *DS Visualizer 2.0* (DS Visualizer 2.0, 2007). Nos casos em que os complexos apresentavam um número razoável de orientações similares do ligante dentro do sítio, estes foram agrupados, a fim de se considerar padrões de ligação com peso estatístico satisfatório e nos casos favoráveis os *scores* foram avaliados.

Analisando estes parâmetros, foi possível sugerir quais compostos seriam mais favoráveis para a formação dos complexos nos sítios de ligação das ciclooxygenases 1 e 2.

3.2 Obtenção das Estruturas Tridimensionais das Proteínas

As coordenadas cristalográficas das estruturas tridimensionais das proteínas utilizadas no trabalho foram obtidas do *Protein Data Bank (PDB)* e *PDBSum (PDBSum)*, bancos de dados públicos. As enzimas utilizadas foram a ciclooxygenase 1, de código 2OYE (HARMAN *et al.*, 2007, *PDB*) e ciclooxygenase 2, de código 1CX2 (KURUMBAIL *et al.*, 1996, *PDB*). As coordenadas das estruturas quaternárias foram obtidas através do *Protein Quaternary Structure (PQS)* do *European Bioinformatics Institute (EBI)* (*PDB*, *PDBSum*). As estruturas 2OYE e 1CX2 com seus respectivos ligantes foram descritas na Seção 1.1.1.

3.3 Obtenção das Estruturas Tridimensionais e Modelagem Molecular dos Ligantes

A Figura 3.3.1 mostra o bis(piridina-2-carboxialdeído)dimetil(2-fenilpirimidina-4,6-diil)dihidrazona cuja estrutura está depositada no *Cambridge Structural Database* sob o código de UJEQEF (SCHMITT *et al.*, 2003) e que foi utilizado como ponto de partida para a modelagem molecular, com o sistema HyperChem 5.01 (HyperChem, 1996), dos compostos estudados. Depois de desenhados foram feitas otimizações geométricas utilizando o método MM+, *Steepest Descent*, gradiente RMS de 0,01 kcal/(Å mol).

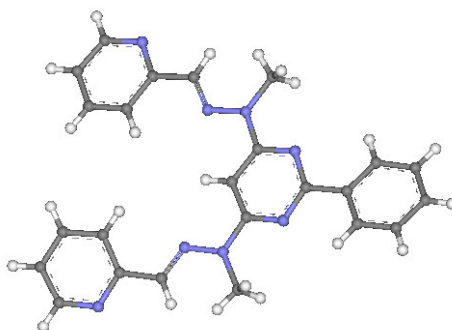


Figura 3.3.1 Estrutura selecionada como ponto de partida para a modelagem dos compostos desejados (UJEQEF - SCHMITT *et al.*, 2003).

As estruturas tridimensionais modeladas dos ligantes utilizados neste trabalho estão apresentadas na Figura 3.3.2.

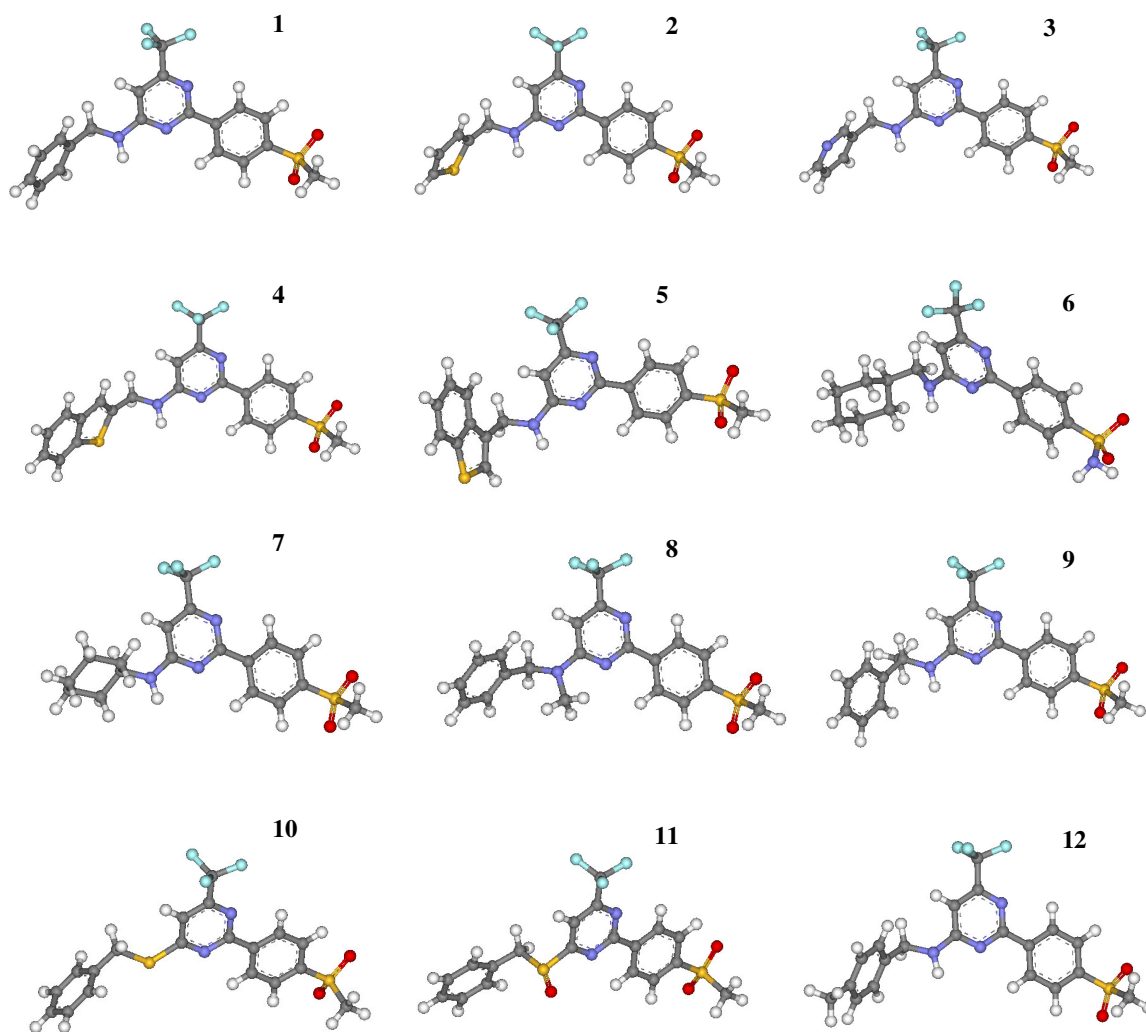
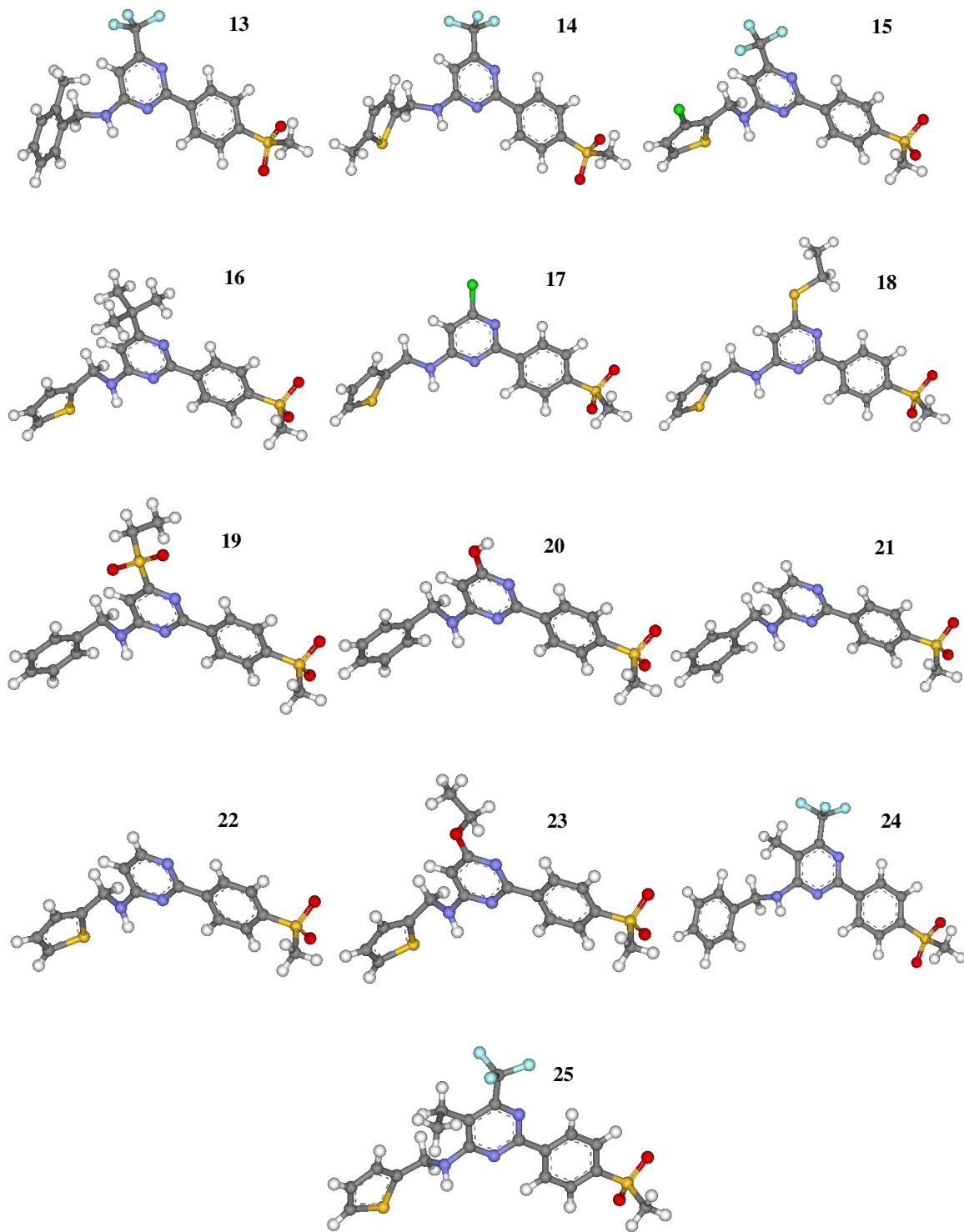


Figura 3.3.2 Derivados pirimidínicos de 1 a 25 utilizados nos cálculos de *docking*.



Continuação Figura 3.3.2

3.4 Análises das Orientações dos Compostos

A análise das poses obtidas nos cálculos de *docking*, para os compostos de **1** a **25** nos sítios de ligação da COX-1 e COX-2 foi feita utilizando o programa *DS Visualizer* 2.0 (DS Visualizer 2.0, 2007). As orientações similares foram agrupadas, e, em cada grupo, o composto que apresentava o melhor *score* foi analisado em tela gráfica. Desta forma, foram identificadas as interações, medindo distâncias e ângulos entre átomos do ligante e da enzima. Neste processo, também foram usados os programas Swiss-PDBViewer (SwissPDB Viewer – <http://www.expasy.org/spdbv/>) e HyperChem (HyperChem, 1996).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 *Redocking* (Validação)

No início dos cálculos de *docking* é necessário fazer uma série de escolhas de parâmetros, como por exemplo, a escolha do sítio de ligação e do raio da esfera que será utilizado de forma que todos os aminoácidos importantes para a inibição sejam incluídos. Para isso o primeiro passo é transformar o complexo cristalográfico em duas moléculas isoladas, proteína e ligante, e então reconstruí-lo mediante a simulação computacional, este processo é conhecido como *redocking*. Depois de obtido o complexo virtual este é comparado com o complexo cristalográfico original, sendo os resultados coincidentes então se pode considerar que os parâmetros utilizados foram validados.

Na Figura 4.1.1 são mostrados os resultados do *redocking* dos ligantes cristalográficos IM8-700 e SC-558 nos sítios de ligação da COX-1 e COX-2 respectivamente. Pode ser visto que houve uma excelente reconstrução dos complexos cristalográficos, validando assim a metodologia que iria ser aplicada no trabalho.

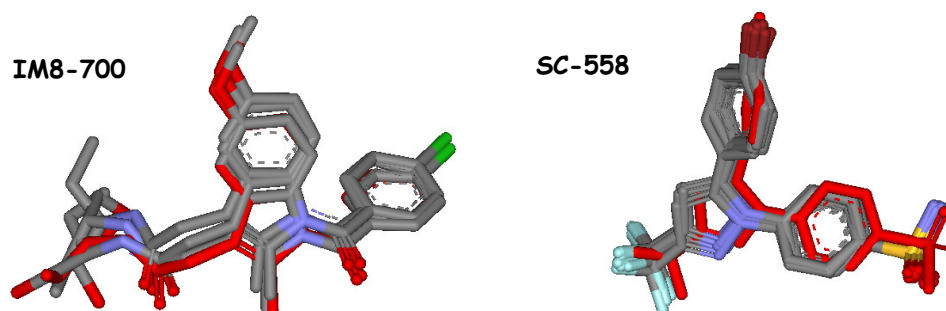


Figura 4.1.1 Resultados para o *redocking* dos ligantes cristalográfico IM8-700 (COX-1) e SC-558 (COX-2). Os ligantes iniciais obtidos do PDB estão em vermelho.

4.2 COX-1

Na Tabela 4.2.1 estão os *scores* de *fitness* obtidos para as pirimidinas de **1** a **25** em complexo com a COX-1. O valor de *fitness* mostrado corresponde ao da pose escolhida para cada grupo. No Anexo A há um detalhamento completo das interações bem como as figuras correspondentes.

Compostos	Fitness (kcal/mol)
1	-66,56
2	-72,74
3	-66,48
4	-75,31
5	NR
6	-64,10
7	-66,09
8	-70,16
9	-64,71
9e*	-62,71
10	-71,26
11	-71,85
12	-68,15
13	-66,13
14	-69,73
15	NR
16	-73,03
17	NR
18	NR
19	-72,00
20	NR
21	-63,25
22	-73,34
23	NR
24	-67,89
25	NR

* Refere-se ao enantiômero do ligante 9.

NR: Os resultados obtidos através de cálculos, visualização gráfica e análise de interações não indicaram a formação do complexo proteína-ligante.

Os cálculos de *docking* indicaram que, com exceção dos ligantes **5**, **15**, **17**, **18**, **20**, **23** e **25** os quais não apresentaram um conjunto de poses estatisticamente significativo, é possível a formação de complexo entre os derivados pirimidínicos e a COX-1.

4.2.1 Análise geral sobre os complexos pirimidinas-COX-1

A Tabela 4.2.1.1 é um resumo de todas as interações que as pirimidinas fazem com os resíduos do sítio da COX-1, uma análise detalhada pode ser encontrada no Anexo A.

Tabela 4.2.1.1 Interações das pirimidinas com os resíduos de aminoácido do sítio da COX-1

Pirimidinas	Resíduos do sítio da COX-1													Scores		
	Pro86	His90	Arg120	Val349	Leu352	Ser353	Tyr355	Ser516	Ile517	Phe518	Ile523	Glu524	Ala527		Ser530	Leu531
IM8-700																-74,70
1																-66,56
2																-72,74
3																-66,48
4																-75,31
6																-64,10
7																-66,09
8																-70,16
9																-64,71
9e																-62,71
10																-71,26
11																-71,85
12																-68,15
13																-66,13
14																-69,73
16																-73,03
19																-72,00
21																-63,25
22																-73,34
24																-67,89

* Interações das pirimidinas com a COX-1. As interações formadas entre os ligantes e os resíduos de aminoácidos estão representadas em verde. Os valores de *scores* são apresentados em kcal/mol.

As pirimidinas analisadas apresentam um padrão de formação de complexo no sítio de ligação da ciclooxigenase 1 em que orientam sua porção SO_2Me no bolso lateral (Gln192, Ser516, Ile517, Phe518 e Ile523) formando ligações de hidrogênio com os resíduos Ile517 e Phe518. Interações entre o inibidor IM8-700 e aminoácidos do bolso lateral já foram descritas por Harman *et al.*, 2007. Os derivados pirimidínicos estudados se orientam de maneira que o grupo CF_3 ou SO_2Et (no caso do composto **19**) forma interações com os resíduos Val349, Ala527, Ser530 e Leu531, que compõem o bolso de migração do O_2 para formação de prostaglandinas a partir do ácido araquidônico (MALKOWSKI *et al.*, 2000). Outro ponto observado foi que os anéis fenila, metilfenila, tiofenila, pirimidínico ou cicloexil interagem com os resíduos carregados Arg120 e Glu524 na boca do canal. O grupo hidroxila da porção etanolamida do inibidor IM8-700 da família das indometacinas etanolamidas também interagem com Arg120 e Glu524 (HARMAN *et al.*, 2007).

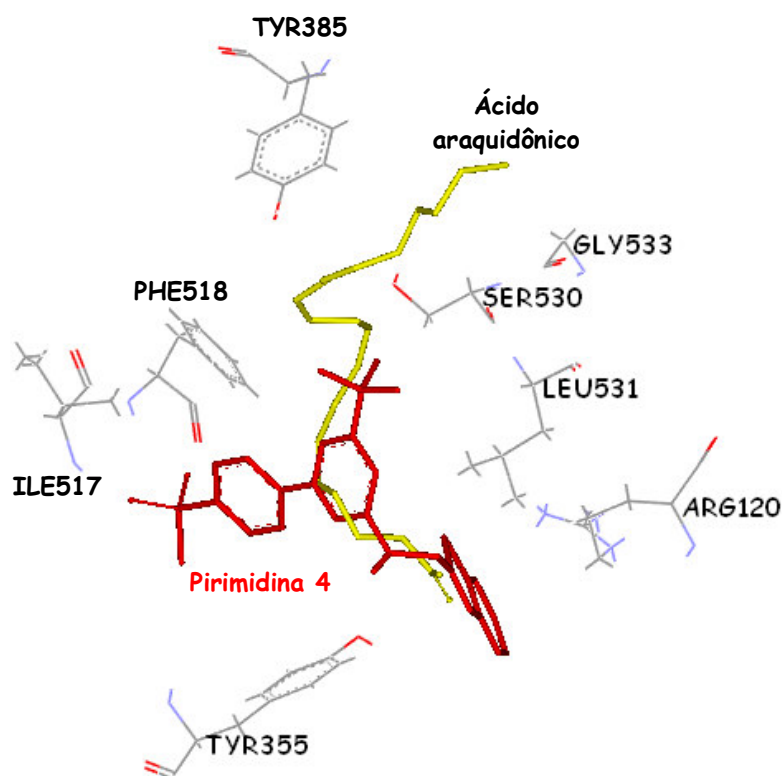


Figura 4.2.1.1 Pirimidina **4** e ácido araquidônico sobrepostos no sítio de ligação da ciclooxigenase 1. Note que o composto **4** (vermelho), que foi um dos mais favoráveis para formação do complexo, se orienta no sítio ativo da ciclooxigenase 1, mesmo sítio que o substrato ácido araquidônico (amarelo). No entanto, o ligante **4** apresenta um padrão de orientação diferente do ácido araquidônico. Hidrogênios não representados para facilitar compreensão.

As pirimidinas analisadas se ligam ao sítio ativo da COX-1, ou seja, no mesmo sítio de ligação do substrato ácido araquidônico, portanto, o provável tipo de inibição é competitivo. No entanto, os derivados pirimidínicos e o substrato ácido araquidônico se orientam de maneira diferenciada no sítio ativo (Figura 4.2.1.1).

O composto **4** foi o que se mostrou mais favorável para a formação de complexo com a COX-1, apresentando o melhor *score* (-75,31 kcal/mol), bem como um padrão de ligação de alto peso estatístico. Cabe destacar que a interação com a Arg120 é do tipo cátion- π a qual é fundamental para formação do complexo entre o ácido araquidônico e a COX-1 (MALKOWSKI *et al.*, 2000). A Figura 4.2.2.2 mostra o ligante **4** na cavidade do sítio da COX-1 e no Anexo A pode ser encontrada a descrição completa das interações deste ligante no sítio.

A comparação entre a pirimidina **9** e seu enantiômero **9e** mostrou que há uma enantioseletividade na ligação destes compostos no sítio, pois o complexo com o ligante **9e** não se mostrou favorável, provavelmente pela ausência das ligações de hidrogênio entre o grupo SO₂Me e os resíduos Ile517 e Phe518.

Os ligantes **5**, **15**, **17**, **18**, **20**, **23** e **25** não apresentaram padrão de ligação com peso estatístico razoável, portanto não foram analisados.

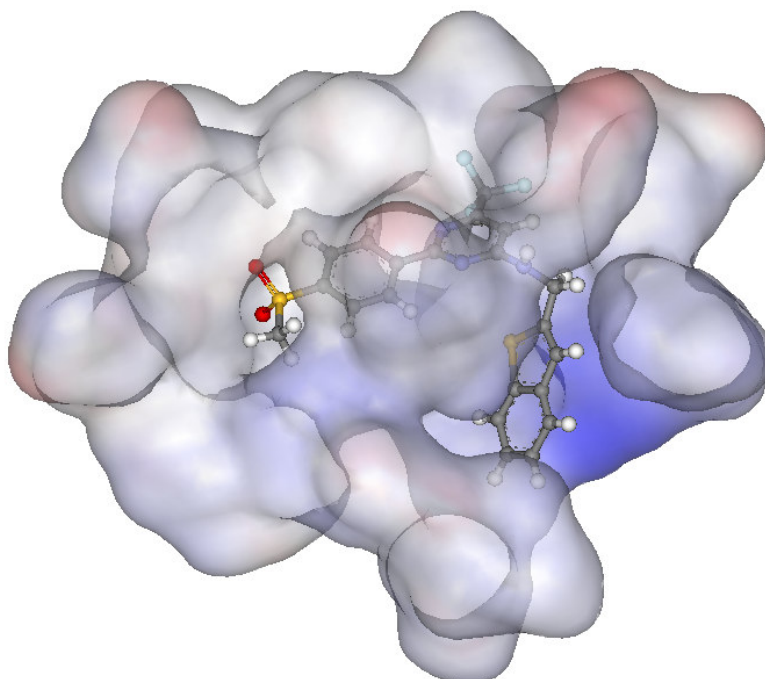


Figura 4.2.2.2 Composto **4** no sítio de ligação da COX-1. Sítio ativo representado em superfície: branca- regiões neutras, azul- regiões positivas e vermelho- regiões negativas. Ligante **4** representado em bola e bastão.

4.3 COX-2

Na Tabela 4.3.1 estão os *scores* de *fitness* obtidos para as pirimidinas de **1** a **25** em complexo com a COX-2. O valor de *fitness* mostrado corresponde ao da pose escolhida para cada grupo. No Anexo B há um detalhamento completo das interações bem como as figuras correspondentes.

Tabela 4.3.1 Valores de <i>score</i> de <i>Fitness</i> para as pirimidinas de 1 a 25 em complexo com a COX-2	
Compostos	Fitness (kcal/mol)
1	-82,34
2	-83,26
3	-79,62
4	-73,64
5	NR
6	-79,89
7	-66,36
8	-72,91
9	-71,21
9e*	-78,54
10	-80,73
11	-75,38
12	-85,42
13	-68,36
14	-82,81
15	-83,79
16	-75,86
17	-86,27
18	-90,60
19	NR
20	-71,07
21	NR
22	-83,74
23	-81,65
24	-78,99
25	NR

* Refere-se ao enantiômero do ligante 9.

NR: Os resultados obtidos através de cálculos, visualização gráfica e análise de interações não indicaram a formação do complexo proteína-ligante.

Os cálculos de *docking* indicaram que há a possibilidade de formação de complexo entre os derivados pirimidínicos e a COX-2 com exceção dos ligantes **5**, **19**, **21** e **25**, os quais não apresentaram um conjunto de poses estatisticamente significativo.

4.3.1 Análise geral sobre os complexos pirimidinas-COX-2

A Tabela 4.3.1.1 é um resumo de todas as interações que as pirimidinas fazem com os resíduos do sítio da COX-2, uma análise detalhada pode ser encontrada no Anexo B.

Tabela 4.3.1.1 Interações das pirimidinas com os resíduos de aminoácido do sítio da COX-2

Pirimidinas	Resíduos do sítio da COX-2														Scores						
	His90	Val116	Arg120	Gln192	Val349	Leu352	Ser353	Tyr355	Leu359	Tyr385	Arg513	Ala516	Ile517	Phe518		Met522	Val523	Ala527	Ser530	Leu531	
SC-558																					-80,63
1																					-82,34
2																					-83,26
3																					-79,62
4																					-73,64
6																					-79,89
7																					-66,36
8																					-72,91
9																					-71,21
9e																					-78,54
10																					-80,73
11																					-75,38
12																					-85,42
13																					-68,36
14																					-82,81
15																					-83,79
16																					-75,86
17																					-86,27
18																					-90,60
20																					-71,07
22																					-83,74
23																					-81,65
24																					-78,99

* Interações das pirimidinas com a COX-2. As interações formadas entre os ligantes e os resíduos de aminoácidos estão representadas em verde. Os valores de *scores* são apresentados em kcal/mol.

De forma geral a orientação das poses escolhidas dos compostos no sítio da COX-2 envolve a formação de ligações de hidrogênio entre os resíduos His90 e Arg513, do bolso lateral da COX-2, com a porção SO₂Me e entre os resíduos Arg120 e Tyr355 com os grupos substituintes do anel pirimidínico CF₃, Cl, SEt, SO₂Et e OH. É interessante ressaltar que tanto o substrato ácido araquidônico como o inibidor flurbiprofeno também formam ligações de hidrogênio com a Arg120 e Tyr355 (KIEFER *et al.*, 2000; KURUMBAIL *et al.*, 1996). Finalmente, os anéis fenila, tiofenila, cicloexil e pirimidínico interagem com os resíduos Tyr385, Met522, Val523, Ala527 e Ser530.

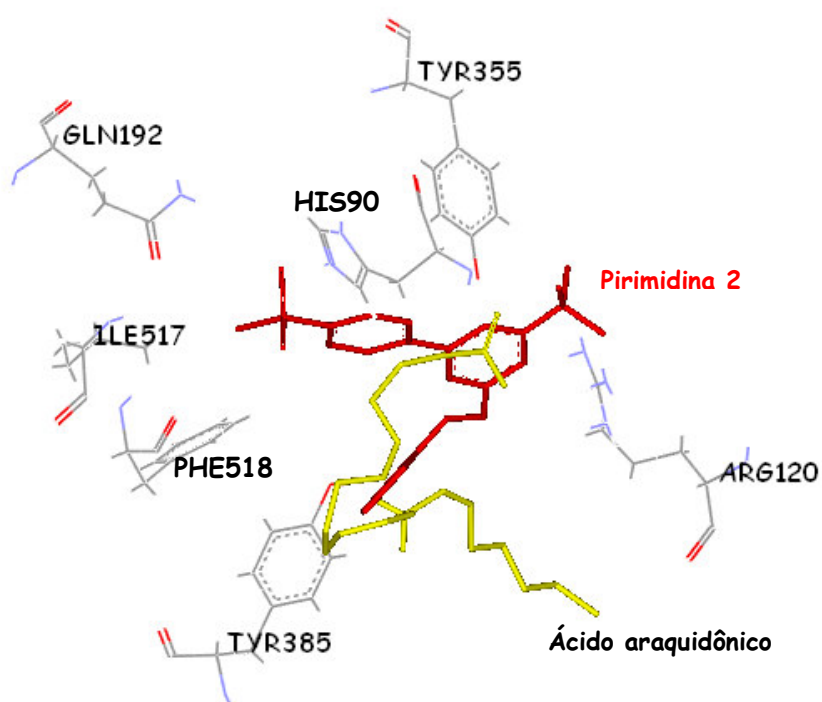


Figura 4.3.1.1 Pirimidina 2 e ácido araquidônico sobrepostos no sítio de ligação da ciclooxigenase 2. Note que o composto 2 (vermelho), que foi um dos mais favoráveis para formação do complexo, se orienta no sítio ativo da ciclooxigenase 2, mesmo sítio que o substrato ácido araquidônico (amarelo). No entanto, o ligante 2 apresenta um padrão de orientação diferente do ácido araquidônico. Hidrogênios não representados para facilitar compreensão.

As pirimidinas estudadas se ligam à COX-2 no mesmo sítio do substrato ácido araquidônico, portanto, o provável tipo de inibição é competitivo. No entanto, os derivados pirimidínicos e o substrato ácido araquidônico se orientam de maneira diferenciada no sítio ativo da COX-2 (Figura 4.3.1.1).

Os compostos 2, 15, 17, 22 e 23 foram os mais favoráveis para a formação de complexo com a COX-2. Tais ligantes tiveram um padrão bem definido de orientações,

interagindo com os resíduos His90, Arg513, Arg120 e Tyr355 e estão entre os que apresentam melhores valores de *scores*. A análise em tela gráfica dos resultados de *docking* mostra que os ligantes **2**, **15**, **17**, **22** e **23** se orientam de maneira muito semelhante (Figura 4.3.1.2) e no Anexo B pode ser encontrada a descrição completa das interações destes ligantes no sítio. Apesar de ter o melhor valor de *score*, a pirimidina **18** não apresentou um padrão de ligação com bom peso estatístico.

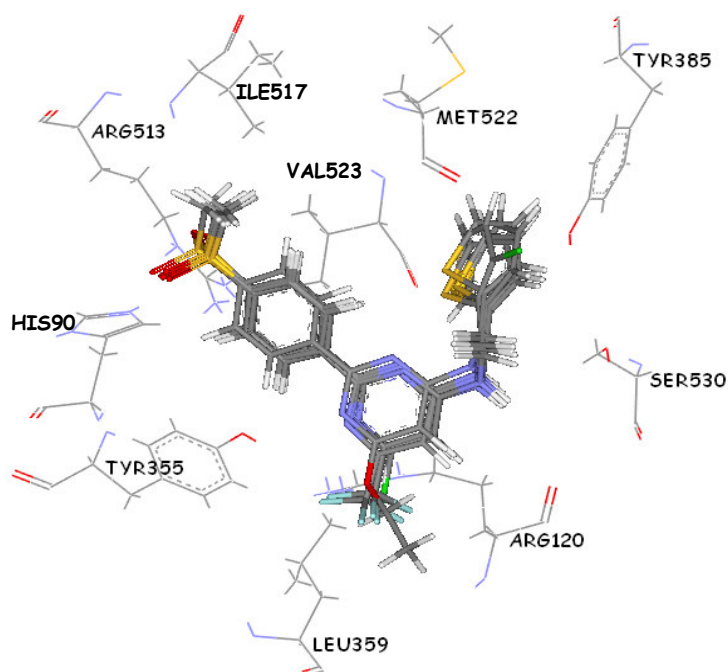


Figura 4.3.1.2 Pirimidinas **2**, **15**, **17**, **22** e **23** sobrepostas no sítio de ligação da COX-2. Note que tais compostos (os mais favoráveis para complexo com a COX-2) se orientam de maneira muito semelhante.

A Figura 4.3.1.3 mostra o ligante **17** na cavidade do sítio da ciclooxigenase 2.

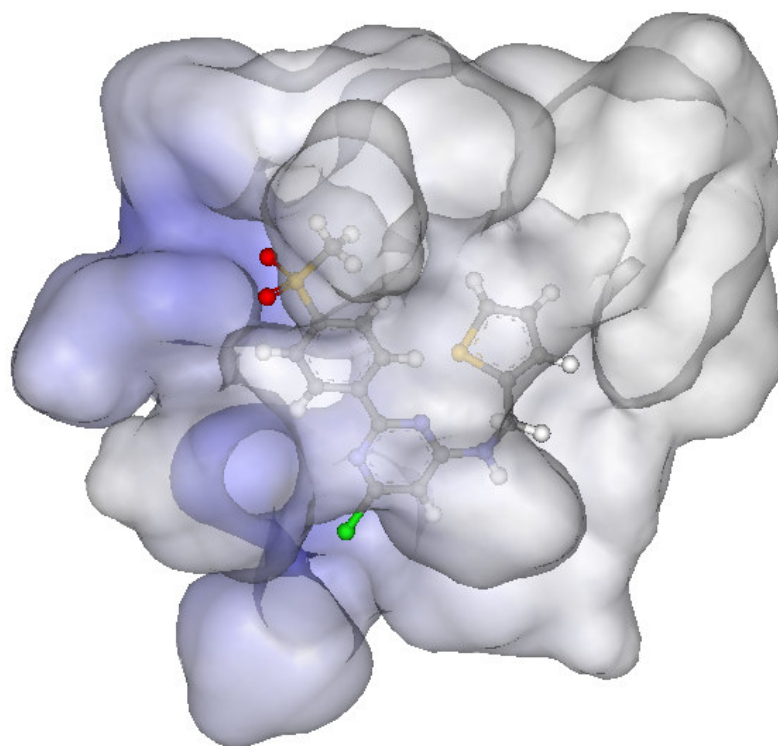


Figura 4.3.1.3 Composto **17** no sítio de ligação da COX-2. Sítio ativo representado em superfície: branca- regiões neutras, azul- regiões positivas e vermelho regiões- negativas. Ligante **17** representado em bola e bastão.

A Leu384 apresenta diferente orientação nas enzimas COX-1 e COX-2, isto porque na COX-1 a Phe503 com seu tamanho maior “empurra” a cadeia lateral da Leu384 para parte de cima do canal, e na COX-2, a menor Leu503 permite a Leu384 se orientar fora do sítio ativo, gerando um pequeno bolso lipofílico (MICHAUX *et al.*, 2005). De forma que uma sugestão para melhorar a interação dos inibidores **2**, **15**, **17**, **22** e **23** seria a adição de um grupo hidrofóbico no anel fenila e tiofenila, assim este grupo poderia se posicionar dentro do bolso lipofílico específico da COX-2.

Já os ligantes **4**, **7** e **13** foram os menos favoráveis para formar complexo com a COX-2. A pirimidina **4** não orienta sua porção SO₂Me no bolso lateral e não faz ligações de hidrogênio com os resíduos His90, Arg513, Arg120 e Tyr355, estas duas últimas estão posicionadas na entrada do sítio. A pirimidina **7**, apesar de formar ligações de hidrogênio com os resíduos Arg120, Tyr355 e Arg513, seu complexo com a COX-2 não se

mostrou favorável devido a formação de interações intramoleculares entre o N2 pirimidínico e anel cicloexil. O complexo entre o composto **13** e a COX-2 não se mostrou favorável, pois mesmo formando ligações de hidrogênio com os aminoácidos Arg120 e Tyr355, tal composto não faz ligações de hidrogênio entre o grupo SO₂Me e os resíduos His90 e Arg513 do bolso lateral, padrão apresentado pelas pirimidinas mais promissoras.

Como mencionado na introdução, o interessante é ter um equilíbrio entre a inibição de COX-2 e COX-1, sem inibir totalmente esta última, portanto os ligantes **15**, **17** e **23** que não formaram complexo com a COX-1 e somente com a COX-2, poderiam *a priori* serem descartados para a realização de ensaios *in vivo*. Por outro lado, os compostos **2** e **22** que apresentaram resultados favoráveis para a COX-2 não o foram para a COX-1, essa preferência pode estar relacionada a substituição da His por uma Arg na posição 513 do bolso lateral.

5. COMPARAÇÃO COM RESULTADOS EXPERIMENTAIS DA LITERATURA

A análise das interações bem como os *scores* resultantes dos cálculos de *docking* indicam as pirimidinas **15**, **17** e **23** como as mais favoráveis para a formação de complexo com a COX-2, sendo que não formaram complexos com a COX-1. Os dados experimentais de Orjales *et al.*, 2008 indicaram os ligantes **2**, **15**, **17**, **22** e **23** como alguns dos compostos que tiveram a melhor atividade inibitória e índice de seletividade para COX-2, inclusive melhores inibidores do que o Rofecoxib (Vioxx), isto mostra que há uma boa correlação entre os resultados experimentais e os de *docking* (Tabela 5.1).

Tabela 5.1 Scores e dados de inibição das pirimidinas 2, 15, 17, 22 e 23 para COX-2

Compostos	Score (kcal/mol)	IC ₅₀ (nM)	IS*(índice de seletividade)
SC-558** (redocking)	-80,63	9.3**	-
2	-83,26	2.1*	10702
15	-83,79	5.4*	>18622
17	-86,27	1.2*	>81300
22	-83,74	9.2*	>10905
23	-81,65	0.3*	>33333
Rofecoxib	-	-	211.0

* ORJALES *et al.*, 2008.

** KURUMBAIL *et al.*, 1996.

Os resultados mostrados na Tabela 5.2 permitem a realização de uma série de análises. O composto **5**, que não formou complexo com a COX-2 também se mostrou inativo e seu isômero, o composto **4**, mostrou baixa seletividade e apresentou valores relativamente próximos de *score*, -75,31 e -73,64 kcal/mol para a COX-1 e COX-2 respectivamente.

Tabela 5.2 Valores de *score*, IC₅₀ e IS das pirimidinas 4, 5, 7, 13, 19, 21 e 25 para a COX-2

Compostos	Score (kcal/mol)	IC ₅₀ (nM)	IS*(índice de seletividade)
SC-558** (redocking)	-80,63	9.3**	-
4	-73,64	293.4*	341
5	-	>10000*	>1
7	-66,36	238.5*	419
13	-68,36	5720*	>17
19	-	90.7*	>110
21	-	>10000*	>1
25	-	120.9*	>83

* ORJALES *et al.*, 2008.

** KURUMBAIL *et al.*, 1996.

Comparando-se a pirimidina **21** ao seu análogo **22** (tabelas 5.1 e 5.2) pode-se verificar que o composto **21** não formou complexo com a COX-2 enquanto o seu análogo ligante **22** sim. Isto pode ser explicado pelo fato do composto **21** ter perdido as ligações de hidrogênio com os resíduos His90 e Arg513 do bolso lateral e não apresentar padrão de orientação com peso estatístico satisfatório. Isto está de acordo com os dados experimentais que mostram o ligante **21** inativo e seu análogo **22** como inibidor seletivo da COX-2.

6. CONCLUSÕES

Os derivados pirimidínicos analisados que formaram complexo no sítio da **COX-1** se orientam com sua porção SO₂Me no bolso lateral formando ligações de hidrogênio com os resíduos Ile517 e Phe518. Além disso, o grupo CF₃ ou SO₂Et (no caso do composto **19**) faz interações com os resíduos Val349, Ala527, Ser530 e Leu531. Mais ainda, os anéis substituintes fenila, metilfenila, tiofenila, pirimidínico ou cicloexil interagem com os resíduos carregados Arg120 e Glu524. O composto **4** foi o mais favorável para a formação de complexo com a COX-1, e há enantioseletividade para a ligação da pirimidina **9**. O tipo de inibição dos compostos aqui estudados é provavelmente competitivo, pois os compostos que formaram complexo se ligam ao sítio ativo da COX-1, ou seja, no mesmo sítio de ligação do substrato ácido araquidônico.

A formação dos complexos entre as pirimidinas estudadas e o sítio da **COX-2** mostrou um padrão que inclui ligações de hidrogênio entre os resíduos His90 e Arg513 com a porção SO₂Me e entre os resíduos Arg120 e Tyr355 com os grupos substituintes do anel pirimidínico CF₃, Cl, SEt, SO₂Et e OH. A presença de um pequeno bolso lipofílico na COX-2, como descrito na Seção 4.3.1, e os resultados de *docking* permitem sugerir que os inibidores **2**, **15**, **17**, **22** e **23** poderiam ser melhorados com a adição de um grupo hidrofóbico no anel fenila e tiofenila para que este grupo se posicione dentro desse bolso. O tipo de inibição das pirimidinas aqui estudadas é provavelmente competitivo, pois os compostos também se complexaram no sítio ativo.

A procura por novos compostos com atividade antiinflamatória deve lidar com um ténue equilíbrio de inibição de COX-1 e COX-2. Nesse sentido, os ligantes **2** e **22** que apresentaram resultados favoráveis para a COX-2 e não tanto para a COX-1, seriam os mais promissores e, portanto, aqueles que deveriam ser testados *in vivo*.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDREASSON, K.. Emerging roles of PGE₂ receptors in model of neurological disease. (2010). *Prostaglandins & other Lipid Mediators*, 91, 104-112.

ARMELIN, P., R., G.. *Docking* de Derivados de Benzofuroxanos nas Enzimas Tripanotiona Redutase de *T.cruzi* e Glutaciona Redutase Humana e Comparação com Resultados de QSAR. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação)-Licenciatura Plena em Ciências Biológicas, Faculdade de Ciências. Universidade Estadual Paulista, Bauru,2007.

BATLOUNI, M.. Nonsteroidal Anti-inflammatory Drugs: Cardiovascular, Cerebrovascular and Renal Effects. (2010). *Arq. Bras. Cardiol.*, 24, 522-529.

BROOIJMANS, N.; KUNTZ, I., D.. Molecular recognition and docking algorithms. (2003). *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, 32, 335–373.

CSD - Cambridge Structural Database - licença concedida ao Prof. Dr. Julio Zukerman Schpector - LaCrEMM - DQ – UFSCar.

CUNHA, R., L., O., R.; ZUKERMAN-SCHPECTOR, J.; CARACELLI, I.; COMASSETO, J.V.. Revisiting the addition reaction of TeCl₄ to alkynes: The crystal structure and docking studies of 1-chloro-2-trichlorotelluro-3-phenyl-propen-2-ol. (2006). *J. Organometallic Chem.*, 691, 4807–4815.

DIVVELA, A., K., C.; CHALLA, S., R., TAGARAM, I., K.. Pathogenic role of cyclooxygenase-2 in cancer. (2010). *Journal of Health Science*, 56, 502-516.

Drug Bank <http://www.drugbank.ca/>

DS Visualizer v2.0. (2005-07). Accelrys Software Inc. WebLab Viewer Pro™, in: ATKINS, P. AND JONES, L. *Princípios de Química: Questionando a vida moderna e o meio ambiente*, trad. I. Caracelli *et al.*, Bookman Editora, Porto Alegre, 2001.

DUBOIS, R., N.; ABRAMSON, S., B.; CROFFORD, L.; GUPTA, R., A.; SIMON, L., S.; VAN DE PUTTE, L., B., A.; LIPSKY, P., E.. Cyclooxygenase in biology and disease. (1998). *The FASEB Journal*, 12, 1063-1073.

FERNANDEZ, M.; CABALLERO, J.; FERNANDEZ, L.; SARAI, A.. Genetic algorithm optimization in drug design QSAR: Bayesian-regularized genetic neural networks (BRGNN) and genetic algorithm support vectors machines (GA-SVM). (2011). *Mol. Divers*, 15, 269-289.

HARMAN, C., A.; TURMAN, M., V.; KOZAK, K., R.; MARNETT, L., J.; SMITH, W., S.; GARAVITO, M.. Structural basis of enantioselective inhibition of cyclooxygenase-1 by S- α -substituted indomethacin ethanalamides. (2007). *The Journal of Biological Chemistry*, 282, 28096-28105.

HEIN, A., M.; O'BANION, M., K.. Neuroinflammation and memory: the role of prostaglandins. (2009). *Mol. Neurobiol.*, 40, 15-32.

HENEKA, M., T.; O'BANION, M., K., TERWEL, D.; KUMMER, M., P.. Neuroinflammatory processes in Alzheimer's disease. (2010). *J. Neural Transm.*, 117, 919-947.

HÖRL, W., H.. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs and the kidney. (2010). *Pharmaceuticals*, 3, 2291-2321.

HyperChem[®] 5.01 Computational Chemistry, Waterloo, Ont. N2L 3X2, Canada, Hypercube Inc., 1996.

JONES, G.; WILLETT, P.; GLEN, R., C.. Molecular recognition of receptor sites using a genetic algorithm with a description of desolvation. (1995). *J. Mol. Biol.*, 245, 43-53.

JONES, G.; WILLETT, P.; GLEN, R., C.; LEACH, A., R.; TAYLOR, R.. Development and validation of a genetic algorithm for flexible docking. (1997) *J. Mol. Biol.*, 267, 727-748.

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. (2000). *Nature*, 405, 97-101.

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

MALKOWSKI, M., G.; GINELL, S., L.; SMITH, W., L.; GARAVITO, R., M.. Arachidonic acid bound to prostaglandin synthase. (2000). *Science*, 289, 1993-1937.

McGETTIGAN, P.; HENRY, D. Cardiovascular risk and inhibition of cyclooxygenase. (2006). *Jama*, 296, 1633-1644.

Merck & Co. <http://www.merck.com>:

[http://www.merck.com/mrksearch/SearchServlet?charset=UTF-](http://www.merck.com/mrksearch/SearchServlet?charset=UTF-8&la=en&nh=3&filtN=none&oq=press+release+30+september+2004&qt=press+release+30+september+2004+viox&search2button.x=29&search2button.y=10)

[8&la=en&nh=3&filtN=none&oq=press+release+30+september+2004&qt=press+release+30+september+2004+viox&search2button.x=29&search2button.y=10](http://www.merck.com/mrksearch/SearchServlet?charset=UTF-8&la=en&nh=3&filtN=none&oq=press+release+30+september+2004&qt=press+release+30+september+2004+viox&search2button.x=29&search2button.y=10)

MICHAUX, C.; CHARLIER, C.; JULÉMONT, F.; DE LEVAL, X. ; DOGNÉ, J-M; PIROTTE, B.; DURANT, F.. A new potential cyclooxygenase-2 inhibitor, pyridinic analogue of nimesulida. (2005). *European Journal of Medicinal Chemistry*, 40, 1316-1324.

MIRANDA, M.,N.. Algoritmos Genéticos: Fundamentos e Aplicações. (2000). Grupo de Teleinformática e Automação – UFRJ -<http://www.gta.ufrj.br/~marcio/genetic.html>.

MUÑOZ, J.; NAVARRO, C.; NORIEGA, V.; PINARDI, G.; SIERRALTA, F.; PRIETO, J., C.; MIRANDA, H., F.. Synergism between COX-3 inhibitors in two animal models of pain. (2010). *Inflammopharmacology*, 18, 65-71.

ORJALES, A.; MOSQUERA, R.; LÓPEZ, B.; OLIVERA, R.; LABEAGA, L.; NÚÑEZ, T.. Novel 2-(4-methylsulfonylphenyl) pyrimidine derivatives as highly potent and specific COX-2 inhibitors. (2008). *Bioorg. Med. Chem.*, 16, 2183-2199.

PALWINDER, S.; KAMALDEEP, P.; WOLFGANG, H.. Synthesis of pyrazole-based hybrid molecules: search for potent multidrug resistance modulators. (2006). *Bioorg. Med. Chem.*, 14, 5061-5071.

Protein Data Bank <http://www.rcsb.org>

PDBsum. <http://www.ebi.ac.uk/thornton-srv/databases/pdbsum/>

RANG, H., P.; DALE, M., M.; RITTER, J., M.; MOORE, P., K.. **Farmacologia**. Rio de Janeiro: Elsevier, 2004. 904 p.

SCHEIMAN, J., M.; HINDLEY, E., C.. Strategies to Optimize Treatment With NSAIDs in Patients at Risk for Gastrointestinal and Cardiovascular Adverse Events (2010). *Clinical Therapeutics*, 32, 667-677.

SCHMITT, J.-L.; STADLER, A.-M.; KYRITSAKAS, N.; LEHN, J.-M.. Helicity-Encoded molecular strands: efficient access by the hydrazone route and structural features. (2003). *Helv.Chim.Acta*, 86, 1598-1624.

SMITH, W., L.; DEWITT, D., L.; GARAVITO, M.. Cyclooxygenases: structural, cellular, and Molecular Biology. (2000). *Annu. Rev. Biochem.*, 69, 145-182.

SOLOMONS, T., W., G.; FRYHLE, C.. **Química Orgânica**. Rio de Janeiro : LTC, 2009. 494p.

SwissPDB Viewer - <http://ca.expasy.org/spdbv/text/tools.htm>

VANE, J., R.; BAKHLE, Y., S.; BOTTING, R., M.. Cyclooxygenases 1 and 2. (1998). *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 38, 97-120.

VEGA-TEIJIDO, M.; CARACELLI, I.; ZUKERMAN-SCHPECTOR, J. Conformational analyses and *docking* studies of a series of 5-nitrofuran- and 5-nitrothiophen-semicarbazone derivatives in three possible binding sites of trypanothione and glutathione reductases. (2006). *J. Mol. Graph. Model.*, 24, 349-355.

VOET, D; VOET, J, G.. **Bioquímica**. Porto Alegre: Artmed, 2000. 1616 p.

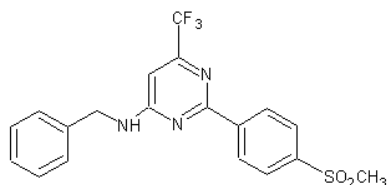
VONKEMAN, H., E.; van der LAAR, M., A., F., J.. Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs: Adverse Effects and Their Prevention. (2010). *Semin Arthritis Rheum*, 39, 294-312.

WU, W., K., K.; SUNG, J., J., Y.; LEE, W., C.; YU, J.; CHO, H., C.. Cyclooxygenase-2 in tumorigenesis of gastrointestinal cancers: An update on the molecular mechanisms (2010). *Cancer Letters*, 295, 7-16.

ANEXO A

O anexo A apresenta a descrição completa das interações e figuras correspondentes, assim como as tabelas de interações medidas para as pirimidinas estudadas e os resíduos da COX-1.

- PIRIMIDINA 1



A pirimidina **1** se liga a COX-1 com a porção SO₂Me orientada no bolso lateral, da mesma maneira que se orienta o grupo metoxi do anel indol do inibidor IM8-700 (HARMAN *et al.*, 2007). O grupo SO₂Me faz ligações de hidrogênio com os resíduos Ile517 e Phe518. O N1 pirimidínico interage com a Val349 e a porção CF₃ além de interagir com este mesmo resíduo, interage também com a Ser530. Os resíduos Val349 e Ser530 compõem o bolso de migração do O₂ para formação de prostaglandinas (MALKOWSKI *et al.*, 2000). O N3 do ligante **1** está posicionado próximo a Tyr355 e o anel fenila substituinte faz uma interação cátion- π com a Arg120, além de interagir com o aminoácido carregado Glu524. Interações com os aminoácidos Arg120, Tyr355 e Glu524 já foram descritas para inibidores da família das indometacinas etanolamidas (HARMAN *et al.*, 2007). A Figura 4.2.1 mostra a pirimidina **1** no sítio de ligação da COX-1 e na Tabela 4.2.2 estão listadas todas as interações.

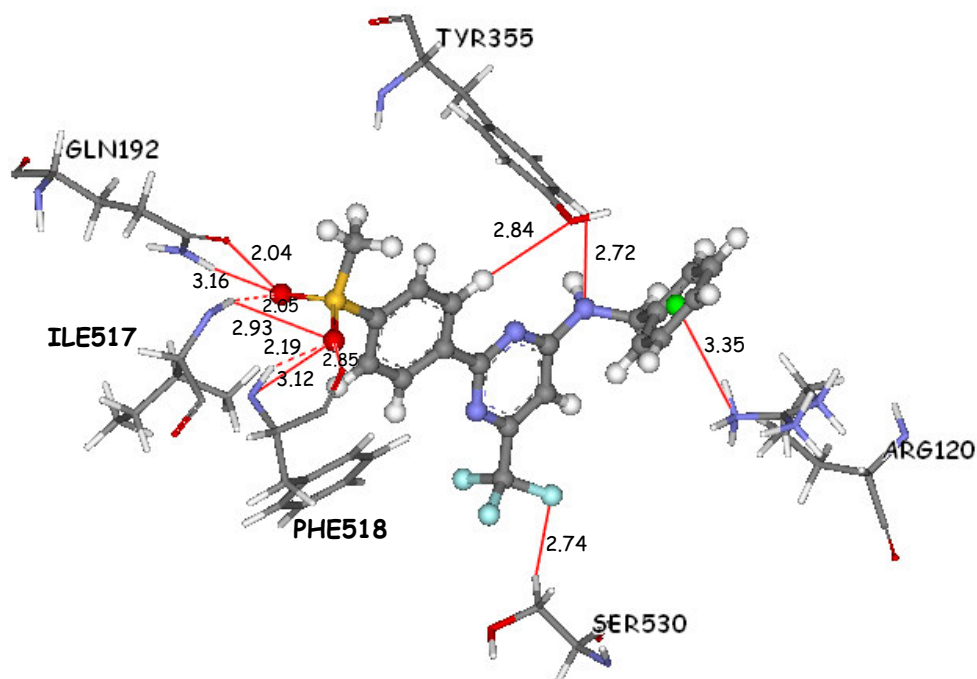
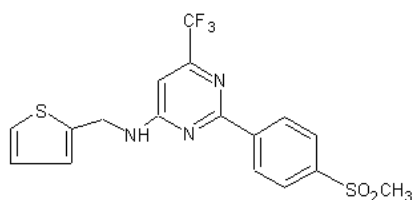


Figura 4.2.1 Pirimidina **1** no sítio da COX-1. São mostradas algumas interações do sítio em linhas vermelhas (distâncias em Å) e em tracejado vermelho as ligações de hidrogênio que o A centróide do anel fenila está mostrado em verde.

Tabela 4.2.2 Interações medidas para a pirimidina **1** em complexo com a ciclooxigenase 1

Átomos do ligante	Distância (Å)	Átomos da Proteína	Átomos do ligante	Distância (Å)	Átomos da Proteína
H1a	2.539	OG/Ser516	O2	2.046	H/Ile517 (LH)
H1b	2.527	O/Ser353	O2	2.045	OE1/Gln192
S1	2.768	HG23/Ile517	O2	3.157	HE21/Gln192
S1	2.934	H/Ile517	O2	2.638	O/Leu352
O1	2.936	HD12/Ile523	H3	2.985	O/Leu352
O1	2.884	HD2/Phe518	H6	2.837	OH/Tyr355
O1	2.846	O/Phe518	H7	2.760	O/Ser353
O1	3.116	N/Phe518	N1	2.871	HG11/Val349
O1	2.191	H/Phe518	F1	2.740	HB1/Ser530
O1	2.544	HG23/Ile517	F2	2.173	HG23/Val349
O1	2.929	H/Ile517	F3	3.066	HB2/Ser530
O1	2.649	HB1/Ser516	N3	2.718	HE1/Tyr355
O2	3.033	N/Ile517	H16	2.702	OE1/Glu524
O2	2.105	HG23/Ile517	Centróide C13-C18	3.354	NH1/Arg120

- PIRIMIDINA 2

Os cálculos de *docking* mostraram um índice de repetição de 40%, o que é relativamente baixo e com uma média dos *scores* de -67,38 kcal/mol. De forma que não são resultados muito auspiciosos para a possível formação do complexo entre a pirimidina **2** e o sítio de ligação da COX-1.

A pose escolhida mostra o composto **2** com seu grupo SO₂Me interagindo com resíduos do bolso lateral (His90, Gln192, His513, Ser516, Leu517, Phe518 e Ile523). O SO₂Me faz ligação de hidrogênio com a Ile517 (Figura 4.2.2), além de interagir com a His513 e Ile523, resíduos que são substituídos na COX-2 por Arg e Val respectivamente. O anel fenila faz interações com His90, Ser353 e Tyr355, o N2 pirimídínico está próximo a Ile523 e o N3 interage com a Ala527. A porção CF₃ faz interações com os resíduos Val349, Leu531 e Leu539 e o H12b do grupo CH₂ interage com a Met522 e Ala527. O anel tiofenila faz interações com a Leu384, Tyr385, Trp387 e Gly526. Na Tabela 4.2.3 estão apresentadas as interações da pirimidina **2** no complexo com a ciclooxigenase 1.

Inibidores da família das indometacinas etanolamidas também fazem interações com resíduos do bolso lateral (HARMAN *et al.*, 2007). Além disso, os resíduos Val349, Ala527, Leu531 fazem parte de um bolso de migração do O₂ para formação de prostaglandinas; os aminoácidos Leu384, Trp387 e Met522 compõem um bolso que poderia

acomodar as transições conformacionais do C-8 ao C-12 do ácido araquidônico durante a adição de O₂ e formação do anel endoperóxido e os resíduos Tyr355 e Gly526 também interagem com o substrato ácido araquidônico durante a formação de prostaglandinas (MALKOWSKI *et al.*, 2000).

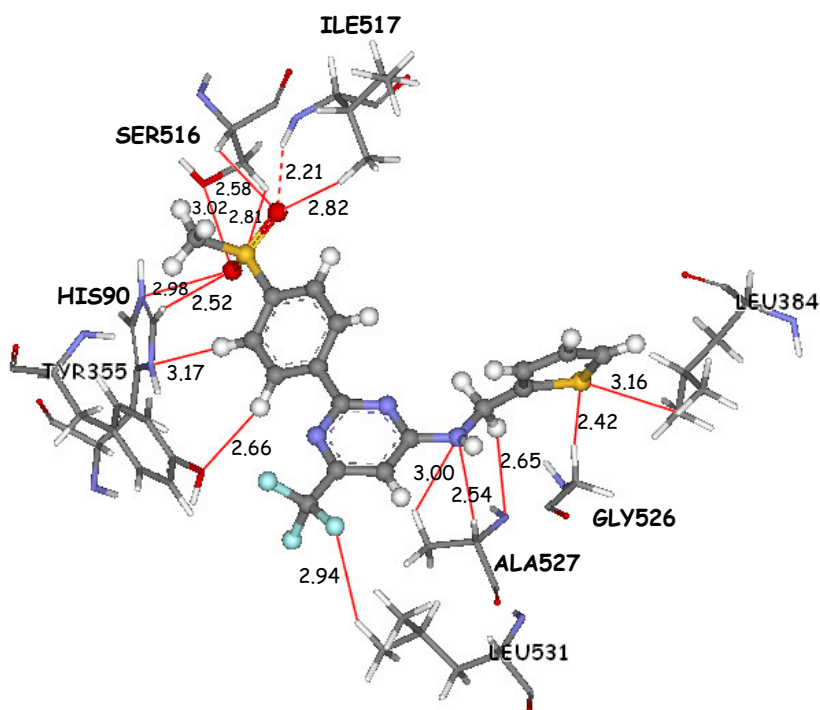


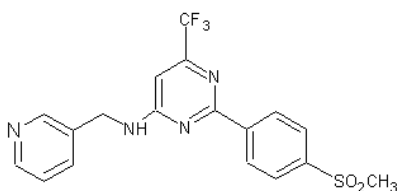
Figura 4.2.2 Derivado pirimidínico **2** no sítio da ciclooxygenase 1. São mostrados alguns resíduos e interações do sítio (representadas por linhas vermelhas com distâncias em Å). Note a ligação de hidrogênio entre o ligante e a Ile517 que está em tracejado vermelho.

Tabela 4.2.3 Interações medidas para a pirimidina **2** em complexo com a ciclooxygenase 1

Átomos do ligante	Distância (Å)	Átomos da Proteína	Átomos do ligante	Distância (Å)	Átomos da Proteína
H1a	2.111	O/Ser353	O2	2.818	HG23/Ile517
H1b	2.802	OE1/Gln192	O2	2.579	HA/Ser516
H1c	2.352	O/Ser353	H3	2.995	O/Ser353
H1c	3.074	O/Leu352	H3	3.172	ND1/His90
H1c	2.223	OE1/Gln192	H4	2.657	Tyr355/OH
S1	2.970	HE1/His90	N2	2.889	HG21/Ile523
O1	2.531	HD12/Ile523	F1	2.456	HD21/Leu359
O1	2.945	HD11/Ile523	F1	2.540	HG13/Val349
O1	2.905	HD1/His513	F3	2.935	HD12/Leu531
O1	2.975	NE2/His90	N3	2.999	HB3/Ala527
O1	2.919	HE2/His90	N3	2.538	HA/Ala527
O1	2.519	HE1/His90	H12b	2.652	N/Ala527
O1	3.022	OG/Ser516	H12b	2.832	O/Met522
O1	2.655	HB1/Ser516	S2	2.418	HA1/Gly526
O2	1.978	HB1/Ser516	S2	3.037	HZ2/Trp387
O2	2.520	H/Phe518	S2	3.161	HD22/Leu384
O2	2.851	N/Ile517	H15	2.096	OH/Tyr385
O2	2.209	H/Ile517			

A formação do complexo entre a pirimidina **2** e a ciclooxigenase 1 não se mostrou favorável, não somente pela falta de um padrão bem definido de orientação no sítio da COX-1, mas também pela falta de interações favoráveis com a Arg120 e pela perda da ligação de hidrogênio com a Phe518.

- PIRIMIDINA 3



O composto **3** se liga ao sítio da COX-1 com sua porção SO₂Me orientada no bolso lateral formando ligações de hidrogênio com os resíduos Ile517 e Phe518, região mais hidrofóbica do bolso lateral (HARMAN *et al.*, 2007). O N1 do anel pirimidínico interage com a Val349 e a porção CF₃ faz várias interações com os resíduos Val349, Leu352, Ala527, Ser530 e Leu531, que são resíduos do bolso de migração do O₂ para formação de prostaglandinas a partir do ácido araquidônico (MALKOWSKI *et al.*, 2000). O N3 interage com a Tyr355 e o anel pirimidínico substituinte faz interações com a Arg120, Ile523 e Glu524. Além disso, na entrada do canal da COX-1 há uma interação cátion- π entre a Arg120 e este anel pirimidínico substituinte. A região de junção da Arg120/Tyr355 é essencial para ligação do ácido araquidônico a COX-1, pois tais resíduos coordenam o carboxilato deste ácido graxo (MALKOWSKI *et al.*, 2000).

Na Figura 4.2.3 está mostrada a pirimidina **3** no sítio de ligação da COX-1 com destaque para as ligações de hidrogênio com os resíduos Ile517 e Phe518 e interação cátion- π entre o anel pirimidínico substituinte e a Arg120 e na Tabela 4.2.4 estão as interações do complexo entre a pirimidina **3** e a COX-1.

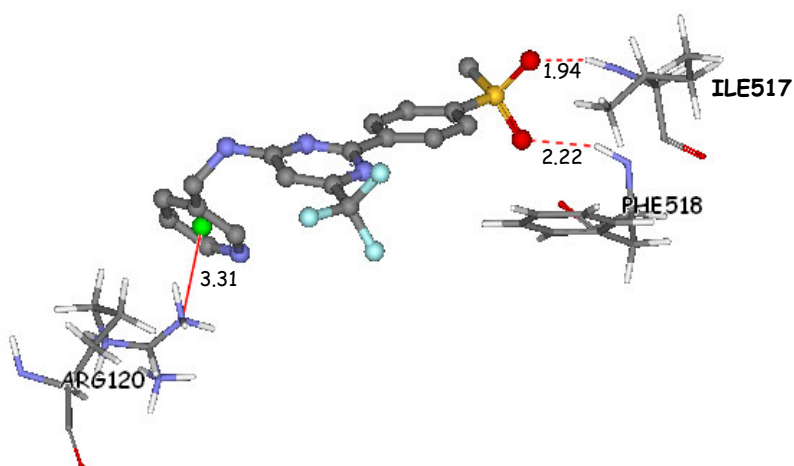
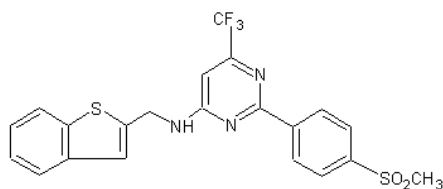


Figura 4.2.3 Ligante **3** no sítio da COX-1. Destaque para as ligações de hidrogênio com os resíduos Ile517 e Phe518 (tracejado vermelho) e para a interação cátion- π com a Arg120 (linha vermelha). Distâncias indicadas em Å e a centróide do anel fenila em verde.

Tabela 4.2.4 Interações medidas para a pirimidina **3** em complexo com a ciclooxigenase 1

Átomos do ligante	Distância (Å)	Átomos da Proteína	Átomos do ligante	Distância (Å)	Átomos da Proteína
H1a	2.938	NE2/His90	O2	2.790	O/Leu352
H1b	2.559	OG/Ser516	H3	3.061	O/Ser353
H1c	2.476	O/Ser353	H4	2.709	OH/Tyr355
S1	2.048	HG23/Ile517	H7	2.771	O/Leu352
S1	2.916	H/Ile517	N1	3.109	HG11/Val349
S1	3.059	HB1/Ser516	F1	2.984	HG22/Val349
O1	2.727	HD12/Ile523	F1	2.347	HG11/Val349
O1	2.366	HB1/Ser516	F1	3.039	HD21/Leu352
O1	2.667	O/Phe518	F2	2.215	HA/Ala527
O1	2.217	H/Phe518	F2	2.655	HB22/Ser530
O1	3.164	N/Phe518	F3	2.798	HB1/Ser530
O1	2.956	HD2/Phe518	F3	2.887	HG/Leu531
O1	2.817	HG23/Ile517	F3	2.655	HA/Ala527
O1	2.984	H/Ile517	N3	2.708	HE1/Tyr355
O2	2.109	OE1/Gln192	N4	2.479	HG23/Ile523
O2	3.111	HA/Ile89	N4	2.874	HH12/Arg120
O2	1.934	H/Ile517	N4	2.921	HH13/Arg120
O2	2.924	N/Ile517	H15	2.376	OE1/Glu524
O2	2.048	HG23/Ile517	Centróide C13-N-C17	3.314	NH1/Arg120

- PIRIMIDINA 4



A pirimidina **4** se orienta no sítio de ligação da ciclooxygenase 1 com seu grupo SO₂Me dentro do bolso lateral- His90, Gln192, His513, Ser516, Leu517, Phe518 e Ile523- formando ligações de hidrogênio com os resíduos Ile517 e Phe518 (Figura 4.2.4). O N1 pirimidínico interage com a Leu352 e a porção CF₃ faz interações com a Val349, Leu352, Ala527 e Ser530. Estes resíduos fazem múltiplas interações hidrofóbicas com o ácido araquidônico (MALKOWSKI *et al.*, 2000). Finalmente, o S2 do anel tiofenila faz várias interações com a Arg120, Ile523 e Ala527, inclusive uma interação cátion- π entre este anel e a Arg120. O aminoácido carregado Arg120 é fundamental para formação do complexo entre o ácido araquidônico e a ciclooxygenase-1 (MALKOWSKI *et al.*, 2000). Na Tabela 4.2.5 são apresentadas as interações entre o composto **4** e o sítio da COX-1.

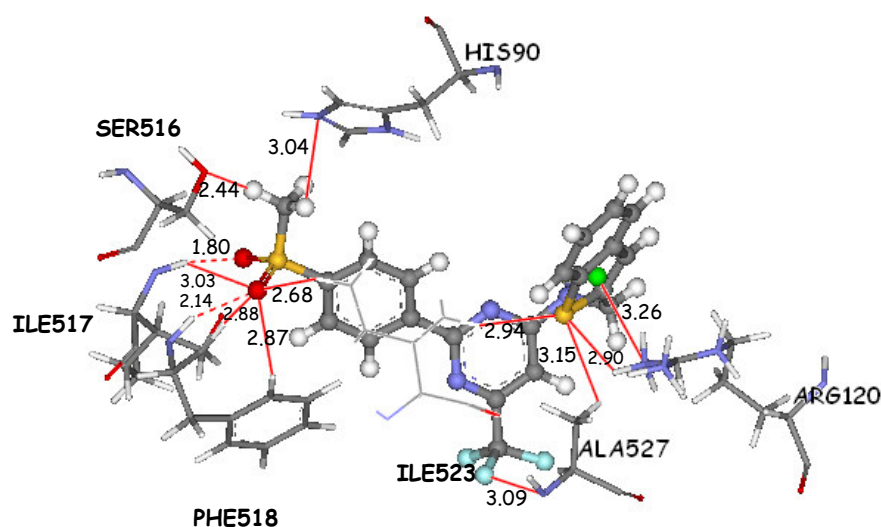


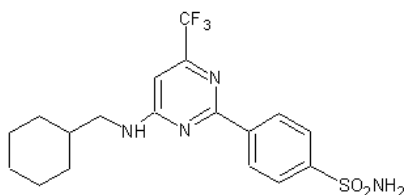
Figura 4.2.4 Pirimidina **4** no sítio de ligação da COX-1. Em linhas vermelhas são representadas algumas interações do sítio, em tracejado vermelho as ligações de hidrogênio com os resíduos Ile517 e Phe518 (distâncias em Å). Note a interação cátion- π que o composto forma com a Arg120. A centróide do anel fenila está indicada em verde.

Tabela 4.2.5 Interações medidas para a pirimidina **4** em complexo com a ciclooxigenase 1

Átomos do ligante	Distância (Å)	Átomos da Proteína	Átomos do ligante	Distância (Å)	Átomos da Proteína
H1a	3.038	NE2/His90	O2	2.996	O/Leu352
H1b	2.441	OG/Ser516	H3	2.357	O/Leu352
H1c	2.578	O/Ser353	H6	3.022	OH/Tyr355
S1	2.948	HB1/Ser516	N1	3.199	HD21/Leu352
S1	2.896	H/Ile517	F1	3.086	N/Ala527
S1	2.861	HG23/Ile517	F1	3.031	HB2/Ser530
O1	2.314	HB1/Ser516	F1	2.323	HA/Ala527
O1	2.681	HD12/Ile523	F2	2.899	HD21/Leu352
O1	2.520	O/Phe518	F2	2.913	HG23/Val349
O1	2.867	HD2/Phe518	F3	2.235	HA/Ala527
O1	3.078	N/Phe518	F3	2.145	HB2/Ser530
O1	2.140	H/Phe518	F3	2.419	HB1/Ser530
O1	2.877	HG23/Ile517	S2	2.935	HG23/Ile523
O1	3.028	H/Ile517	S2	2.902	HH12/Arg120
O2	2.111	OE1/Gln192	S2	3.149	NH1/Arg120
O2	2.930	HA/Ser516	S2	2.574	HH13/Arg120
O2	1.802	H/Ile517	S2	3.153	HB2/Ala527
O2	2.779	N/Ile517	H18	2.358	OE1/Glu524
O2	2.073	HG23/Ile517	Centróide C13-S-C16	3.261	NH1/Arg120

O composto **4** tem grande probabilidade de inibir a COX-1, por que além de apresentar um bom padrão de ligação no sítio da COX-1, forma ligações de hidrogênio entre sua porção SO₂ e os resíduos Ile517 e Phe518 (distâncias de 1.802 e 2.140 Å respectivamente) e faz uma interação cátion- π com a Arg120 na entrada do sítio, apresentando um *score* de *fitness* de -75,31 kcal/mol.

- PIRIMIDINA **6**



O composto **6** se liga ao sítio da ciclooxigenase 1 com a porção SO₂NH₂ interagindo com resíduos do bolso lateral- Gln192, Ser516, Ile517, Phe518 e Ile523- inclusive há formação de ligações de hidrogênio entre o ligante e a Ile517 e Phe518. Interações com aminoácidos do bolso lateral da COX-1 já foram descritas para o grupo metoxi do anel indol de inibidores da família das indometacinas etanolamidas (HARMAN *et al.*, 2007). O N pirimidínico interage com a Val349 e o grupo CF₃ faz interações com Val349, Ala527, Ser530 e Leu531, resíduos que participam na ligação do substrato ácido araquidônico a COX-1 (MALKOWSKI *et al.*, 2000). O N4 interage com a Tyr355 e os hidrogênios do anel

cicloexil fazem interações com os resíduos Arg120, Tyr355 e Glu524. Na Tabela 4.2.6 e na Figura 4.2.5 estão as interações medidas para pirimidina **6** na COX-1 e sua disposição no sítio respectivamente.

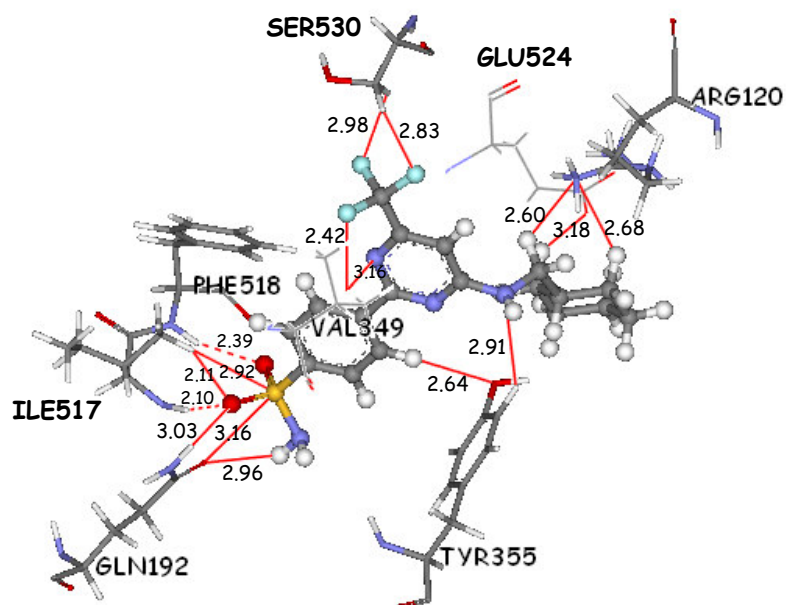
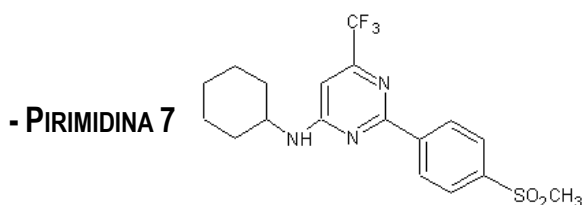


Figura 4.2.5 Composto **6** em complexo com a ciclooxigenase 1. Algumas interações do sítio estão representadas por linhas vermelhas. Note em tracejado vermelho as ligações de hidrogênio com os resíduos Ile517 e Phe518 (distâncias em Å).

Tabela 4.2.6 Interações medidas para a pirimidina **6** em complexo com a ciclooxigenase 1

Átomos do ligante	Distância (Å)	Átomos da Proteína	Átomos do ligante	Distância (Å)	Átomos da Proteína
H1N1	2.958	OE1/Gln192	O2	2.529	O/Leu352
H1N1	2.972	OG/Ser516	H2	2.761	O/Ser353
H2N1	3.120	OE1/Gln192	H3	2.643	OH/Tyr355
H2N1	2.146	O/Ser353	H6	2.711	O/Leu352
N1	2.557	HE1/His90	N2	3.161	HG11/Val349
N1	3.047	O/Ser353	F1	2.416	HG11/Val349
N1	2.972	HA/Ser516	F1	2.968	HG22/Val349
S1	3.162	OE1/Gln192	F2	2.267	HA/Ala527
S1	2.913	H/Ile517	F2	2.978	HB2/Ser530
S1	2.915	HG23/Ile517	F3	2.834	HB1/Ser530
O1	2.858	HD12/Ile523	F3	2.790	HG/Leu531
O1	2.940	O/Phe518	F3	2.184	HA/Ala527
O1	2.272	HB1/Ser516	N4	2.910	HE1/Tyr355
O1	2.338	H/Phe518	H11b	2.600	NH1/Arg120
O1	2.810	H/Ile517	H12	2.706	OH/Tyr355
O1	2.813	HG23/Ile517	H13a	2.676	NH1/Arg120
O2	3.089	N/Ile517	H15a	2.386	OE1/Glu524
O2	2.100	H/Ile517	H16b	2.379	OH/Tyr355
O2	3.169	HB/Ile517	H17a	2.898	NH1/Arg120
O2	1.999	OE1/Gln192	H17a	3.182	OE1/Glu524
O2	2.113	HG23/Ile517	H17b	2.790	OH/Tyr355
O2	3.029	HE21/Gln192			



O grupo SO_2Me do ligante **7** interage com resíduos do bolso lateral da COX-1 formando ligações de hidrogênio com a Ile517 e Phe518 (distâncias de 2.012 e 2.123 Å respectivamente) (Figura 4.2.6). Interações de inibidores da família das indometacinas etanolamidas com resíduos do bolso lateral (Gln192, Ser516, Ile517, Phe518 e Ile523) foram descritas por Harman *et al.*, 2007. O N1 pirimidínico interage com a Val349 e Leu352 e o N2 com a Ile523. A porção CF_3 faz interações com os resíduos Val349, Leu352, Ala527 e Ser530. Os hidrogênios do anel cicloexil fazem interações com Arg120, Tyr355 e Glu524. Os resíduos Arg120, Val349, Leu352, Tyr355, Ile523, Ala527 e Ser530 interagem com o substrato ácido araquidônico no sítio de ligação da ciclooxigenase 1 (MALKOWSKI *et al.*, 2000). Na Tabela 4.2.7 são apresentadas as interações do ligante **7** na ciclooxigenase 1.

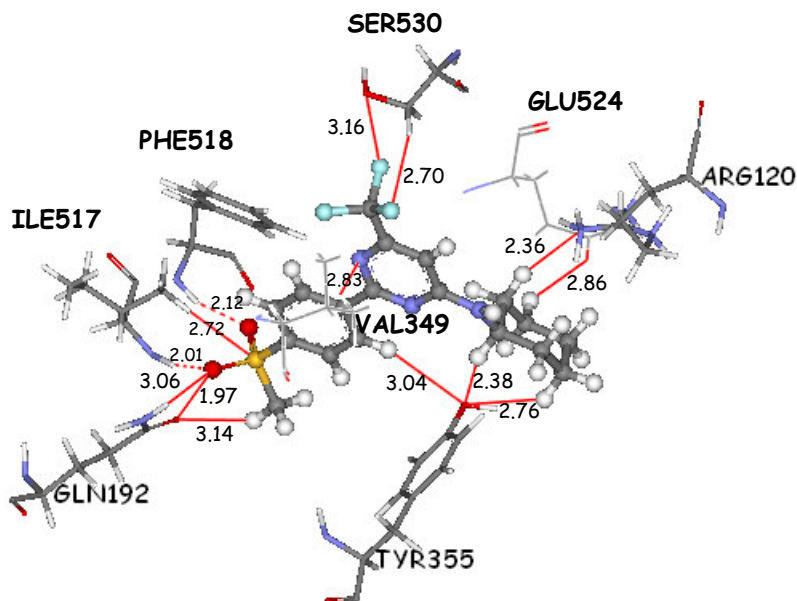


Figura 4.2.6 Ligante **7** no sítio da ciclooxigenase 1. São mostradas algumas interações do sítio em tracejado vermelho e ligações de hidrogênio em tracejado vermelho (distâncias em Å).

Tabela 4.2.7 Interações medidas para a pirimidina **7** em complexo com a ciclooxigenase 1

Átomos do ligante	Distância (Å)	Átomos da Proteína	Átomos do ligante	Distância (Å)	Átomos da Proteína
H1a	3.141	OE1/Gln192	H3	2.670	O/Leu352
H1a	2.794	OG/Ser516	H6	3.036	OH/Tyr355
H1b	2.251	O/Ser353	H7	3.094	O/Ser353
H1c	3.177	NE2/His90	N1	3.053	HD21/Leu352
S1	2.833	H/Ile517	N1	2.883	HG11/Val349
S1	2.718	HG23/Ile517	N2	3.198	HG21/Ile523
O1	2.995	HD12/Ile523	F1	2.738	HG11/Val349
O1	2.437	HB1/Ser516	F1	2.460	HD21/Leu352
O1	2.835	O/Phe518	F2	2.321	HA/Ala527
O1	2.123	H/Phe518	F2	2.344	HB2/Ser530
O1	3.082	N/Phe518	F2	3.165	OG/Ser530
O1	3.071	HD2/Phe518	F3	2.914	HG12/Val349
O1	2.754	H/Ile517	F3	2.698	HB1/Ser530
O1	2.558	HG23/Ile517	N3	3.157	HB2/Ala527
O2	1.971	OE1/Gln192	H12	2.377	OH/Tyr355
O2	3.057	HE21/Gln192	H14b	2.755	OH/Tyr355
O2	2.607	O/Leu352	H15a	2.910	NH1/Arg120
O2	3.000	N/Ile517	H16a	2.862	OE1/Glu524
O2	2.012	H/Ile517	H16b	2.327	OH/Tyr355
O2	2.073	HG23/Ile517	H17a	2.358	NH1/Arg120
O2	3.113	HB/Ile517			

As pirimidinas **6** e **7** se orientam de maneira semelhante no sítio da COX-1, apresentando *scores* próximos. O derivado **6** tem sua porção SO₂NH₂ formando ligações de hidrogênio com a Ile517 e Phe518. Esta porção tem como correspondente no composto **7** o SO₂Me que também faz ligações de hidrogênio com tais resíduos (Figura 4.2.7). O N pirimidínico de ambos interagem com Val349 e seus hidrogênios do anel cicloexil formam interações com Arg120, Tyr355 e Glu524.

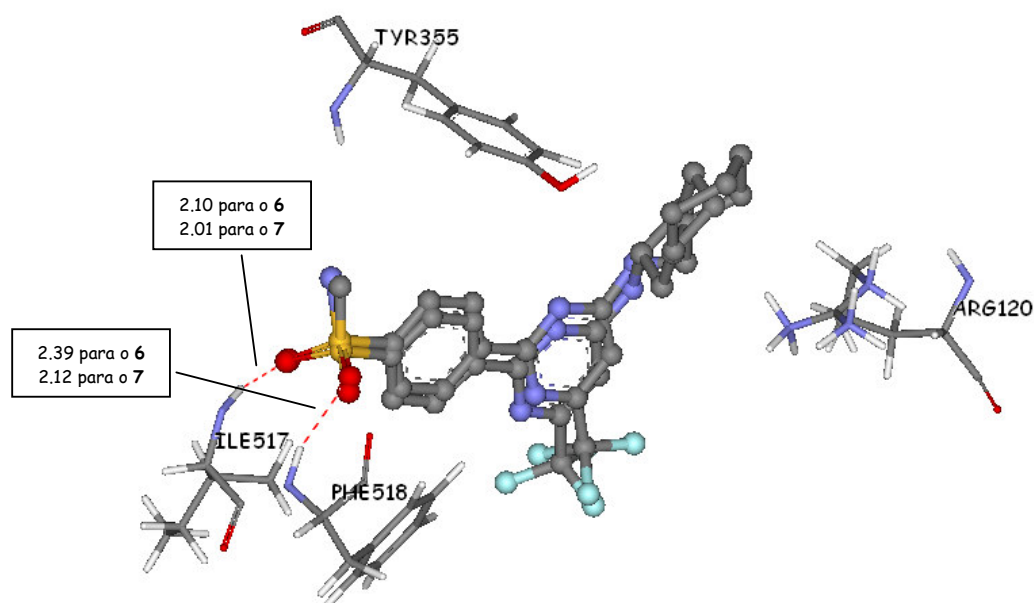
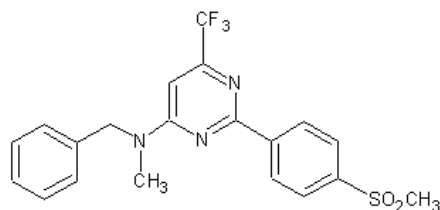


Figura 4.2.7 Compostos **6** e **7** sobrepostos no sítio da COX-1. São mostradas as ligações de H (tracejado vermelho) que ambos os ligantes formam no sítio. Distâncias das ligações indicadas no box.

- PIRIMIDINA 8



O ligante **8** se orienta no sítio da ciclooxigenase 1 com sua porção SO₂Me no bolso lateral formando ligações de hidrogênio com a Ile517 e Phe518. Seu nitrogênio pirimidínico interage com a Val349 e seu grupo CF₃ faz interações com a Val349, Leu352, Ala527, Ser530 e Leu531. Tais resíduos compõem o bolso de migração do O₂ na COX-1 para formação de prostaglandinas a partir do ácido araquidônico (MALKOWSKI *et al.*, 2000). O N3 do ligante está posicionado próximo à Tyr355 e o anel fenila mais distante do grupo SO₂Me interage com os resíduos carregados Arg120 e Glu524, inclusive fazendo uma interação cátion- π com a Arg120 (Figura 4.2.8). Interações com Arg120, Tyr355 e Glu524 no sítio da COX-1 já foram descritas para o grupo hidroxil de inibidores da família das indometacinas etanolamidas (HARMAN *et al.*, 2007). Na Tabela 4.2.8 estão as interações medidas para o complexo **8**-COX-1.

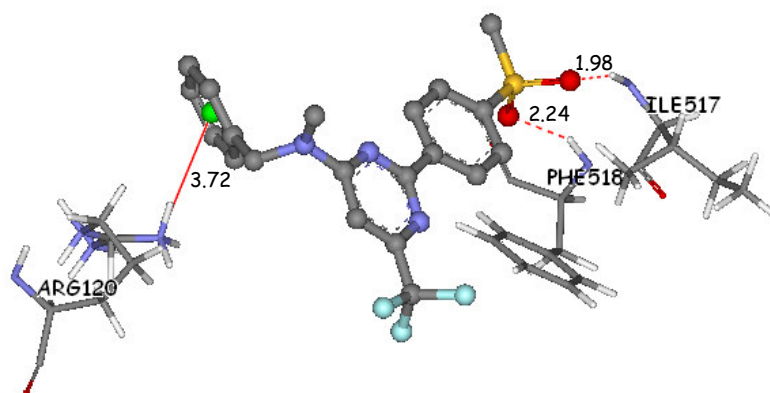


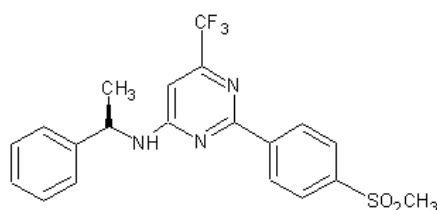
Figura 4.2.8 Pirimidina **8** no sítio de ligação da COX-1. Ligações de hidrogênio com os resíduos Ile517 e Phe518 (em tracejado vermelho) e interação cátion- π com a Arg120 (linha vermelha). Distâncias de interação em Å e a centróide do anel fenila está em verde. Os hidrogênios do ligante não estão representados para simplificar a representação.

Tabela 4.2.8 Interações medidas para a pirimidina **8** em complexo com a ciclooxigenase 1

Átomos do ligante	Distância (Å)	Átomos da Proteína	Átomos do ligante	Distância (Å)	Átomos da Proteína
H1a	2.673	OG/Ser516	O2	2.956	N/Ile517
H1b	2.404	O/Ser353	O2	1.982	H/Ile517
H1c	3.044	NE2/His90	O2	2.009	HG23/Ile517
S1	3.117	HB1/Ser516	H3	2.831	O/Leu352
S1	2.969	H/Ile517	N1	2.986	HG11/Val349
S1	2.854	HG23/Ile517	F1	2.705	HA/Ala527
O1	2.427	HB1/Ser516	F1	2.172	HB2/Ser530
O1	3.039	H/Ile517	F2	2.746	HA/Ala527
O1	2.823	HG23/Ile517	F2	2.562	HB1/Ser530
O1	3.178	N/Phe518	F2	3.008	HG/Leu531
O1	2.664	O/Phe518	F3	3.181	HG22/Val349
O1	2.240	H/Phe518	F3	2.937	HD21/Leu352
O1	2.898	HD2/Phe518	N3	3.015	HE1/Tyr355
O1	2.697	HD12/Ile523	H12b	3.186	NH1/Arg120
O2	2.117	OE1/Gln192	H17	2.743	OE1/Glu524
O2	2.765	O/Leu352	H18	2.883	NH1/Arg120
O2	3.172	HA/Ser516	Centróide C13-C18	3.725	NH1/Arg120

Os derivados pirimidínicos **1**, **3** e **8** se orientam de maneira semelhante no sítio de ligação da ciclooxigenase 1, e apresentam *scores* de *fitness* próximos (-66,56 para **1**, -66,48 para **3** e -70,26 para **8**, valores em kcal/mol) e interagem basicamente com os mesmos resíduos (Tabelas 4.2.2, 4.2.4 e 4.2.8). Os três compostos formam ligações de hidrogênio com a Ile517 e Phe518, além de fazer interações cátion- π com a Arg120 (Figuras 4.2.1, 4.2.3 e 4.2.8). Dentre estes três o que se ligou menos favoravelmente foi o ligante **1** devido à perda de interações, principalmente com o resíduo carregado Arg120.

- PIRIMIDINA **9**



A pirimidina **9** se complexa ao sítio de ligação da ciclooxigenase 1 com sua porção SO_2Me interagindo com resíduos do bolso lateral (His90, Gln192, Ser516, Ile517, Phe518 e Ile523), inclusive este grupo forma ligações de hidrogênio com a Ile517 e Phe518 (Figura 4.2.9). Interações com aminoácidos do bolso lateral já foram descritas para inibidores da família das indometacinas etanolamidas (HARMAN *et al.*, 2007). O N1 pirimidínico interage com a Val349 e a porção CF_3 faz interações com os resíduos Val349, Ala527, Ser530 e Leu531. Tais resíduos participam da ligação do substrato ácido araquidônico à COX-1

(MALKOWSKI *et al.*, 2000). O N3 do ligante está próximo a Tyr355 e o anel fenila, mais distante do grupo SO₂Me, interage com a Arg120, carregada positivamente. A Arg120 e a Tyr355 fazem interações com o carboxilato do ácido araquidônico (MALKOWSKI *et al.*, 2000). Na Tabela 4.2.9 são apresentadas as interações do complexo **9**-COX-1.

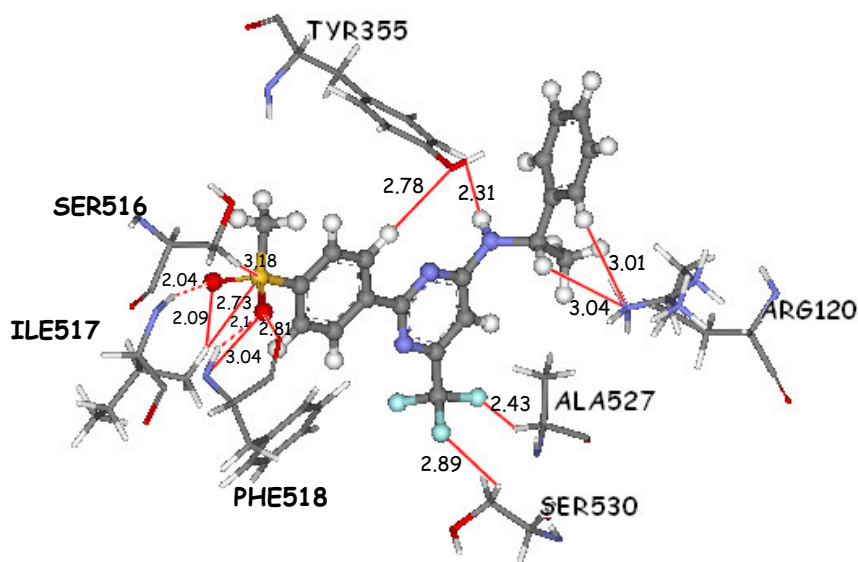
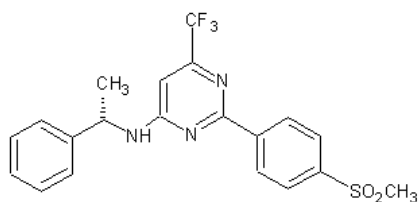


Figura 4.2.9 Ligante **9** no sítio de ligação da ciclooxigenase 1. São mostradas algumas interações do sítio (linhas vermelhas) e ligações de hidrogênio com a Ile517 e Phe518 (tracejado vermelho). Distâncias de interações em Å.

Tabela 4.2.9 Interações medidas para a pirimidina **9** em complexo com a ciclooxigenase 1

Átomos do ligante	Distância (Å)	Átomos da Proteína	Átomos do ligante	Distância (Å)	Átomos da Proteína
H1a	2.531	O/Ser353	O2	2.013	OE1/Gln192
H1b	3.172	NE2/His90	O2	3.106	HE21/Gln192
H1c	2.537	OG/Ser516	O2	2.613	O/Leu352
S1	3.175	HB1/Ser516	H3	2.908	O/Leu352
S1	2.853	H/Ile517	H6	2.781	OH/Tyr355
S1	2.736	HG23/Ile517	H7	2.817	O/Ser353
O1	3.004	HD12/Ile523	N1	2.996	HG11/Val349
O1	2.959	HD2/Phe518	F1	2.433	HA/Ala527
O1	2.814	O/Phe518	F1	2.806	HB1/Ser530
O1	3.035	N/Phe518	F1	2.762	HG/Leu531
O1	2.093	H/Phe518	F2	2.379	HG11/Val349
O1	2.538	HB1/Ser516	F2	2.238	HG23/Val349
O1	2.807	H/Ile517	F3	2.281	HA/Ala527
O1	2.509	HG23/Ile517	F3	2.887	HB2/Ser530
O2	2.094	HG23/Ile517	N3	2.313	HE1/Tyr355
O2	3.028	N/Ile517	H12b	3.044	NH1/Arg120
O2	2.040	H/Ile517	H18	3.088	NH1/Arg120
O2	3.176	HB/Ile517			

- PIRIMIDINA 9e

A pirimidina **9e**, que se refere a um enantiômero do composto **9**, se orienta no sítio da ciclooxygenase 1 com seu grupo SO₂Me formando interações com aminoácidos do bolso lateral. Harman *et al.*, 2007 descreveram interações entre inibidores da famílias das indometacinas etanolamidas e tais resíduos do bolso lateral. O N2 do anel pirimidínico do ligante interage com a Tyr355 e Ile523. A porção CF₃ faz interações com a Val116, Val349, Leu359 e Leu531, resíduos que lineam o canal da COX (SMITH, DEWITT E GARAVITO, 2000). O N3 do ligante **9e** interage com a Arg120. O anel fenila mais distante da porção SO₂Me forma interações com a Pro86 e com os resíduos carregados Arg120 e Glu524. O grupo hidroxil de inibidores da família das indometacinas etanolamidas também interage com a Arg120 e Glu524 (HARMAN *et al.*, 2007).

Na Tabela 4.2.10 e na Figura 4.2.10 estão as interações medidas para pirimidina **9e** no sítio de ligação da COX-1 e sua disposição no sítio respectivamente.

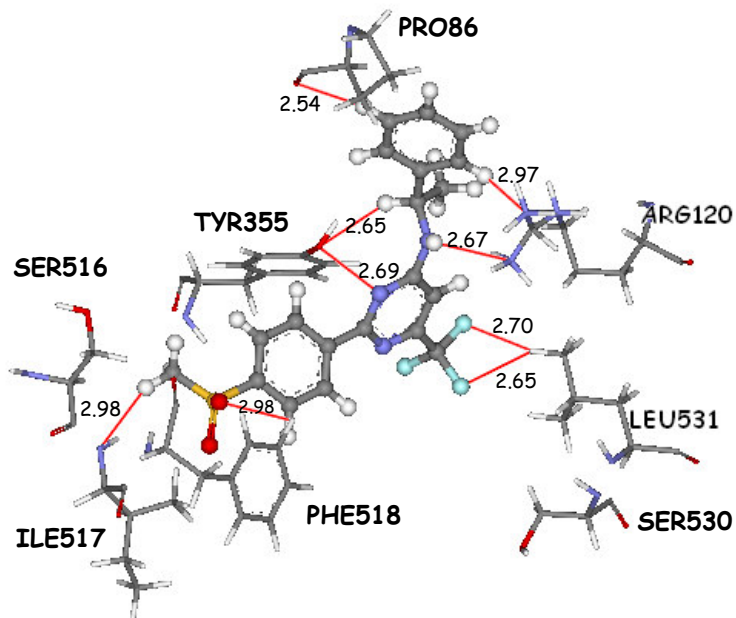


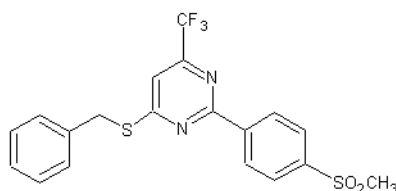
Figura 4.2.10 Disposição do composto **9e** no sítio de ligação da ciclooxygenase 1. Estão representadas algumas interações do sítio (linhas vermelhas). Distâncias de interação em Å.

Tabela 4.2.10 Interações medidas para a pirimidina **9e** em complexo com a ciclooxigenase 1

Átomos do ligante	Distância (Å)	Átomos da Proteína	Átomos do ligante	Distância (Å)	Átomos da Proteína
H1a	2.879	OE1/Gln192	N2	2.692	OH/Tyr355
H1a	3.049	O/Leu352	N2	2.939	HH/Tyr355
H1a	2.288	O/Ser353	N2	2.896	HG23/Ile523
H1c	2.409	OE1/Gln192	F1	2.548	HG12/Val349
H1c	2.981	N/Ile517	F1	2.398	HD11/Leu359
S1	3.087	O/Leu352	F1	3.197	HD23/Leu359
S1	2.761	HG23/Ile517	F2	2.477	HG12/Val349
S1	3.092	HG12/Ile523	F2	2.651	HD12/Leu531
O1	2.557	HE2/Phe518	F3	2.372	HG12/Val116
O1	2.457	HG12/Ile523	F3	2.698	HD12/Leu531
O1	2.817	HD12/Ile523	N3	2.297	HH13/Arg120
O1	2.472	HD2/Phe518	N3	3.174	NH1/Arg120
O1	2.853	H/Phe518	H1N3	2.668	NH1/Arg120
O1	2.796	HG23/Ile517	H12a	2.650	OH/Tyr355
O2	1.899	HG23/Ile517	H15	2.534	O/Pro86
O2	2.707	HG22/Ile517	H17	3.015	OE1/Glu524
O2	2.798	HG/Leu352	H18	2.734	NE/Arg120
O2	2.147	O/Leu352	H18	3.043	NH1/Arg120
H6	2.026	OH/Tyr355	H18	2.967	NH2/Arg120

A formação do complexo entre o ligante **9e** e o sítio da COX-1 não se mostrou favorável pelo fato, principalmente, da perda das ligações de hidrogênio entre o grupo SO₂Me e os resíduos Ile517 e Phe518. Tais ligações de hidrogênio têm se mostrado importante para a formação de complexo pirimidinas-COX-1.

- PIRIMIDINA **10**



A pirimidina **10** se liga ao sítio da ciclooxigenase 1 com sua porção SO₂Me formando ligações de hidrogênio com os resíduos Ile517 e Phe518 (Figura 4.2.11), região mais hidrofóbica do bolso lateral (HARMAN *et al.*, 2007). Seu grupo CF₃ faz várias interações com Val349, Ala527 e Leu531, resíduos que compõem o bolso de migração do O₂ para formação de prostaglandinas a partir do substrato ácido araquidônico (MALKOWSKI *et al.*, 2000). O N2 pirimidínico do ligante interage com a Tyr355 e Ile523. O S2 interage com a Arg120 e a Tyr355. O grupo etanolamida de inibidores da família das indometacinas etanolamidas também se posicionam na boca do canal, próximo a Arg120 e Tyr355 (HARMAN *et al.*, 2007). O anel fenila substituinte faz interações com a Pro86, Arg120 e Glu524. Na Tabela 4.2.11 são apresentadas as interações do complexo **10**-COX-1.

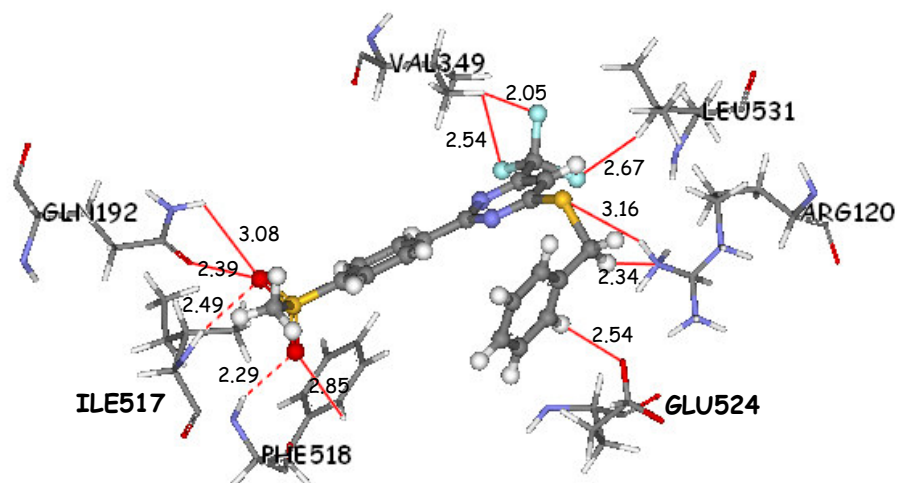
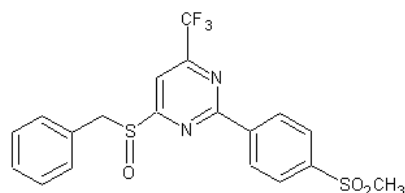


Figura 4.2.11 Orientação da pirimidina **10** no sítio de ligação da COX-1. São mostradas algumas interações do sítio (linhas vermelhas) e as ligações de hidrogênio (linhas tracejadas vermelhas) entre o ligante e a Ile517 e Phe518. Distâncias de interação em Å.

Tabela 4.2.11 Interações medidas para a pirimidina **10** em complexo com a ciclooxigenase 1

Átomos do ligante	Distância (Å)	Átomos da Proteína	Átomos do ligante	Distância (Å)	Átomos da Proteína
H1a	2.596	O/Ser353	H6	2.213	OH/Tyr355
H1b	3.007	OG/Ser516	N2	3.108	HE1/Tyr355
H1c	2.865	OE1/Gln192	N2	2.998	HH/Tyr355
H1c	2.826	OG/Ser516	N2	2.551	OH/Tyr355
S1	3.071	H/Ile517	N2	3.194	HG23/Ile523
S1	2.819	HG23/Ile517	N2	3.117	HG21/Ile523
O1	3.164	HG12/Ile523	F1	2.046	HG12/Val349
O1	2.977	HD12/Ile523	F1	2.997	HD12/Leu531
O1	2.850	HD2/Phe518	F2	2.540	HG12/Val349
O1	2.970	O/Phe518	F3	2.627	HG/Leu531
O1	3.195	N/Phe518	F3	2.413	HA/Ala527
O1	2.290	H/Phe518	F3	1.972	HB2/Ala527
O1	2.830	HB1/Ser516	S2	2.957	HE1/Tyr355
O1	3.001	H/Ile517	S2	3.185	OH/Tyr355
O1	2.482	HG23/Ile517	S2	2.700	HH/Tyr355
O2	2.100	HG23/Ile517	S2	3.160	HH13/Arg120
O2	2.492	H/Ile517	H12b	2.345	NH1/Arg120
O2	2.392	OE1/Gln192	H15	2.519	N/His90
O2	3.085	HE21/Gln192	H15	2.944	O/Pro86
O2	2.226	O/Leu352	H16	3.146	O/Pro86
H3	2.748	O/Leu352	H18	2.540	OE1/Glu524

- PIRIMIDINA 11

O composto **11** orienta sua porção SO₂Me no bolso lateral interagindo com os resíduos Gln192, Ser516, Ile517, Ile523, inclusive formando uma ligação de hidrogênio com a Phe518. O grupo metoxi do anel indol de inibidores da família das indometacinas etanolamidas também interagem com resíduos do bolso lateral (HARMAN *et al.*, 2007). O N2 pirimidínico do ligante faz interações com a Tyr355 e Ile523. O grupo CF₃ interage com a Val349, Ala527 e Leu531. Os aminoácidos Val349, Tyr355, Ile523 e Ala527 interagem na ligação do substrato ácido araquidônico à COX-1 (MALKOWSKI *et al.*, 2000). O S2 da pirimidina **11** interage com a Arg120 e Tyr355 e o O3 faz uma ligação de hidrogênio com a Arg120 (Figura 4.2.12). Ligação de hidrogênio entre o grupo hidroxil da porção etanolamida de inibidores da família das indometacinas etanolamidas e o resíduo Arg120 foram descritas por Harman *et al.*, 2007. O anel fenila substituinte do ligante **11** também faz várias interações com a Arg120, além de interagir com a Pro86 e Glu524. Na Tabela 4.2.12 estão as interações do complexo entre a pirimidina **11** e a COX-1.

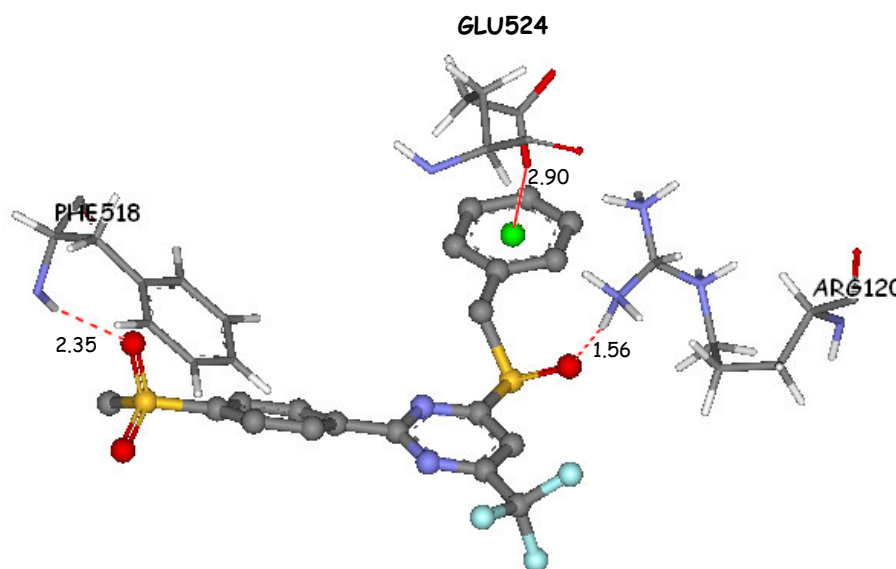


Figura 4.2.12 Pirimidina **11** no sítio de ligação da ciclooxigenase 1. Ligações de hidrogênio entre o ligante e os resíduos Arg120 e Phe518 (tracejado vermelho). Interação entre o carboxilato do Glu524 e um sistema π do composto (linha vermelha). Centróide indicada em verde. Distâncias de interação em Å. Os hidrogênios do ligante foram removidos para simplificar a representação.

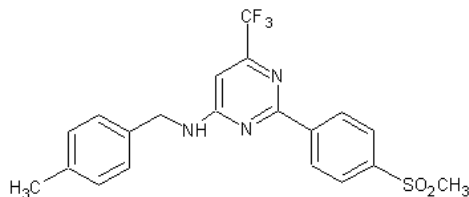
Tabela 4.2.12 Interações medidas para a pirimidina **11** em complexo com a ciclooxigenase 1

Átomos do ligante	Distância (Å)	Átomos da Proteína	Átomos do ligante	Distância (Å)	Átomos da Proteína
H1b	2.316	OE1/Gln192	N2	2.929	HH/Tyr355
H1c	2.996	OE1/Gln192	N2	3.160	HE1/Tyr355
H1c	2.194	O/Ser353	F1	2.192	HG12/Val349
S1	3.053	O/Leu352	F1	2.944	HD12/Leu531
S1	3.047	H/Ile517	F2	2.350	HG12/Val349
S1	2.707	HG23/Ile517	F3	2.590	HD12/Leu531
O1	3.022	HD12/Ile523	F3	2.786	HA/Ala527
O1	2.806	HB1/Ser516	F3	3.085	HB/Ala527
O1	3.077	O/Phe518	S2	3.019	HH13/Arg120
O1	2.998	HD2/Phe518	S2	3.197	OH/Tyr355
O1	2.353	H/Phe518	S2	2.694	HH/Tyr355
O1	2.929	H/Ile517	O3	2.599	HD1/Arg120
O1	2.461	HG23/Ile517	O3	3.085	HH11/Arg120
O2	2.038	O/Leu352	O3	1.564	HH13/Arg120
O2	2.990	HE21/Gln192	O3	2.563	NH1/Arg120
O2	2.598	OE1/Gln192	O3	2.996	HH12/Arg120
O2	2.653	H/Ile517	H12a	3.083	NH1/Arg120
O2	2.989	HG22/Ile517	H12b	2.663	OH/Tyr355
O2	1.928	HG23/Ile517	H15	2.153	O/Pro86
H3	2.741	O/Ser353	H18	3.127	NE/Arg120
H4	2.183	OH/Tyr355	H18	2.952	NH1/Arg120
H7	3.087	O/Leu352	H18	3.033	NH2/Arg120
N2	3.063	HG21/Ile523	H18	3.196	OE1/Glu524
N2	3.087	HG23/Ile523	Centróide C13-C18	2.895	OE1/Glu524
N2	2.494	OH/Tyr355			

O composto **10** e seu análogo **11** se complexaram de maneira parecida no sítio de ligação COX-1. Ambos formaram ligações de H com Phe518 e mostraram padrões bem semelhantes de interação no sítio da ciclooxigenase 1 (Tabelas 4.2.11 e 4.2.12).

Uma diferença entre o ligante **10** e seu análogo **11** foi que o primeiro manteve a ligação de hidrogênio com a Ile517 e o **11**, por sua vez, forma uma ligação de hidrogênio com a Arg120 (Figuras 4.2.11 e 4.2.12). Outra diferença foi que a pirimidina **11** faz um maior número de interações com a Arg120 do que o ligante **10** (Tabelas 4.2.11 e 4.2.12).

Entre os derivados pirimidínicos **10** e **11** o que melhor se complexou a COX-1 foi o primeiro, pois teve um padrão mais definido no sítio, além de manter as ligações de hidrogênio com Ile517 e Phe518 (Figura 4.2.11), visto que essas ligações de hidrogênio têm se mostrado essenciais para o complexo entre as pirimidinas estudadas e o sítio de ligação da ciclooxigenase 1.

- PIRIMIDINA 12

A pirimidina **12** se liga ao sítio da ciclooxigenase 1 com o grupo SO_2Me no bolso lateral (Gln192, Ser516, Ile517, Phe518 e Ile523) formando ligações de hidrogênio com os resíduos Ile517 e Phe518 (Figura 4.2.13). O grupo metoxi do anel indol de inibidores da família das indometacinas etanolamidas também se encontra neste bolso lateral da COX-1 (HARMAN *et al.*, 2007). O anel fenila do ligante **12** ligado ao grupo SO_2Me interage com a Leu352, Ser353 e Tyr355. O N1 pirimidínico está próximo a Val349 e a porção CF_3 faz interações com a Val349, Ala527, Ser530 e Leu531. Tais resíduos formam o bolso de migração do O_2 para formação de prostaglandinas a partir do substrato ácido araquidônico (MALKOWSKI *et al.*, 2000). O H ligado ao N3 interage com a Tyr355 e a porção 4-metilfenila faz interações com a Arg120 na entrada do sítio, inclusive uma interação cátion- π com este resíduo. Na Tabela 4.2.13 estão as interações do composto **12** com a COX-1.

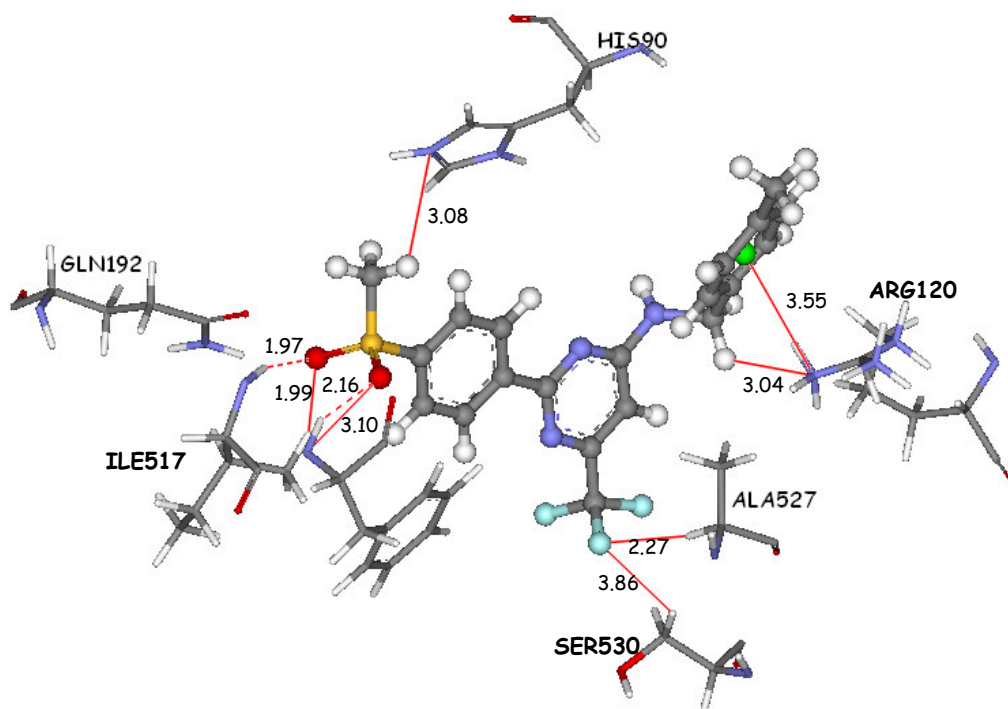
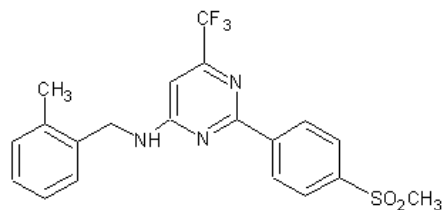


Figura 4.2.13 Ligante **12** no sítio da ciclooxigenase 1. Algumas interações do sítio estão representadas em linhas vermelhas e as ligações de hidrogênio em tracejado vermelho. Distâncias de interação em Å e o centróide está em verde.

Tabela 4.2.13 Interações medidas para a pirimidina **12** em complexo com a ciclooxigenase 1

Átomos do ligante	Distância (Å)	Átomos da Proteína	Átomos do ligante	Distância (Å)	Átomos da Proteína
H1a	2.555	OG/Ser516	O2	2.737	O/Leu352
H1b	2.529	O/Ser353	H3	2.835	O/Leu352
H1c	3.083	NE2/His90	H6	2.713	OH/Tyr355
S1	2.796	HG23/Ile517	H7	3.093	O/Ser353
S1	2.899	H/Ile517	N1	3.084	HG11/Val349
S1	3.097	HB1/Ser516	F1	2.751	HG/Leu531
O1	2.714	HG23/Ile517	F1	2.534	HA/Ala527
O1	2.964	H/Ile517	F1	2.883	H/Ala527
O1	2.462	HB1/Ser516	F1	2.865	HB1/Ser530
O1	2.158	H/Phe518	F2	2.233	HG/Val349
O1	3.095	N/Phe518	F2	2.823	H12/Val349
O1	2.681	O/Phe518	F2	2.222	HG23/Val349
O1	2.883	HD2/Phe518	F2	2.805	HG22/Val349
O1	2.802	HD12/Ile523	F3	2.273	HA/Ala527
O2	3.184	HA/Ser516	F3	2.865	HB2/Ser530
O2	2.136	OE1/Gln192	H1N3	2.746	Tyr355/ HE1
O2	1.969	H/Ile517	H12b	3.044	NH1/Arg120
O2	2.945	N/Ile517	H15	2.990	OE1/Arg120
O2	3.189	HB/Ile517	H20b	2.408	OE1/Arg120
O2	1.993	HG23/Ile517	Centróide C13-C18	3.547	NH1/Arg120

- PIRIMIDINA 13

O composto **13** se orienta com a porção SO_2Me no bolso lateral formando ligações de hidrogênio com a Ile517 e Phe518 (Figura 4.2.14). Interações com resíduos do bolso lateral já foram descritas para inibidores da família das indometacinas etanolamidas (HARMAN *et al.*, 2008). O N1 pirimidínico está próximo a Val349 e o grupo CF_3 faz interações com a Val349, Leu352, Ala527, Ser530 e Leu531. Os resíduos Val349, Ala527, Ser530 e Leu531 compõem o bolso de migração do O_2 para formação de prostaglandinas a partir do ácido araquidônico (MALKOWSKI *et al.*, 2000). O N3 amina interage com a Tyr355. A porção 2-metilfenila faz interações com os aminoácidos carregados Arg120 e Glu524 na entrada do sítio, inclusive uma interação cátion- π com a Arg120 (Figura 4.2.14). As interações do complexo **13**-COX-1 são apresentadas na Tabela 4.2.14.

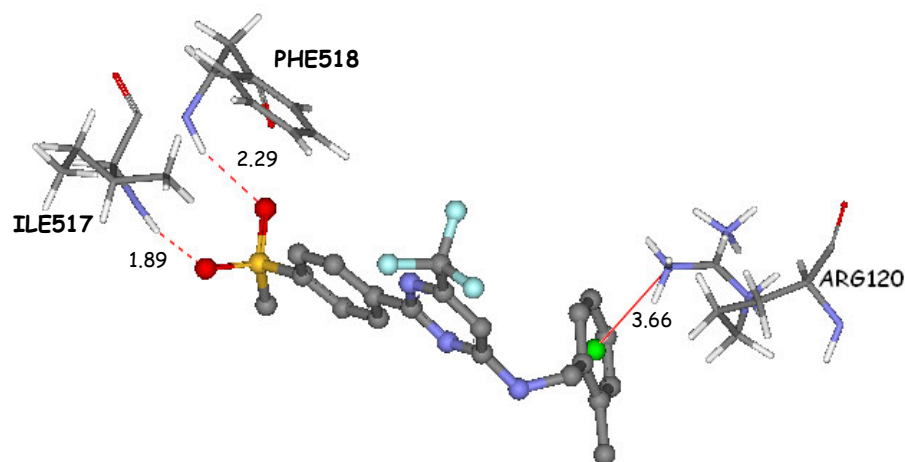
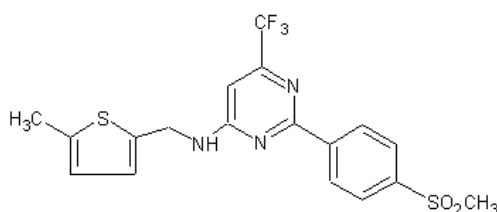


Figura 4.2.14 Ligações de hidrogênio (tracejado vermelho) e interação cátion- π (linha vermelha) para a pirimidina **13** no sítio de ligação da ciclooxigenase 1. Distâncias de interação em Å e centróide em verde.

Tabela 4.2.14 Interações medidas para a pirimidina **13** em complexo com a ciclooxigenase 1

Átomos do ligante	Distância (Å)	Átomos da Proteína	Átomos do ligante	Distância (Å)	Átomos da Proteína
H1a	2.449	O/Ser353	H3	2.895	O/Ser353
H1b	2.867	NE2/His90	H4	2.695	OH/Tyr355
H1c	2.509	OG/Ser516	H7	2.750	O/Leu352
S1	2.953	HG23/Ile523	N1	2.881	HG11/Val349
S1	2.910	H/Ile517	S1	2.182	HA/Ala527
S1	3.013	HB/Ser516	F1	2.819	HB2/Ser530
O1	2.668	HD12/Ile523	F2	3.194	HA/Ala527
O1	3.065	HD2/Phe518	F2	2.958	HB1/Ser530
O1	2.683	O/Phe518	F2	3.174	HG/Leu531
O1	2.294	H/Phe518	F2	2.869	HG12/Val349
O1	2.921	HG23/Ile523	F3	3.138	HG22/Val349
O1	2.993	H/Ile517	F3	3.191	HG12/Val349
O1	2.264	HB1/Ser516	F3	2.707	HD1/Leu352
O2	2.867	O/Leu352	N3	2.661	HE1/Tyr355
O2	2.121	HG23/Ile517	H16	2.962	OE1/Glu524
O2	2.040	OE1/Gln192	H17	2.621	OE1/Glu524
O2	1.887	H/Ile517	H18	2.805	NH1/Arg120
O2	2.874	N/Ile517	Centróide C13-C18	3.662	NH1/Arg120
O2	2.997	HA/Ser516			

As pirimidinas **12** e **13** se orientam de maneira semelhante no sítio de ligação da ciclooxigenase 1, apresentando *score* de *fitness* próximos (-68,15 para **12** e -66,13 para **13**, valores em kcal/mol). Ambas fazem ligações de hidrogênio com os resíduos Ile517 e Phe518 do bolso lateral e fazem uma interação cátion- π com a Arg120 na entrada do sítio. Além disso, tais compostos apresentam o N1 pirimidínico próximo a Val349 e o grupamento amina interagindo com a Tyr355.

- PIRIMIDINA 14

A pirimidina **14** se liga ao sítio da ciclooxigenase 1 com a porção SO₂Me no bolso lateral (Gln192, Ser516, Ile517, Phe518 e Ile523) fazendo ligações de hidrogênio com os resíduos Ile517 e Phe518 (Figura 4.2.15). O grupo metoxi do anel indol de inibidores da família das indometacinas etanolamidas aponta contra o bolso lateral (HARMAN *et al.*, 2008). O anel fenila do ligante **14** interage com a Leu352, Ser353 e Tyr355 e o N1 está próximo a Val349. O grupo CF₃ faz interações com a Val349, Leu352, Ala527, Ser530 e Leu531. Os aminoácidos Val349, Ala527, Ser530 e Leu531 compõem um bolso de migração do O₂ para formação de prostaglandinas a partir do ácido araquidônico (MALKOWSKI *et al.*, 2000). O N3 amina interage com a Tyr355 e o anel tiofenila com uma metila na posição 2 faz interações com a Arg120, Ile523 e Glu524. Além disso, o anel tiofenila faz uma interação cátion- π com a Arg120 (Figura 4.2.15). Na Tabela 4.2.15 são mostradas as interações do complexo entre o ligante **14** e a ciclooxigenase 1.

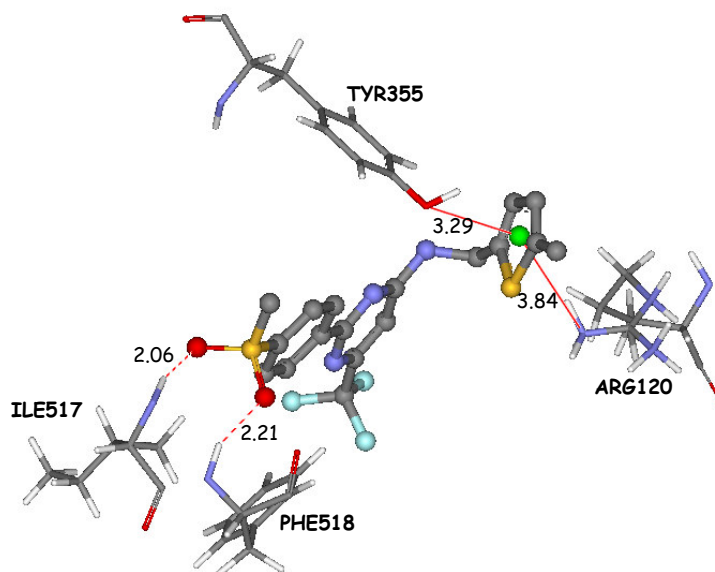
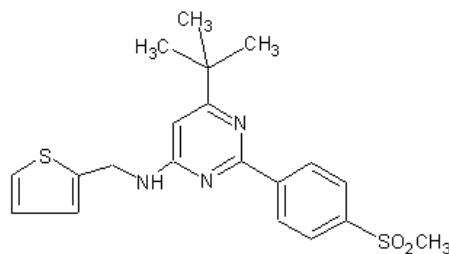


Figura 4.2.15 Ligante **14** no sítio de ligação da ciclooxigenase 1. Algumas interações em linhas vermelhas e as ligações de hidrogênio estão em tracejado vermelho. Centróide em verde e distâncias de interação em Å.

Tabela 4.2.15 Interações medidas para a pirimidina **14** em complexo com a ciclooxigenase 1

Átomos do ligante	Distância (Å)	Átomos da Proteína	Átomos do ligante	Distância (Å)	Átomos da Proteína
H1a	2.536	OG/Ser516	H4	2.809	OH/Tyr355
H1b	2.549	O/Ser353	H7	2.846	O/Leu352
H1c	3.176	NE2/His90	N1	2.817	HG11/Val349
O1	3.195	HG12/Ile523	F1	2.184	HA/Ala527
O1	2.802	HD12/Ile523	F1	2.596	HB2/Ser530
O1	2.805	HD2/Phe518	F2	2.900	HD1/Leu352
O1	2.732	O/Phe518	F2	2.493	HG11/Val349
O1	2.601	HB1/Ser516	F3	3.061	HA/Ala527
O1	3.127	N/Phe518	F3	3.031	HG/Leu531
O1	2.207	H/Phe518	F3	2.578	HB1/Ser530
O1	3.035	H/Ile517	F3	3.120	HG22/Val349
O1	2.678	HG23/Ile517	N3	3.003	HE1/Tyr355
O2	3.194	HA/Ser516	H12b	3.136	NH1/Arg120
O2	3.038	N/Ile517	S2	2.574	HH13/Arg120
O2	2.059	H/Ile517	S2	2.954	HG23/Ile523
O2	2.160	OE1/Gln192	H18b	2.734	OE1/Glu524
O2	2.089	HG23/Ile517	H18c	2.643	OE1/Glu524
O2	2.702	O/Leu352	Centróide C13-S	3.290	OH/Tyr355
H3	3.101	O/Ser353	Centróide C13-S	3.844	NH1/Arg120

- PIRIMIDINA 16

O composto **16** se liga ao sítio da ciclooxigenase 1 com o grupo SO_2Me no bolso lateral (His90, Gln192, Ser516, Ile517, Phe518 e Ile523) formando ligações de hidrogênio com os aminoácidos Ile517 e Phe518 (Figura 4.2.16). O grupo metoxi do anel indol de inibidores da família das indometacinas etanolamidas também formam interações com resíduos do bolso lateral (HARMAN *et al.*, 2008). O anel fenila do ligante **16** está próximo a Leu352, Ser353 e Tyr355. O N2 pirimidínico interage com a Val349 e Leu352. O N3 amina interage com a Val349 e o anel tiofenila faz interações com a Met522 e Ser530. Na Tabela 4.2.16 estão as interações do complexo **16**-COX-1.

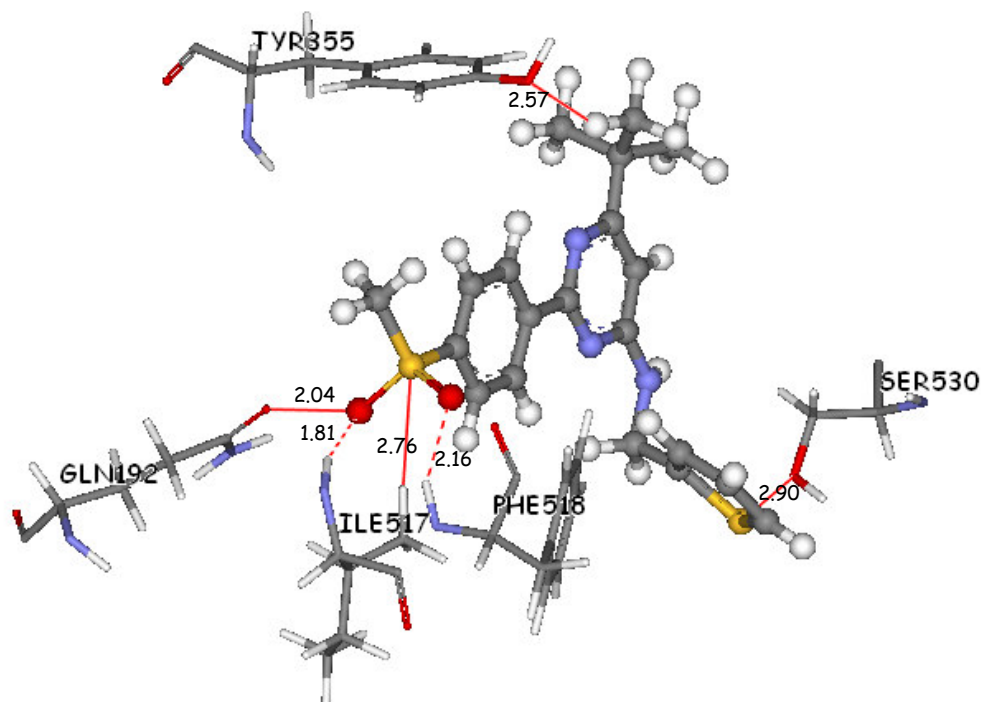
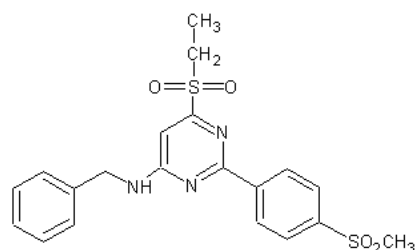


Figura 4.2.16 Pirimidina **16** no sítio da ciclooxigenase 1. Algumas interações do sítio em linhas vermelhas e em tracejado vermelho as ligações de hidrogênio com a Ile517 e Phe518. Distâncias de interação em Å.

Tabela 4.2.16 Interações medidas para a pirimidina **16** em complexo com a ciclooxigenase 1

Átomos do ligante	Distância (Å)	Átomos da Proteína	Átomos do ligante	Distância (Å)	Átomos da Proteína
H1a	2.448	O/Ser353	O2	1.813	H/Ile517
H1b	3.149	NE2/His90	O2	2.788	N/Ile517
H1c	2.590	OG/Ser516	O2	3.045	HA/Ser516
S1	2.759	HG23/Ile517	H3	3.099	O/Ser353
S1	3.070	HB1/Ser516	H4	3.129	OH/Tyr355
O1	2.787	HG23/Ile517	H7	2.825	O/Leu352
O1	2.160	H/Phe518	N2	2.766	HD21/Leu352
O1	2.838	HD2/Phe518	N2	2.629	HG11/Val349
O1	2.608	O/Phe518	H19c	2.618	OH/Tyr355
O1	2.434	HB1/Ser516	N3	2.728	HG11/Val349
O1	2.732	HD12/Ile523	S2	2.904	OG/Ser530
O2	2.908	O/Leu352	S2	2.634	HG/Ser530
O2	1.962	HG23/Ile517	H15	2.659	O/Met522
O2	2.122	OE1/Gln192			

- PIRIMIDINA 19



O ligante **19** forma complexo com a ciclooxigenase 1 com a porção SO₂Me no bolso lateral interagindo com os resíduos His90, Gln192, Ser516, Ile517, Phe518 e Ile523, inclusive formando ligações de hidrogênio com a Ile517 e Phe518 (Figura 4.2.17). Interações com resíduos do bolso foram descritas para inibidores da família das indometacinas etanolamidas (HARMAN *et al.*, 2008). O N1 pirimidínico está próximo a Val349 e o grupo SO₂Et faz interações com a Val349, Gly526, Ala527 e Ser530. Os aminoácidos Val349, Ala527 e Ser530 fazem parte do bolso de migração de O₂ para formação de prostaglandinas a partir do substrato ácido araquidônico (MALKOWSKI *et al.*, 2000). O N3 amina interage com a Tyr355 e o anel fenila mais distante da porção SO₂Me faz interações com a Arg120, Tyr355 e Glu524. As interações do complexo entre o ligante **19** a ciclooxigenase 1 são apresentadas na Tabela 4.2.17.

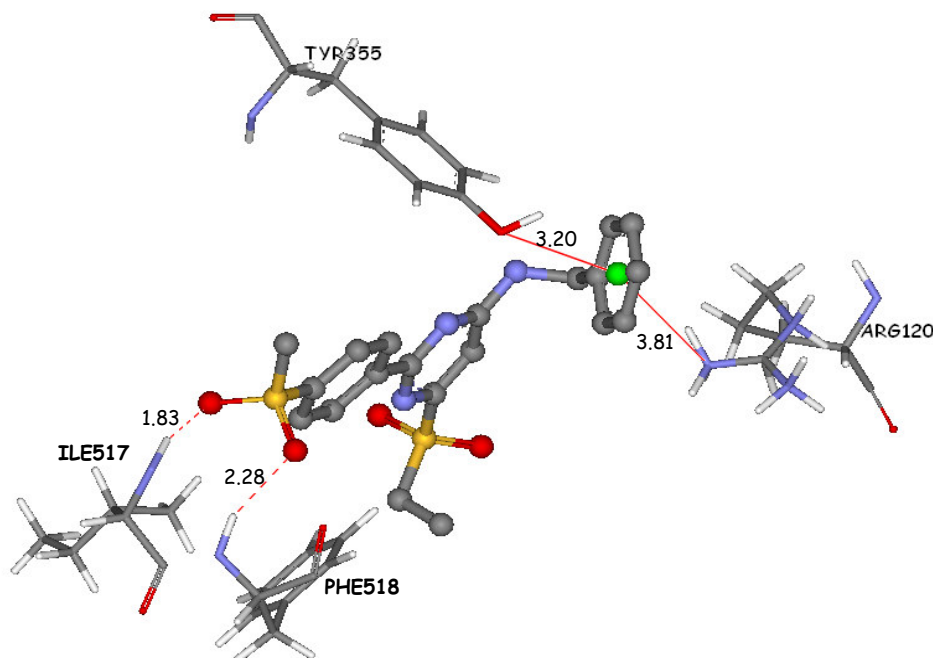


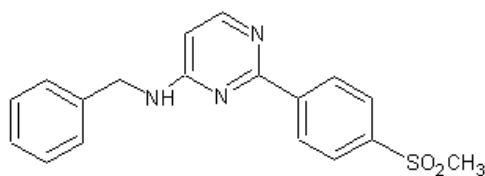
Figura 4.2.17 Pirimidina **19** no sítio da ciclooxigenase 1. As ligações de hidrogênio estão em tracejado vermelho e as interações com o anel fenila em linhas vermelhas. Distâncias de interação em Å e centróide representado em verde. Os hidrogênios do ligante foram removidos para facilitar a compreensão.

Tabela 4.2.17 Interações medidas para a pirimidina **19** em complexo com a ciclooxigenase 1

Átomos do ligante	Distância (Å)	Átomos da Proteína	Átomos do ligante	Distância (Å)	Átomos da Proteína
H1a	2.415	O/Ser353	H7	3.090	O/Ser353
H1b	2.899	NE2/His90	N1	2.955	HG11/Val349
H1c	2.575	OG/Ser516	S2	3.132	HG11/Val349
S1	2.897	H/Ile517	S2	3.031	HA/Ala527
S1	2.920	HG23/Ile517	O3	2.319	HG22/Val349
O1	2.255	HB1/Ser516	O3	1.887	HG23/Val349
O1	2.632	HD12/Ile523	O4	1.969	HA/Ala527
O1	2.630	O/Phe518	O4	2.092	HB2/Ser530
O1	3.023	HD2/Phe518	H19b	2.873	OG/Ser530
O1	2.281	H/Phe518	H20b	2.779	O/Gly526
O1	2.952	HG23/Ile517	H20b	2.487	N/Ala527
O2	2.929	O/Leu352	N3	2.956	HE1/Tyr355
O2	2.077	OE1/Gln192	H12b	3.189	NH1/Arg120
O2	2.975	HA/Ser516	H17	2.725	OE1/Glu524
O2	1.827	H/Ile517	H18	2.919	NH1/Arg120
O2	2.809	N/Ile517	Centróide C13-C18	3.807	NH1/Arg120
H3	2.704	O/Leu352	Centróide C13-C18	3.200	OH/Tyr355

A formação de complexo entre o composto **19** e o sítio da ciclooxigenase 1 se mostrou favorável com um *score* de *fitness* de -72,00 kcal/mol. Esta pirimidina apresentou um bom padrão de ligação no sítio, formando ligações de hidrogênio entre sua porção SO₂Me e os resíduos Ile517 e Phe518, além do grupo SO₂Et fazer várias interações favoráveis com os aminoácidos Val349, Ala527, Gly526 e Ser530. Também pode ser observada uma interação cátion- π com a Arg120 na entrada do sítio.

- PIRIMIDINA 21



O ligante **21** se complexa ao sítio da ciclooxigenase 1 com sua porção SO₂Me no bolso lateral (His90, Gln192, Ser516, Ile517, Phe518 e Ile523) formando ligações de hidrogênio com os resíduos Ile517 e Phe518 (Figura 4.2.18). Os inibidores da família das indometacinas etanolamidas também interagem com resíduos do bolso lateral (HARMAN *et al.*, 2008). O anel fenila ligado à porção SO₂Me faz interações com Leu352, Ser353 e Tyr355. O N1 pirimidínico e o N3 amina interagem com a Val349 e Tyr355 respectivamente. Além disso, há uma interação cátion- π entre o ligante **21** e a Arg120. Este mesmo sistema π também faz uma interação com o OH da Tyr355. As interações do complexo entre a pirimidina **21** e a ciclooxigenase 1 são apresentadas na Tabela 4.2.18.

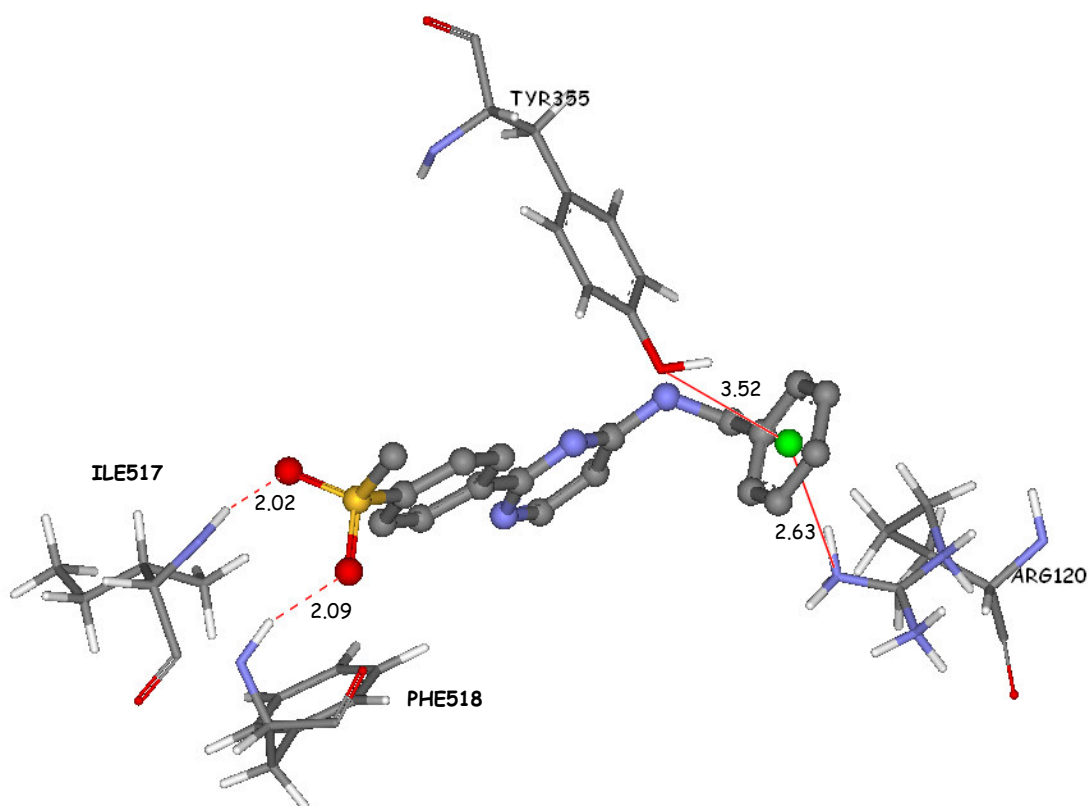
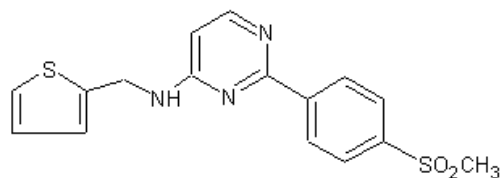


Figura 4.2.18 Composto **21** no sítio da ciclooxygenase 1. Interações em linhas vermelhas e ligações de hidrogênio em tracejado vermelho. Distâncias de interação em Å e centróide em verde. Hidrogênios dos ligantes não representados para facilitar compreensão.

Tabela 4.2.18 Interações medidas para a pirimidina **21** em complexo com a ciclooxygenase 1

Átomos do ligante	Distância (Å)	Átomos da Proteína	Átomos do ligante	Distância (Å)	Átomos da Proteína
H1a	2.437	OG/Ser516	O2	2.070	OE1/Gln192
H1b	2.648	O/Ser353	O2	2.132	HG23/Ile517
H1c	3.177	NE2/His90	O2	2.722	O/Leu352
S1	3.111	HB1/Ser516	H3	2.984	O/Ser353
S1	2.796	HG23/Ile517	H4	2.882	OH/Tyr355
O1	2.910	HD12/Ile523	H7	2.950	O/Leu352
O1	2.538	HB1/Ser516	N1	3.018	HG11/Val349
O1	2.717	O/Phe518	N3	2.897	HE1/Tyr355
O1	2.593	HG23/Ile517	H14	2.790	NH1/Arg120
O1	2.091	H/Phe518	H15	2.629	OE1/Glu524
O2	3.129	HA/Ser516	Centróide C13-C18	3.627	NH1/Arg120
O2	2.017	H/Ile517	Centróide C13-C18	3.522	OH/Tyr355

- PIRIMIDINA 22

A pirimidina **22** se liga a COX-1 com seu grupo SO_2Me no bolso lateral formando ligações de hidrogênio com os resíduos Ile517 e Phe518 (Figura 4.2.19). Interações com aminoácidos do bolso lateral são essenciais para a formação de complexo entre inibidores da família das indometacinas etanolamidas e o sítio de ligação da ciclooxygenase 1 (HARMAN *et al.*, 2008). O anel fenila interage com a Leu352, Ser353 e Tyr355 e o N2 pirimidínico está próximo a Val349. O N3 amina faz interações com a Val349 e Ala527 e o anel tiofenila interage com os aminoácidos Met522 e Ser530. Os resíduos Val349, Ala527 e Ser530 compõem um bolso de migração do O_2 para formação de prostaglandinas a partir do ácido araquidônico (MALKOWSKI *et al.*, 2000). Na Tabela 4.2.19 estão as interações do complexo entre a pirimidina **22** e a ciclooxygenase 2.

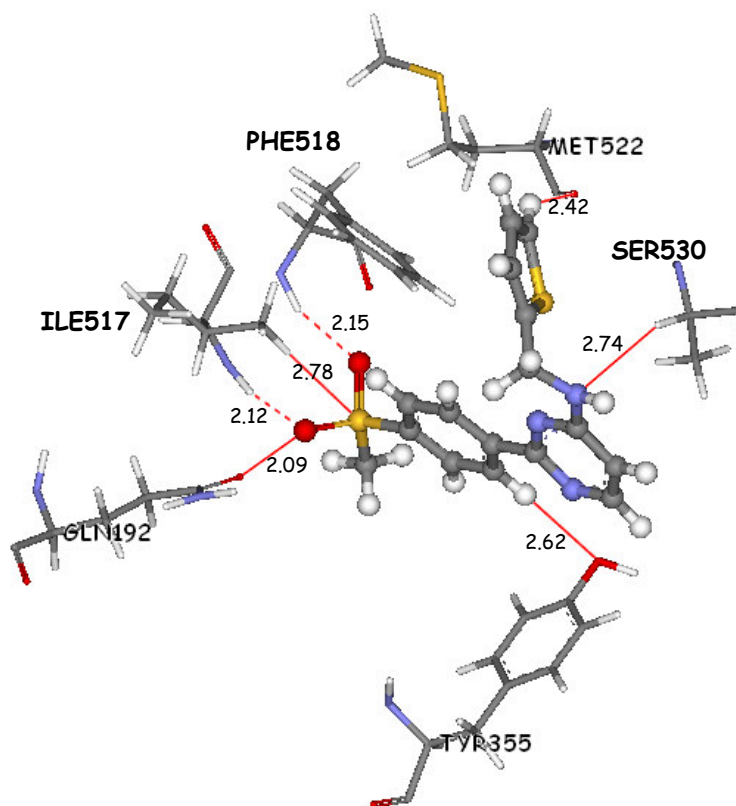
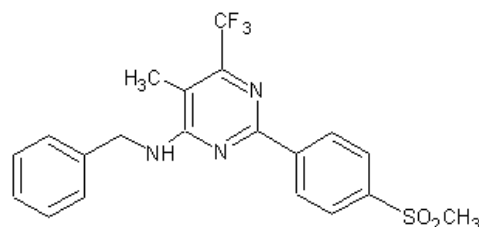


Figura 4.2.19 Ligante **22** no sítio de ligação da COX-1. As interações ligante-enzima estão em linhas vermelhas e as ligações de hidrogênio em tracejado vermelho.

Tabela 4.2.19 Interações medidas para a pirimidina **22** em complexo com a ciclooxigenase 1

Átomos do ligante	Distância (Å)	Átomos da Proteína	Átomos do ligante	Distância (Å)	Átomos da Proteína
H1a	3.151	NE2/His90	O2	2.100	HG23/Ile517
H1b	2.565	OG/Ser516	O2	2.558	O/Leu352
H1c	2.547	O/Ser353	H3	3.042	O/Ser353
S1	2.782	HG23/Ile517	H4	2.617	OH/Tyr355
O1	2.587	HB1/Ser516	H7	2.757	O/Leu352
O1	2.538	HG23/Ile517	N2	3.088	HG11/Val349
O1	2.958	HD12/Ile523	N3	3.153	HG11/Val349
O1	2.826	O/Phe518	N3	2.745	HA/Ala527
O1	2.149	H/Phe518	H14	2.756	OG/Ser530
O2	2.122	H/Ile517	H16	2.424	O/Met522
O2	2.091	OE1/Gln192			

- PIRIMIDINA 24

O composto **24** se liga a ciclooxigenase 1 com a porção SO₂Me no bolso lateral e forma ligações de hidrogênio com a Ile517 e Phe518 (Figura 4.2.20). Interações com aminoácidos do bolso lateral foram descritas para inibidores da família das indometacinas etanolamidas (HARMAN *et al.*, 2008). O anel fenila ligado ao grupo SO₂Me interage com Leu352, Ser353 e Tyr355. O N2 pirimidínico está próximo a Tyr355 e o grupo CF₃ faz interações com a Val349, Ala527 e Leu531. Os aminoácidos Val349, Ala527 e Leu531 fazem parte do bolso de migração do O₂ para formação de prostaglandinas a partir do ácido araquidônico (MALKOWSKI *et al.*, 2000). O N3 amina do ligante **24** interage com a Tyr355 e o anel fenila faz interações com Pro86, His90, Arg120, Tyr355 e Glu524. As interações do complexo entre a pirimidina **24** e a ciclooxigenase 1 são apresentadas na Tabela 4.2.20.

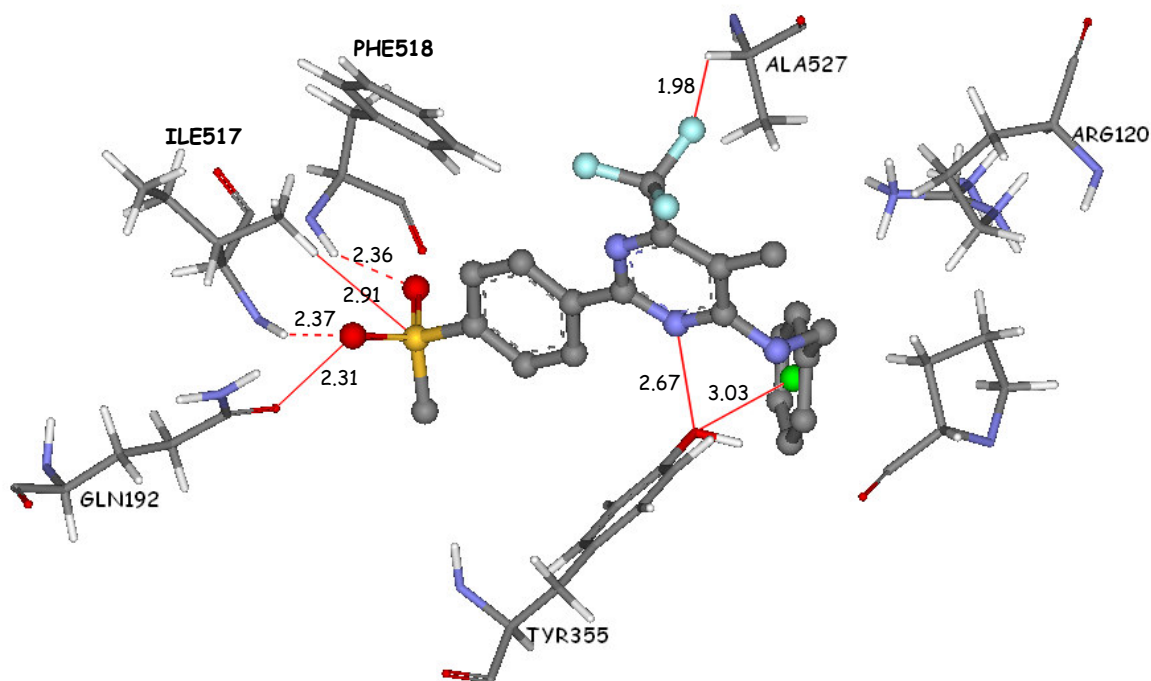


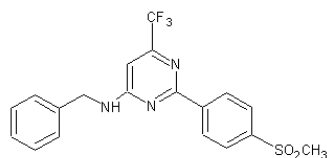
Figura 4.2.20 Pirimidina **24** no sítio de ligação da ciclooxigenase 1. Estão representadas algumas interações enzima-ligante em linhas vermelhas e em tracejado vermelho estão as ligações de hidrogênio com os resíduos Ile517 e Phe518 do bolso lateral. Distâncias de interação em Å e centróide em verde.

Tabela 4.2.20 Interações medidas para a pirimidina **24** em complexo com a ciclooxigenase 1

Átomos do ligante	Distância (Å)	Átomos da Proteína	Átomos do ligante	Distância (Å)	Átomos da Proteína
H1a	2.551	O/Ser353	H6	2.159	OH/Tyr355
H1b	3.066	NE2/His90	H7	3.030	O/Ser353
H1b	3.166	OG/Ser516	N2	2.676	OH/Tyr355
H1c	3.094	OE1/Gln192	F1	2.081	HG11/Val349
H1c	2.651	OG/Ser516	F2	1.977	HA/Ala527
S1	2.909	HG23/Ile517	F2	2.928	HG/Leu531
O1	2.829	HD12/Ile523	F3	2.037	HG12/Val349
O1	2.712	HB1/Ser516	F3	2.669	HD22/Leu531
O1	2.896	HD2/Phe518	N3	2.555	HE1/Tyr355
O1	2.357	H/Phe518	H12b	2.421	NH1/Arg120
O1	2.645	HG23/Ile517	H14	2.566	OH/Tyr355
O2	2.113	HG23/Ile517	H15	2.980	N/His90
O2	2.371	H/Ile517	H16	3.177	O/Pro86
O2	2.311	OE1/Gln192	H17	3.121	OE1/Glu524
O2	2.369	O/Leu352	H18	2.854	OE1/Glu524
H3	2.885	O/Leu352	Centróide C13-C18	3.031	OH/Tyr355

ANEXO B

O anexo B apresenta a descrição completa das interações e figuras correspondentes, assim como as tabelas de interações medidas para as pirimidinas estudadas e os resíduos da COX-2.

- PIRIMIDINA 1

A pirimidina **1** se liga à COX-2 com sua porção SO₂Me interagindo com resíduos do bolso lateral, formando ligações de hidrogênios com a His90 e Arg513 (Figura 4.3.1). As porções sulfonamidas do inibidor SC-558 (KURUMBAIL *et al.*, 1996) e de um análogo piridínico da nimesulida (MICHAUX *et al.*, 2005) também formam ligações de hidrogênio com a His90 e Arg513. O anel fenila ligado ao SO₂Me interage com a His90, Leu352 e Tyr355. O N1 pirimidínico está próximo a Tyr355 e o N2 pirimidínico interage com a Val349. O grupo CF₃ faz interações com a Arg120 e forma uma ligação de hidrogênio com a Tyr355 (Figura 4.3.1). Ligações de hidrogênio com a Tyr355 já foram descritas para o substrato ácido araquidônico (KIEFER *et al.*, 2000) e para o flurbirprofeno (KURUMBAIL *et al.*, 1996) complexado com a COX-2. O N3 amina do composto **1** interage com a Ala527 e Ser530 e o anel fenila substituinte faz interações com a Tyr385, Met522, Val523 e Ala527.

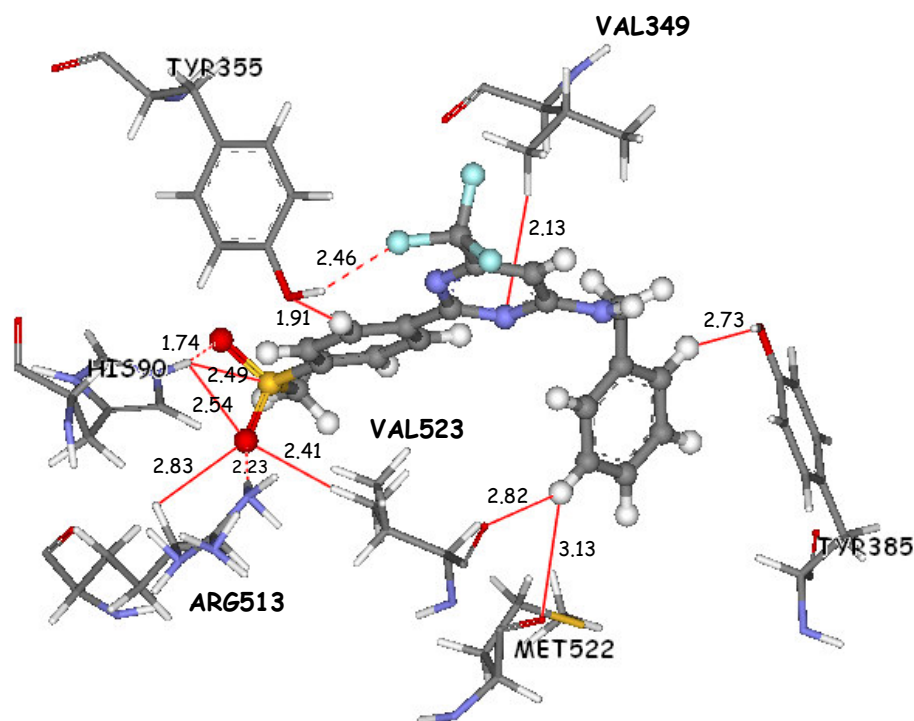


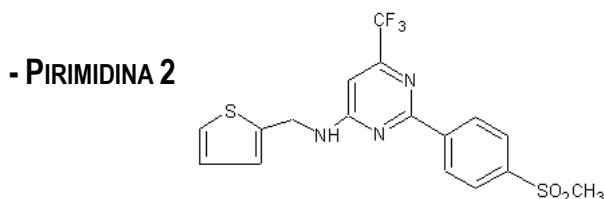
Figura 4.3.1 Pirimidina **1** no sítio da COX-2. Interações do sítio em linhas vermelhas e ligações de hidrogênio com a His90, Tyr355 e Arg513 em tracejado vermelho. Distâncias em Å.

Na Tabela 4.3.2 estão as interações do complexo entre a pirimidina **1** e a COX-2.

Tabela 4.3.2 Interações medidas para a pirimidina **1** em complexo com a ciclooxigenase 2

Átomos do ligante	Distância (Å)	Átomos da Proteína	Átomos do ligante	Distância (Å)	Átomos da Proteína
H1a	2.714	OE1/Gln192	H3	3.192	OH/Tyr355
H1a	3.137	N/Ile517	H4	1.914	OH/Tyr355
H1c	2.242	O/Leu352	H7	2.536	O/Leu352
H1c	2.961	OE1/Gln192	N1	3.054	HH/Tyr355
S1	2.486	HE2/His90	F1	2.913	NH1/Arg120
S1	3.021	Val523/HG22	F3	2.489	NH1/Arg120
O1	2.523	O/Ser353	F3	2.460	HH/Tyr355
O1	2.680	HE2/His90	H1N3	3.053	O/Ala527
O1	1.738	HE2/His90	N2	3.128	HG11/Val349
O2	2.535	HE2/His90	N3	2.342	HA/Ala527
O2	3.087	NE2/His90	N3	2.766	HB1/Ser530
O2	2.834	HD1/Arg513	H12a	2.881	OG/ Ser530
O2	2.688	HD2/Arg513	H15	2.848	N/Ala527
O2	2.234	HH11/Arg513	H15	2.818	O/Val523
O2	2.410	HG22/Val523	H15	3.131	O/Met522
H3	2.816	NE2/His90	H18	2.733	OH/Tyr385

O composto **1** tem grande probabilidade de inibir a ciclooxigenase 2, pois apresenta um padrão definido de ligação neste sítio e forma ligações de hidrogênio com resíduos do bolso lateral- His90 e Arg513 e com a Tyr355. Além disso, a pirimidina **1** faz várias interações favoráveis com os resíduos His90, Tyr355 e Arg513.



O ligante **2** orienta seu grupo SO₂Me no bolso lateral formando ligações de hidrogênio com a His90 e Arg513 (Figura 4.3.2). Ligações de hidrogênio com a His90 e Arg513 já foram descritas para o inibidor SC-558 (KURUMBAIL *et al.*, 1996) e um inibidor análogo piridínico da nimesulida (MICHAUX *et al.*, 2005). O anel fenila do composto **2** interage com a His90, Leu352 e Tyr355. O N1 e N2 pirimidínicos interagem com Tyr355 e Val349 respectivamente. A porção CF₃ faz várias interações com a Arg120, Tyr355 e Leu359, inclusive forma ligações de hidrogênio com a Arg120 e Tyr355 (Figura 4.3.2) na boca do sítio. Tanto o substrato ácido araquidônico como o flurbiprofeno (KURUMBAIL *et al.*, 1996) fazem ligações de hidrogênio com a Arg120 e Tyr355 (KIEFER *et al.*, 2000). O N3 amina do ligante **2** interage com os resíduos Ala527 e Ser530 e o anel tiofenila faz interações com a

Tyr385, Ala527 e com a hidroxila da Ser530, na parte mais alta do sítio. A Ser530 é o sítio de acetilação pela aspirina (SMITH, DEWITT E GARAVITO, 2000). Na Tabela 4.3.3 são apresentadas as interações do complexo 2-COX-2.

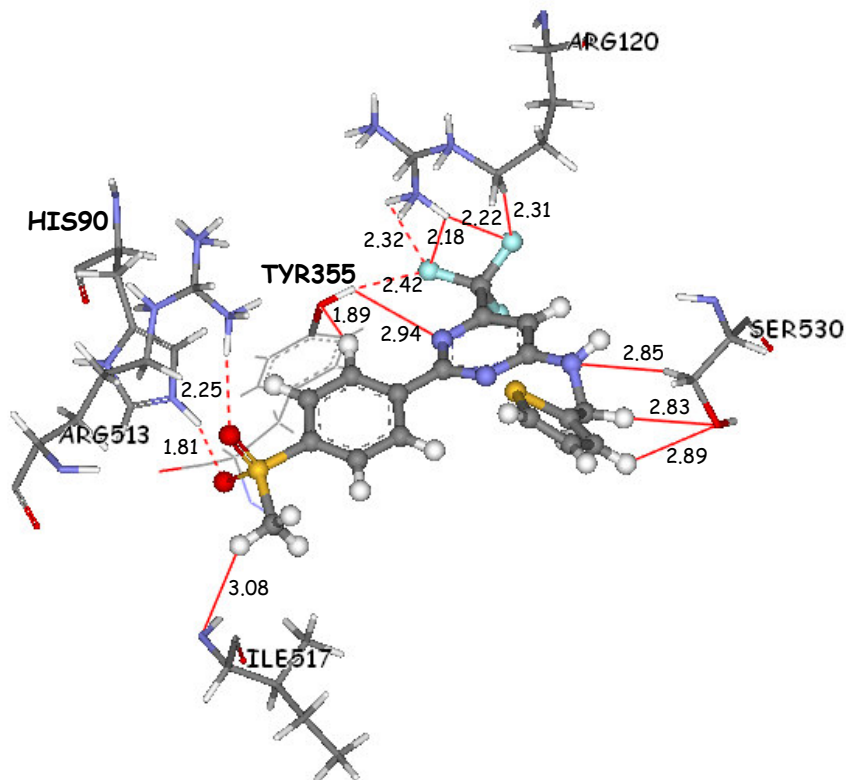


Figura 4.3.2 Ligante 2 no sítio da ciclooxigenase 2. São representados alguns aminoácidos e interações do sítio (linhas vermelhas) e ligações de hidrogênio (tracejado vermelho). Distâncias de interação em Å.

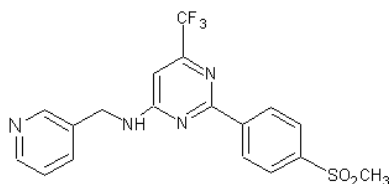
Tabela 4.3.3 Interações medidas para a pirimidina 2 em complexo com a ciclooxigenase 2

Átomos do ligante	Distância (Å)	Átomos da Proteína	Átomos do ligante	Distância (Å)	Átomos da Proteína
H1a	3.048	N/Ile517	F1	2.361	HH12/Arg120
H1a	2.689	OE1/Gln192	F1	2.600	NH1/Arg120
H1c	2.192	O/Leu352	F1	2.802	HH1/Arg120
S1	2.653	HE2/His90	F1	2.180	HH11/Arg120
S1	2.878	HG22/Val523	F2	2.217	HH11/Arg120
O1	2.703	O/Ser353	F2	3.108	NH1/Arg120
O1	1.807	HE2/ His90	F2	2.314	HD2/Arg120
O1	2.748	NE2/His90	F2	2.656	HB/Val116
O2	2.782	HE2/ His90	F3	2.968	HD12/Leu359
O2	2.958	HD1/Arg513	F3	2.857	HD11/Leu359
O2	2.248	HH11/Arg513	F3	2.889	HD22/Leu359
O2	2.649	HD2/Arg513	N3	2.854	HB1/Ser530
O2	2.165	HG22/Val523	N3	2.319	HA/Ala527
H3	2.596	O/Leu352	H1N3	2.885	O/Ala527
H6	1.886	OH/Tyr355	H12a	2.863	OG/Ser530
H7	2.798	NE2/His90	H14	2.887	OG/Ser530
N1	2.944	HH/Tyr355	H14	2.986	OH/Tyr385
N2	3.131	HG11/Val349	S2	2.685	HA/Ala527
F1	2.417	HH/Tyr355	S2	3.147	N/Ala527

Há grande probabilidade da formação do complexo entre a pirimidina **2** e a ciclooxigenase 2. Isto se deve ao fato desta pirimidina mostrar um padrão definido de ligação para o sítio da COX-2 (de 10 orientações geradas pelos cálculos, 9 formaram um grupo), formar ligações de hidrogênio com a His90, Arg120, Tyr355 e Arg513 e fazer várias interações favoráveis com a Arg120 (Tabela 4.3.3).

Os compostos **1** e **2** têm orientações muito semelhantes na ciclooxigenase 2 (Figuras 4.3.1 e 4.3.2) apresentando *scores* de -82,34 e -83,26 kcal/mol para **1** e **2** respectivamente. Ambos formam ligações de hidrogênio com os resíduos His90, Tyr355 e Arg513. O ligante **2** se complexou mais favoravelmente neste sítio, pois mostrou um melhor padrão de orientação no complexo com a COX-2, além de apresentar uma ligação de hidrogênio adicional com a Arg120 e um maior número de interações favoráveis com este mesmo resíduo.

- PIRIMIDINA 3



O composto **3** se complexa ao sítio da ciclooxigenase 2 com seu grupo SO₂Me no bolso lateral interagindo com os resíduos His90, Gln192, Arg513 e Val523. Além disso, há a formação de ligações de hidrogênio entre os oxigênios do grupo SO₂Me e os resíduos His90 e Arg513 (Figura 4.3.3). A sulfonamida do inibidor SC-558 (KURUMBAIL *et al.*, 1996) e a sulfonamida de um análogo piridínico da nimesulida (MICHAUX *et al.*, 2005) também formam ligações de hidrogênio com os aminoácidos His90 e Arg513 do bolso lateral. O anel fenila interage com a His90, Leu352, Ser353 e Tyr355. O N1 e N2 pirimidínicos interagem com a Tyr355 e Val349 respectivamente. A porção CF₃ próxima à junção da Arg120/Tyr355 (ROWLINSON *et al.*, 2003) faz várias interações com a Arg120 carregada e forma uma ligação de hidrogênio com a Tyr355 (Figura 4.3.3). Ligações de hidrogênio com o aminoácido Tyr355 já foram descritas para o substrato ácido araquidônico (KIEFER *et al.*, 2000) e para o flurbiprofeno (KURUMBAIL *et al.*, 1996). O N3 amina interage com a Ala527 e Ser530. O anel pirimidínico substituinte faz interações com os resíduos Tyr385, Trp387, Met522, Val523 e Ala527. Na Tabela 4.3.4 estão as interações medidas para o complexo **3**-COX-2.

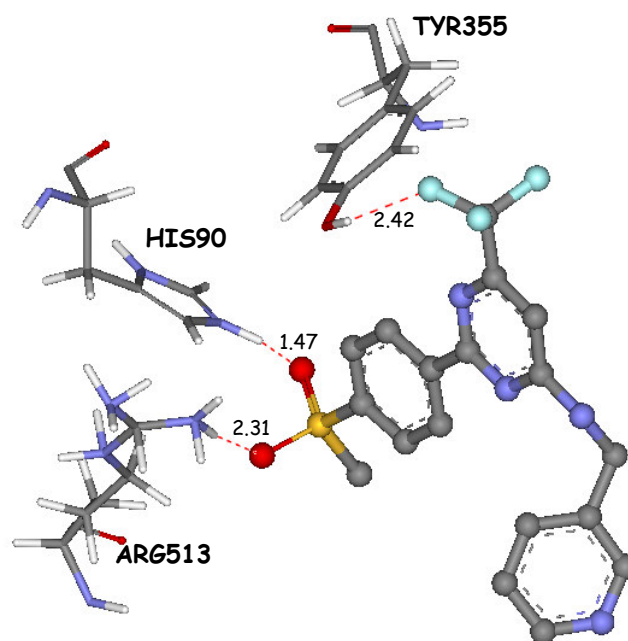
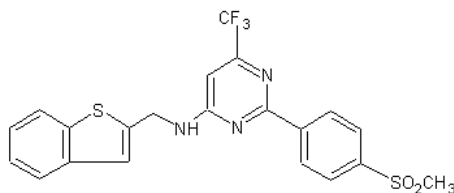


Figura 4.3.3 Pirimidina **3** no sítio de ligação da ciclooxigenase 2. Destaque para as ligações de hidrogênio (tracejado vermelho) que o ligante forma com os resíduos His90, Tyr355 e Arg513. Os hidrogênios do composto **3** não estão representados para facilitar a compreensão. Distâncias de interação em Å.

Tabela 4.3.4 Interações medidas para a pirimidina **3** em complexo com a ciclooxigenase 2

Átomos do ligante	Distância (Å)	Átomos da Proteína	Átomos do ligante	Distância (Å)	Átomos da Proteína
H1a	2.370	OE1/Gln192	N2	3.107	HG11/Val349
H1c	2.899	OE1/Gln192	F1	2.415	HH/Tyr355
H1c	2.300	O/Leu352	F1	2.079	HE2/Tyr355
S1	2.354	HE2/His90	F1	2.737	NH1/Arg120
S1	3.130	HG22/Val523	F1	2.230	HH11/Arg120
O1	1.474	HE2/His90	F2	3.104	HD23/Leu359
O1	2.373	NE2/His90	F2	3.012	HG12/Val349
O1	3.025	HE1/His90	F3	2.274	HD12/Leu531
O1	2.722	O/Ser353	F3	2.087	HD2/Arg120
O2	2.648	HE2/His90	F3	3.058	NH1/Arg120
O2	3.177	NE2/His90	N3	2.494	HA/Ala527
O2	2.314	HH11/Arg513	N3	2.920	HB1/Ser530
O2	2.761	HD1/Arg513	H12a	3.133	OG/Ser530
O2	2.590	HD2/Arg513	H14	2.557	OH/Tyr385
O2	3.161	HB2/Ala516	N4	2.644	HE2/Tyr385
O2	2.436	HG22/Val523	N4	2.976	HH2/Trp387
H3	3.034	O/Leu352	N4	2.807	HZ2/Tr387
H6	2.000	OH/Tyr355	H16	2.981	O/Met522
H7	2.698	NE2/His90	H16	3.158	O/Val523
H7	3.047	O/Ser353	H17	3.094	N/Ala527
N1	3.093	HH/Tyr355			

- PIRIMIDINA 4

O ligante **4** se dispõe no sítio da ciclooxigenase 2 com sua porção SO_2Me próximo a junção da Arg120/Tyr355 (ROWLINSON *et al.*, 2003) interagindo com os resíduos Val116, Arg120, Leu351 e Leu359. O N2 pirimidínico interage com a Ser353 e Val523. A porção CF_3 faz interações com Leu352, Trp387, Ala517, Phe518, Met522 e Gly526. O N3 amina está próximo a Leu352 e Ser353. O anel indol da indometacina também interage com a Leu352 e Ser353 no sítio da COX-2 (KURUMBAIL *et al.*, 1996). Os anéis fenila e tiofenila do composto **4** se encontram na região do bolso lateral e há a formação de uma ligação de hidrogênio entre o S2 do ligante e a Gln192, além de interações cátion- π entre a His90 e os anéis fenila e tiofenila (Figura 4.3.4). Na Tabela 4.3.5 são apresentadas as interações do complexo formado entre a pirimidina **4** e a ciclooxigenase 2.

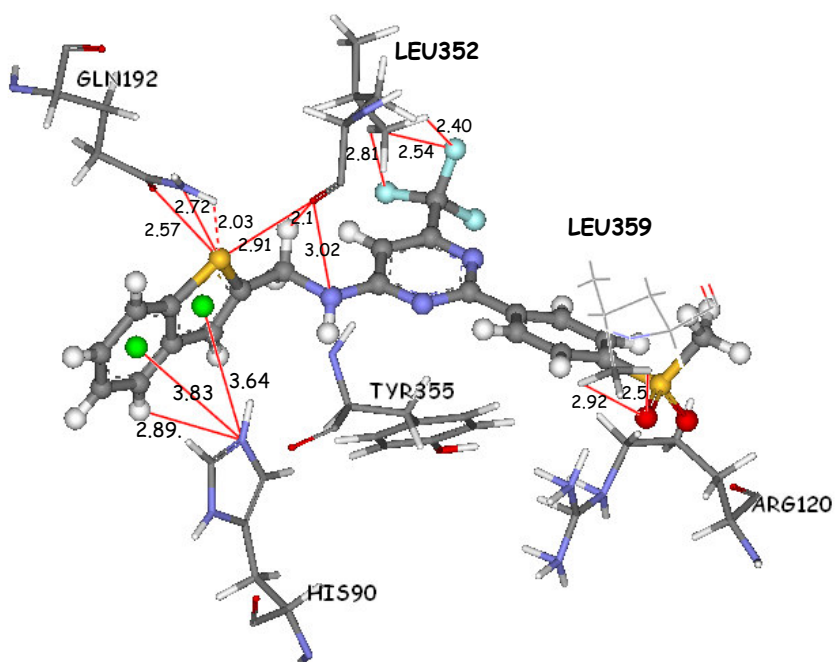


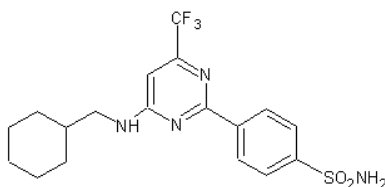
Figura 4.3.4 Ligante **4** no sítio da ciclooxigenase 2. São mostrados alguns resíduos que compõem o sítio e interações enzima-ligante (linhas vermelhas). Note a ligação de hidrogênio entre o composto **4** e a Gln192 (tracejado vermelho) e as interações cátion- π entre os anéis fenila e tiofenila e a His90. Distâncias de interação em Å. Centróide representado em verde.

Tabela 4.3.5 Interações medidas para a pirimidina **4** em complexo com a ciclooxigenase 2

Átomos do ligante	Distância (Å)	Átomos da Proteína	Átomos do ligante	Distância (Å)	Átomos da Proteína
S1	2.784	HD12/Leu351	F1	3.132	HA1/Gly526
S1	2.630	HB/Val116	F2	2.861	HD22/Leu352
S1	3.088	HG21/Val116	F2	2.528	HE1/Phe518
S1	2.835	HG22/Val116	F2	3.119	HG1/Met522
O1	3.124	HD11/Leu351	F2	2.619	HA/Val523
O1	2.187	HD12/Leu351	F3	2.397	HD23/Leu352
O1	2.696	HD20/Arg120	F3	3.008	HH2/Trp387
O1	2.996	HH11/Arg120	F3	2.545	HD22/Leu352
O1	2.020	HB/Val116	N3	3.015	O/Leu352
O1	3.178	HG22/Val116	N3	2.380	HA/Ser353
O1	2.631	HG21/Val116	H12b	2.093	O/Leu352
O2	2.920	HD22/Leu359	S2	2.974	O/Ser353
O2	2.470	HD23/Leu359	S2	2.716	NE2/Gln192
O2	2.444	HG12/Val116	S2	2.030	HE21/Gln192
O2	1.954	HG22/Val116	S2	2.569	OE1/Gln192
O2	3.024	HG21/Val116	S2	2.909	O/Leu352
O2	2.248	HB/Val116	H14	2.914	NE2/His90
N2	3.143	HG11/Val523	H17	2.815	NE2/Gln192
N2	2.897	HA/Ser353	H20	2.890	NE2/His90
F1	3.010	HA/Val523	Centróide C13-C16-S	3.636	NE2/His90
F1	3.106	N/Ala517	CentróideC15-C20	3.833	NE2/His90

A formação do complexo entre a pirimidina **4** e o sítio da ciclooxigenase 2 não se mostrou favorável. O ligante **4** não orienta sua porção SO₂Me no bolso lateral e perdeu as ligações de hidrogênio com os resíduos His90 e Arg513, além de também perder as ligações de hidrogênio com a Arg120 e Tyr355 na entrada do sítio (tais ligações de hidrogênio têm se mostrado essenciais para o complexo pirimidinas-COX-2). No geral, o composto **4** perdeu muitas interações favoráveis com os resíduos His90, Arg120 e Arg513.

- PIRIMIDINA 6



A pirimidina **6** se liga ao sítio da ciclooxigenase 2 com seu grupo SO₂NH₂ no bolso lateral interagindo com a His90, Arg513 e Val523, inclusive formando uma ligação de hidrogênio com a Arg513 (Figura 4.3.5). Ligações de hidrogênio com o aminoácido Arg513 do sítio da COX-2 já foram descritas para o inibidor SC-558 (KURUMBAIL *et al.*, 1996) e para um análogo piridínico da nimesulida (MICHAUX *et al.*, 2005). O anel fenila do ligante **6** interage com os resíduos His90, Leu352, Tyr355 e Arg513. O nitrogênio pirimidínico do ligante está próximo a Tyr355 e a porção CF₃ faz interações com os resíduos Val116, Tyr355, Leu359, Leu531 e forma uma ligação de hidrogênio com a Arg120 (Figura 4.3.5). O substrato ácido araquidônico (KIEFER *et al.*, 2000) e o flurbiprofeno

(KURUMBAIL *et al.*, 1996) também formam ligações de hidrogênio com a Arg120 na entrada do sítio da ciclooxigenase 2. O N4 amina do composto **6** interage com a Ala527 e Ser530 e o anel cicloexil faz interações com a Tyr385, Gly526, Ala527 e Ser530. Na Tabela 4.3.6 estão as interações do complexo **6**-COX-2.

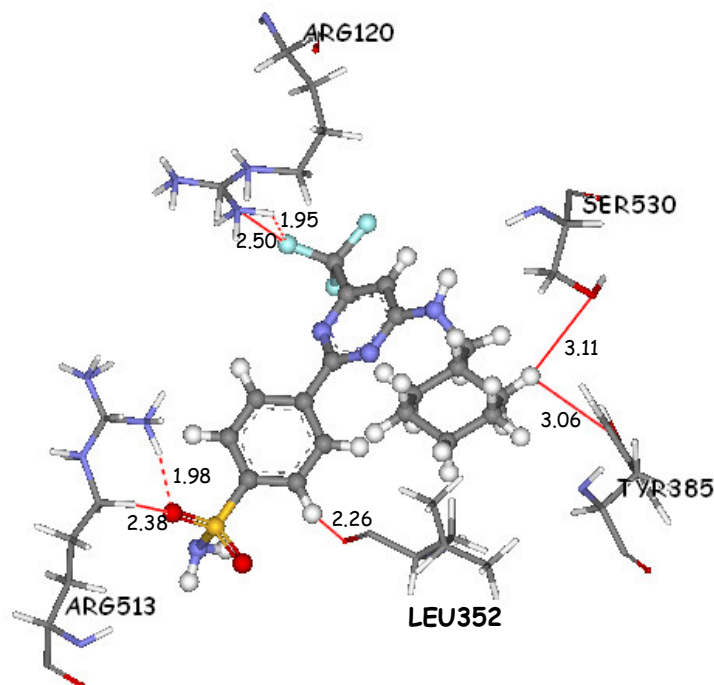
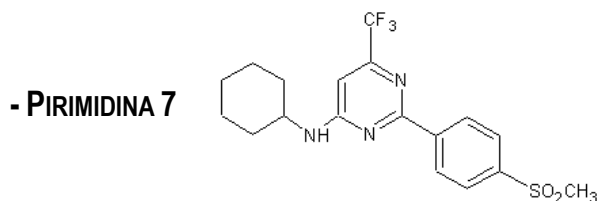


Figura 4.3.5 Composto **6** no sítio da COX-2. Algumas interações representadas em linhas vermelhas e as ligações de hidrogênio em tracejado vermelho (distâncias de interação em Å).

Tabela 4.3.6 Interações medidas para a pirimidina **6** em complexo com a ciclooxigenase 2

Átomos do ligante	Distância (Å)	Átomos da Proteína	Átomos do ligante	Distância (Å)	Átomos da Proteína
H2N1	2.047	O/Ser353	H6	2.258	O/Leu352
N1	2.666	NE2/His90	N2	2.939	HH/Tyr355
N1	1.802	HE2/His90	F1	3.183	HD22/Leu531
N1	3.158	HE1/His90	F1	2.731	HD12/Leu531
N1	2.822	O/Ser353	F2	3.087	HB/Val116
S1	3.138	NE2/His90	F2	1.953	HH11/Arg120
S1	2.306	HE2/His90	F2	2.502	NH1/Arg120
S1	2.944	HG22/Val523	F2	2.754	HH1/Arg120
O1	2.361	HE2/His90	F2	2.704	HH/Tyr355
O1	2.751	NE2/His90	F3	2.312	HE2/Tyr355
O1	2.290	HD1/Arg513	F3	2.907	HD23/Leu359
O1	2.959	HD2/His90	F3	2.861	HD11/Leu359
O1	2.375	HD2/Arg513	N4	2.276	HA/Ala527
O1	2.949	NH1/Arg513	N4	3.137	HB1/Ser530
O1	1.982	HH11/Arg513	H1N4	3.094	O/Ala527
O1	2.763	HG22/Val523	H11a	3.144	OG/Ser530
O2	2.327	HB2/Ala516	H12	2.715	O/Gly526
O2	2.861	HG22/Val523	H12	2.977	N/Ala527
H2	2.595	NE2/His90	H13b	3.064	Oh/Tyr385
H2	2.915	NH1/Arg513	H13b	3.111	OG/Ser530
H3	1.978	OH/Tyr355	H16b	3.159	N/Ala527
H5	3.165	O/Leu352			



O composto **7** se orienta no sítio da ciclooxigenase 2 com sua porção SO₂Me no bolso lateral interagindo com os resíduos His90, Gln192, Val523 e formando uma ligação de hidrogênio com a Arg513 (Figura 4.3.6). As porções sulfonamidas do inibidor SC-558 (KURUMBAIL *et al.*, 1996) e de um análogo piridínico da nimesulida (MICHAUX *et al.*, 2005) também formam ligações de hidrogênio com a Arg513 no sítio da COX-2. O anel fenila do ligante **7** interage com His90, Leu352 e Tyr355 e o grupo CF₃, próximo a entrada do sítio, faz ligações de hidrogênio com a Arg120 e Tyr355 (Figura 4.3.6). Ligações de hidrogênio com a Arg120 e Tyr355 no sítio da ciclooxigenase 2 parecem ser essenciais para ligação do substrato ácido araquidônico no sítio da COX-2 (KIEFER *et al.*, 2000). O anel cicloexil da pirimidina **7** interage com os aminoácidos Tyr385, Gly526, Ala527 e Ser530. As interações do complexo formado entre o composto **7** e a COX-2 são apresentadas na Tabela 4.3.7.

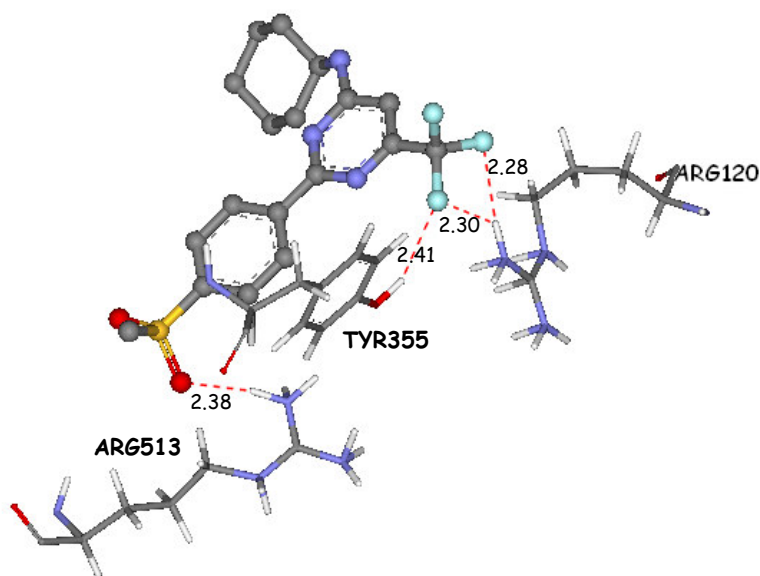


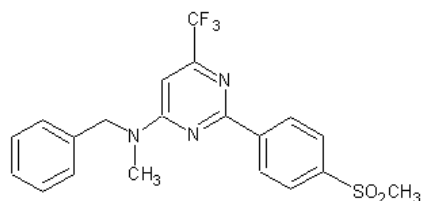
Figura 4.3.6 Ligações de hidrogênio (tracejado vermelho) para a pirimidina **7** no sítio de ligação da ciclooxigenase 2. Os hidrogênios do composto **7** não estão representados para facilitar a compreensão. Distâncias de interação em Å.

Tabela 4.3.7 Interações medidas para a pirimidina **7** em complexo com a ciclooxigenase 2

Átomos do ligante	Distância (Å)	Átomos da Proteína	Átomos do ligante	Distância (Å)	Átomos da Proteína
H1a	2.718	NE2/His90	F1	2.637	HG12/Val349
H1a	2.047	O/Ser353	F1	2.811	HD11/Leu359
H1c	3.107	OE1/Gln192	F2	2.262	HD12/Leu531
H1c	2.925	O/Leu352	F2	2.203	HD2/Arg120
H1c	2.558	O/Ser353	F2	2.275	HH11/Arg120
O1	2.396	NE2/His90	F3	2.303	HH11/Arg120
O1	1.940	HE2/His90	F3	2.873	NH1/Arg120
O1	2.983	HD2/His90	F3	2.892	HH1/Arg120
O1	2.377	HH11/Arg513	F3	2.772	HH12/Arg120
O1	2.440	HD1/Arg513	F3	2.410	HH/Tyr355 (LH)
O1	2.807	HD2/Arg513	F3	2.156	HE2/Tyr355
O1	3.182	H/Phe518	H12	2.451	O/Gly526
O2	2.137	HB2/Ala516	H12	2.760	N/Ala527
O2	3.167	H/Phe518	H13b	2.683	OG/Ser530
O2	2.827	HG22/Val523	H14a	2.808	OH/Tyr385
H3	2.569	NE2/His90	H16b	2.825	N/Ala527
H4	2.179	OH/Tyr355	H17b	3.132	N/Ala527
H7	2.861	O/Leu352			

Mesmo a pirimidina **7** formando ligações de hidrogênio com os resíduos Arg120, Tyr355 e Arg513, seu complexo com a ciclooxigenase 2 não parece ser favorável devido a perda de interações, principalmente contribuições de van der Waals, e por causa de interações intramoleculares desfavoráveis entre o N2 pirimidínico e anel cicloexil. Pode ser observado na Figura 4.3.6 a posição retraída deste anel ficando próximo ao N2 pirimidínico.

- PIRIMIDINA **8**



O ligante **8** se complexa a enzima ciclooxigenase 2 com seu grupo SO₂Me fazendo várias interações com a His90, Arg513 e Ala516. O anel fenila ligado ao SO₂Me interage com a His90, Leu352, Tyr355 e Arg513. O N1 pirimidínico está próximo a junção da Arg120/Tyr355 (ROWLINSON *et al.*, 2003) e a porção CF₃ forma ligações de hidrogênio com a Arg120 e Tyr355 (Figura 4.3.7). Ligações de hidrogênio com os resíduos Arg120 e Tyr355 no sítio da COX-2 já foram descritas para outros ligantes (KIEFER *et al.*, 2000; KURUMBAIL *et al.*, 1996). O N3 amina da pirimidina **8** interage com a Ala527 e o anel fenila substituinte com a Ser530. Na Tabela 4.3.8 estão as interações do complexo **8**-COX-2.

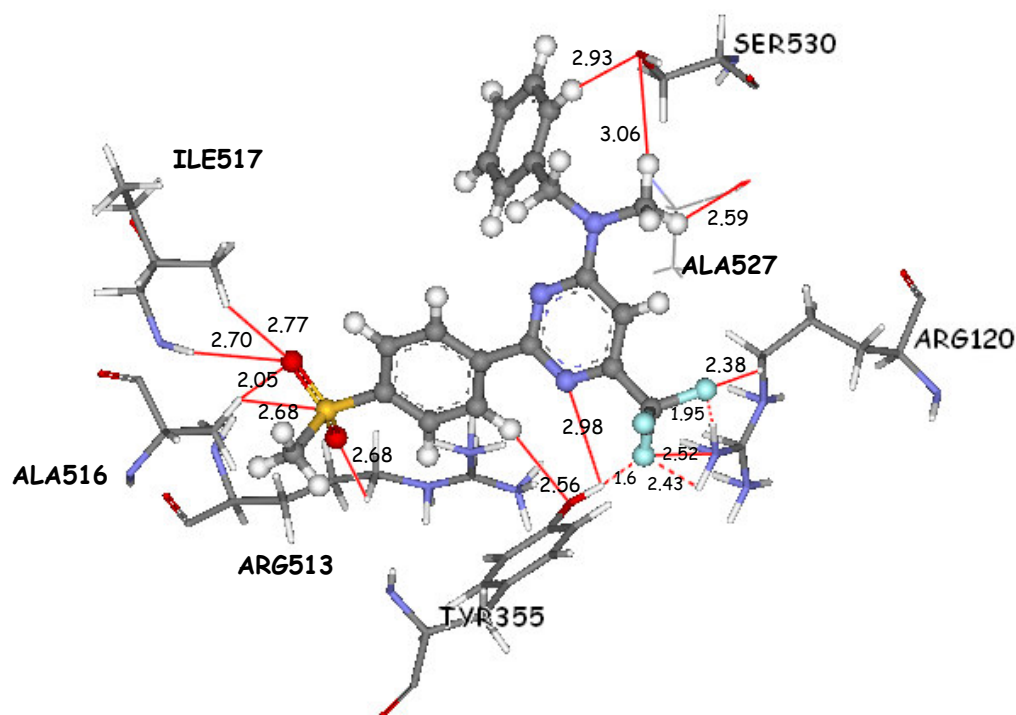
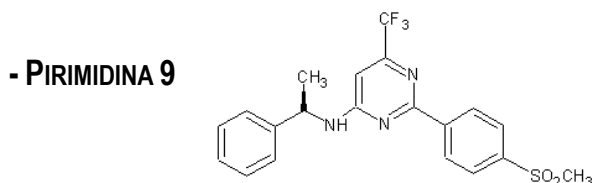


Figura 4.3.7 Ligante **8** no sítio da ciclooxigenase 2. São mostrados alguns resíduos e interações que compõem o sítio (linhas vermelhas). Note as ligações de hidrogênio (tracejado vermelho) entre o grupo CF_3 do composto e os resíduos Arg120 e Tyr355. Respectivas distâncias de interação em Å.

Tabela 4.3.8 Interações medidas para a pirimidina **8** em complexo com a ciclooxigenase 2

Átomos do ligante	Distância (Å)	Átomos da Proteína	Átomos do ligante	Distância (Å)	Átomos da Proteína
H1a	2.948	NE2/His90	H3	2.125	O/Leu352
H1a	2.408	O/Ser353	H4	2.922	O/Leu352
H1b	3.119	OE1/Gln192	H6	2.564	OH/Tyr355
H1c	2.576	OE1/Gln192	H7	2.438	NE2/His90
H1c	3.123	O/Leu352	H7	2.981	NH1/Arg513
H1c	3.058	O/Ser353	N1	2.981	HH/Tyr355
S1	2.962	HE2/His90	F1	2.392	HH11/Arg120
S1	3.108	HG22/Val523	F1	2.516	NH1/Arg120
S1	2.681	HB2/Ala516	F1	2.243	HH12/Arg120
O1	2.937	HG22/Val523	F1	1.643	HH/Tyr355
O1	2.779	HB3/Ala516	F1	2.569	OH/Tyr355
O1	2.684	HB2/Ala516	F2	2.498	HE2/Tyr355
O1	2.978	HB2/Arg513	F2	2.851	HD22/Leu359
O1	2.709	HD2/Arg513	F2	3.159	HD11/Leu359
O1	2.679	HD1/Arg513	F3	3.179	HH1/Arg120
O1	2.785	HH11/Arg513	F3	2.912	NH1/Arg120
O1	3.165	NE2/His90	F3	1.951	HH11/Arg120
O1	2.663	HE2/His90	F3	2.383	HD2/Arg120
O2	2.053	HB2/Ala516	N3	2.605	HA/Ala527
O2	2.663	H/Phe518	H14	2.933	OG/Ser530
O2	3.082	HD1/Phe518	H20a	2.587	O/Ala527
O2	2.697	H/Ile517	H20c	3.060	OG/Ser530
O2	2.773	HG23/Ile517			

A pirimidina **8** perdeu as ligações de hidrogênio com os resíduos His90 e Arg513 do bolso lateral e isto faz com que seja menos provável a formação do complexo **8**-COX-2 em relação ao composto **1**, por exemplo, que forma ligações de hidrogênio com tais aminoácidos (Figura 4.3.1).



A pirimidina **9** se liga ao sítio da ciclooxigenase 2 com sua porção SO₂Me na região do bolso lateral interagindo com os resíduos His90, Gln192, Arg513, Ala516 e Val523. A potência e seletividade de alguns compostos, como por exemplo, o inibidor SC-558, são determinadas por interações neste bolso lateral (KURUMBAIL *et al.*, 1996). O anel fenila ligado ao SO₂Me interage com a His90, Leu352, Ser353 e Tyr355. O N1 e N2 pirimidínicos fazem interações com a Tyr355 e Val349 respectivamente e o grupo CF₃ faz ligações de hidrogênio com a Arg120 e Tyr355 (Figura 4.3.8). Tanto o substrato ácido araquidônico (KIEFER *et al.*, 2000) como o inibidor flurbiprofeno (KURUMBAIL *et al.*, 1996) também formam ligações de hidrogênio com os resíduos Arg120 e Tyr355. O N3 amina faz interações com a Ala527 e Ser530. O grupo CH₃ substituinte interage com a Ser530 e o anel fenila substituinte faz interações com a Tyr385, Met522, Val523 e Ala527 e Ser530.

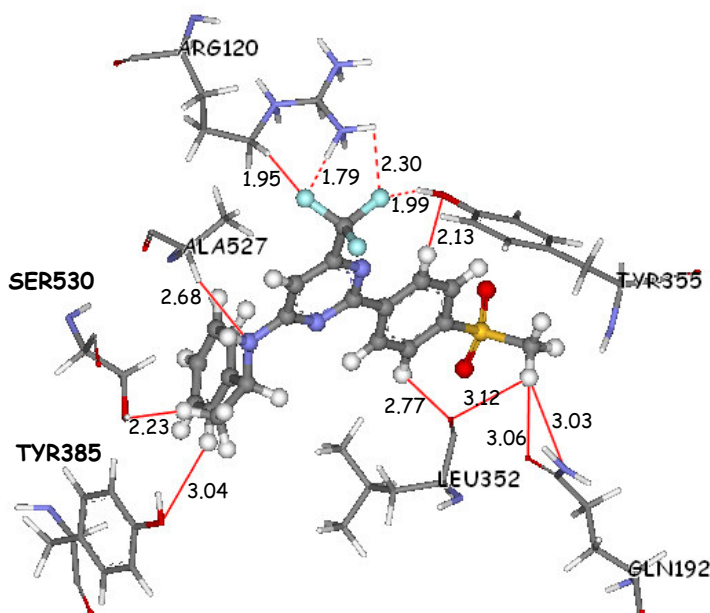
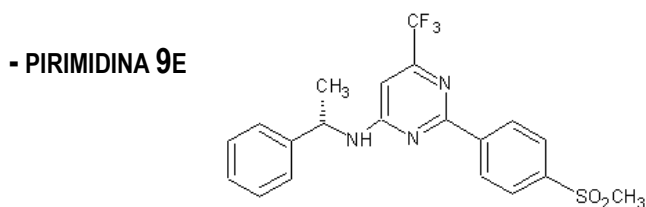


Figura 4.3.8 Ligante **9** em complexo com a ciclooxigenase 2. Algumas interações do sítio em linhas vermelhas e as ligações de hidrogênio estão em tracejado vermelho. Distâncias de interação em Å.

Tabela 4.3.9 Interações medidas para a pirimidina **9** em complexo com a ciclooxigenase 2

Átomos do ligante	Distância (Å)	Átomos da Proteína	Átomos do ligante	Distância (Å)	Átomos da Proteína
H1b	3.055	OE1/Gln192	N2	3.140	HG11/Val349
H1b	3.032	NE2/Gln192	F1	3.106	HE2/Tyr355
H1b	3.124	O/Leu352	F1	3.135	HD11/Leu359
H1b	2.529	O/Ser353	F2	2.777	NH1/Arg120
H1c	2.761	NE2/His90	F2	1.792	HH11/Arg120
H1c	1.971	O/Ser353	F2	3.070	HH1/Arg120
S1	2.557	HE2/His90	F2	1.948	HD2/Arg120
O1	2.202	HE2/His90	F2	3.092	HD1/Arg120
O1	2.761	NE2/His90	F3	2.110	HH11/Arg120
O1	2.595	HH1/Arg513	F3	2.517	NH1/Arg120
O1	2.606	HD1/Arg513	F3	2.513	HH1/Arg120
O1	2.832	HD2/Arg513	F3	2.303	HH12/Arg120
O1	3.051	HB3/Ala516	F3	1.991	HH/Tyr355
O1	3.104	HB2/Ala516	F3	2.910	OH/Tyr355
O1	3.069	HG22/Val523	N3	3.143	HB1/Ser530
O2	2.189	HB2/Ala516	N3	2.681	HA/Ala527
O2	3.109	H/Phe518	H14	2.882	N/Ala527
O2	2.918	H/Ile517	H15	3.010	O/Met522
O2	3.004	HG23/Ile517	H15	2.270	O/Val523
H3	2.771	O/Leu352	H15	2.531	N/Ala527
H6	2.126	OH/Tyr355	H16	2.619	O/Met522
H7	3.064	O/Ser353	H18	3.041	OH/Tyr385
H7	2.432	NE2/His90	H20b	2.226	OG/Ser530
N1	2.996	HH/Tyr355	H20c	3.074	OG/Ser530

As interações do complexo entre o ligante **9** e a COX-2 são apresentadas na Tabela 4.3.9. A pirimidina **9** mostrou ser menos favorável para formar um complexo com a COX-2 do que seu análogo o composto **1**. Isto se deve ao fato do ligante **9** perder interações favoráveis em relação ao ligante **1** no sítio da COX-2, principalmente as ligações de hidrogênio no bolso lateral com os resíduos His90 e Arg513.



O ligante **9e**, que se refere a um enantiômero do composto **9**, orienta seu grupo SO₂Me no bolso lateral e faz interações com os resíduos His90, Gln192, Arg513 e Val523, inclusive ligações de hidrogênio com a His90 e Arg513 (Figura 4.3.9). Ligações de hidrogênio com a His90 e Arg513 já foram descritas para o inibidor SC-558 (KURUMBAIL *et al.*, 1996) e para um análogo piridínico da nimesulida (MICHAUX *et al.*, 2005). O anel fenila ligado ao SO₂Me interage com a His90, Ser353 e Tyr355. O N2 pirimidínico está

próximo a Ala527 e o grupo CF_3 forma uma ligação de hidrogênio com a Arg120. O substrato ácido araquidônico (KIEFER *et al.*, 2000) e o inibidor flurbiprofeno (KURUMBAIL *et al.*, 1996) também fazem ligações de hidrogênio com a Arg120 no sítio da ciclooxigenase 2. O N3 amina do composto **9e** interage com a Ala527 e Ser530 e o anel fenila substituinte faz interações com a Tyr385, Met522, Val523 e Ala527. Na Tabela 4.3.10 estão as interações do complexo **9e**-COX-2.

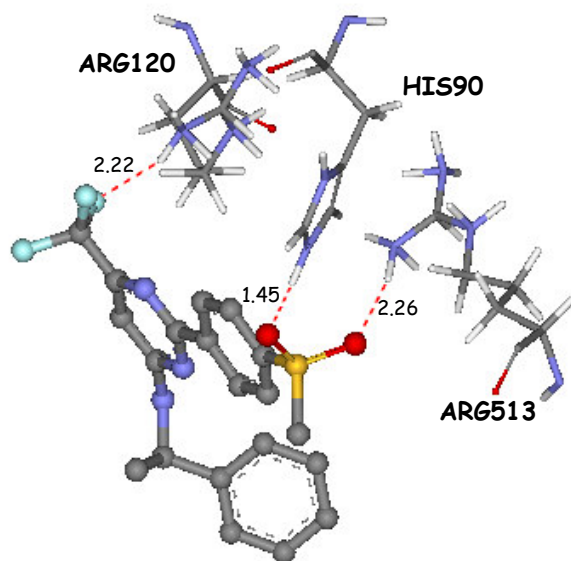


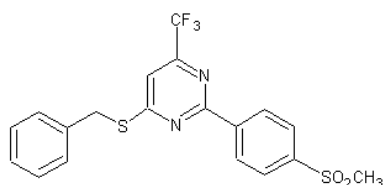
Figura 4.3.9 Composto **9e** no sítio de ligação COX-2. Destaque para as ligações de hidrogênio (em tracejado vermelho) que o ligante **9e** forma com os resíduos His90, Arg120 e Arg513. Os hidrogênios da pirimidina **9e** não estão representados para facilitar a compreensão. Distâncias de interação em Å.

Tabela 4.3.10 Interações medidas para a pirimidina **9e** em complexo com a ciclooxigenase 2

Átomos do ligante	Distância (Å)	Átomos da Proteína	Átomos do ligante	Distância (Å)	Átomos da Proteína
H1b	2.924	OE1/Gln192	F1	2.744	HG12/Val349
H1b	2.097	O/Leu352	F1	2.873	HD11/Leu359
H1c	2.580	OE1/Gln192	F2	2.085	HD12/Leu531
S1	3.185	HG22/Val523	F2	2.049	HD2/Arg120
S1	3.195	NE2/His90	F2	2.215	HH11/Arg120
S1	2.281	HE2/His90	F2	3.163	NH1/Arg120
O1	1.452	HE2/His90	F2	3.071	HB/Val116
O1	2.392	NE2/His90	F3	2.497	HH11/Arg120
O1	3.111	HE1/His90	F3	3.102	NH1/Arg120
O1	2.413	O/Ser353	F3	3.001	HH12/Arg120
O2	2.508	HG22/Val523	F3	2.897	HH/Tyr355
O2	2.263	HH11/Arg513	N3	1.935	HA/Ala527
O2	2.738	HD2/Arg513	N3	2.723	HB1/Ser530
O2	2.819	HD1/Arg513	H1N3	2.803	O/Ala527
O2	2.994	NE2/His90	H12a	2.770	OG/Ser530
O2	2.436	HE2/His90	H14	2.729	N/Ala527
H3	2.891	O/Ser353	H15	2.699	O/Met522
H3	3.048	NE2/His90	H15	2.689	O/Val523
H3	3.134	OH/Tyr355	H15	3.120	N/Ala527
H4	2.067	OH/Tyr355	H16	3.071	O/Met522
N2	3.078	HB3/Ala527	H18	2.862	OH/Tyr385

O composto **9** e seu enantiômero (**9e**) se dispõem de modo semelhante no sítio da ciclooxigenase 2. Ambos formam ligações de hidrogênio com Arg120, apresentam suas porções SO₂Me e CF₃ interagindo com os resíduos His90/Arg513 e Arg120/Tyr355 respectivamente, além dos hidrogênios do anel fenila substituinte fazerem interações com Tyr385, Met522, Val523 e Ala527. No entanto, o complexo entre o ligante **9e** e a COX-2 foi mais favorável, pois apresentou melhor padrão de orientação no sítio formando ligações de hidrogênio com os resíduos His90 e Arg513 no bolso lateral.

- PIRIMIDINA 10



O composto **10** se liga ao sítio da ciclooxigenase 2 com seu grupo SO₂Me no bolso lateral (His90, Gln192, Arg513 e Val523) e faz uma ligação de hidrogênio com a Arg513. As sulfonamidas do inibidor SC-558 (KURUMBAIL *et al.*, 1996) e de um análogo piridínico da nimesulida (MICHAUX *et al.*, 2005) também formam ligações de hidrogênio com a Arg513 do bolso lateral da COX-2. O anel fenila ligado ao SO₂Me faz interações com His90, Leu352, Tyr355 e Arg513. O N1 pirimidínico está próximo a Tyr355 e a porção CF₃ faz várias interações com a Arg120 e Tyr355, inclusive ligações de hidrogênio com tais resíduos (Figura 4.3.10). Ligações de hidrogênio com a Arg120 e Tyr355 são essenciais para formação do complexo entre a enzima COX-2 e o substrato ácido araquidônico (KIEFER *et al.*, 2000). O S2 interage com a Val349, Ala527 e Ser530. O anel aromático substituinte interage com o OH da Ser530.

As interações da pirimidina **10** com a ciclooxigenase 2 são apresentadas na Tabela 4.3.11.

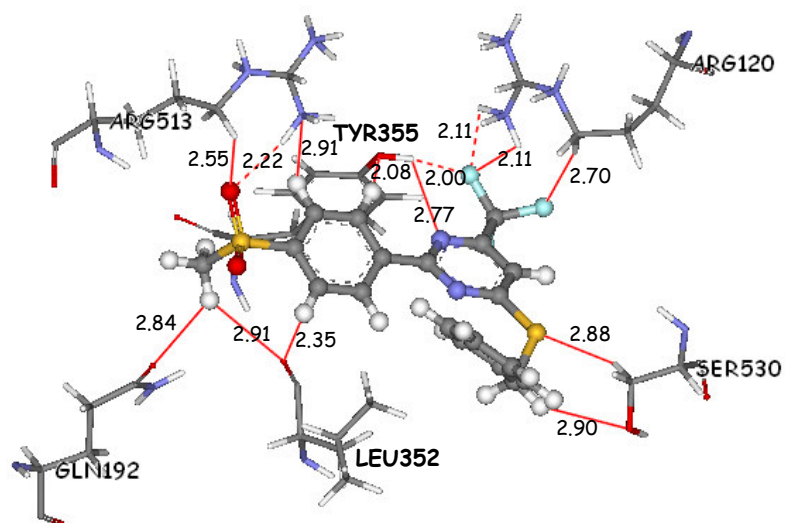
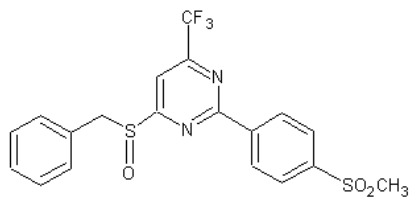


Figura 4.3.10 Ligante **10** no sítio da ciclooxygenase 2. Algumas interações do sítio estão representadas em linhas vermelhas e as ligações de hidrogênio em tracejado vermelho (distâncias de interação em Å).

Tabela 4.3.11 Interações medidas para a pirimidina **10** com a ciclooxygenase 2

Átomos do ligante	Distância (Å)	Átomos da Proteína	Átomos do ligante	Distância (Å)	Átomos da Proteína
H1b	2.843	OE1/Gln192	H7	2.549	NE2/His90
H1b	2.913	O/Leu352	H7	2.914	NH1/Arg513
H1c	3.006	O/Ser353	N1	2.773	HH/Tyr355
H1c	2.817	NE2/His90	N2	2.994	HG11/Val349
H1c	2.326	O/Ser353	F1	2.390	HE2/Tyr355
S1	2.649	HE2/His90	F1	2.397	HD22/Leu359
S1	3.108	HB2/Ala516	F1	2.624	HD12/Leu359
S1	2.781	HG22/Val523	F2	2.834	HB/Val116
O1	2.902	HG22/Val523	F2	2.682	HD12/Leu531
O1	2.215	HH1/Arg513	F2	2.700	HD2/Arg120
O1	3.175	NH1/Arg513	F2	2.312	HH11/Arg120
O1	2.551	HD2/Arg513	F3	2.114	HH11/Arg120
O1	3.074	HD2/His90	F3	2.424	NH1/Arg120
O1	2.379	HD1/Arg513	F3	2.111	HH12/Arg120
O1	2.684	NE2/His90	F3	2.517	HH1/Arg120
O1	2.251	HE2/His90	F3	2.001	HH/Tyr355
O2	2.447	HG22/Val523	F3	2.918	OH/Tyr355
O2	2.835	HD1/Phe518	S2	2.802	HA/Ala527
O2	3.100	H/Phe518	S2	3.157	HG11/Val349
O2	2.377	HB2/Ala516	S2	2.885	HB1/Ser530
H3	2.350	O/Leu352	H12a	2.898	OG/Ser350
H6	2.079	OH/Tyr355	H14	2.852	OG/Ser350

- PIRIMIDINA 11

A pirimidina **11** se complexa ao sítio ativo da ciclooxigenase 2 com sua porção SO₂Me no bolso lateral interagindo com os resíduos His90, Gln192, Arg513 e Val523. O O1 e O2 deste grupo SO₂Me formam ligações de hidrogênio com a His90 e Arg513 respectivamente (Figura 4.3.11). Ligações de hidrogênio com os aminoácidos His90 e Arg513 do sítio da COX-2 já foram descritas para o inibidor SC-558 (KURUMBAIL *et al.*, 1996) e para um análogo piridínico da nimesulida (MICHAUX *et al.*, 2005). O anel fenila ligado ao SO₂Me faz interações com a His90, Leu352 e Tyr355. O N2 pirimidínico interage com a Val349 e a porção CF₃ faz interações com a Arg120, Val349, Tyr355, Leu359, Val516 e Leu531, inclusive há uma ligação de hidrogênio do F2 com a Arg120 (Figura 4.3.11). O inibidor flurbiprofeno (KURUMBAIL *et al.*, 1996) também forma uma ligação de hidrogênio com a Arg120 em seu complexo com a ciclooxigenase 2. O SO substituinte do composto **11** interage com a Val349, Ala527 e Ser530. O anel fenila substituinte faz uma interação com o OH da Ser530. Na Tabela 4.3.12 são mostradas as interações do complexo **11**-COX-2.

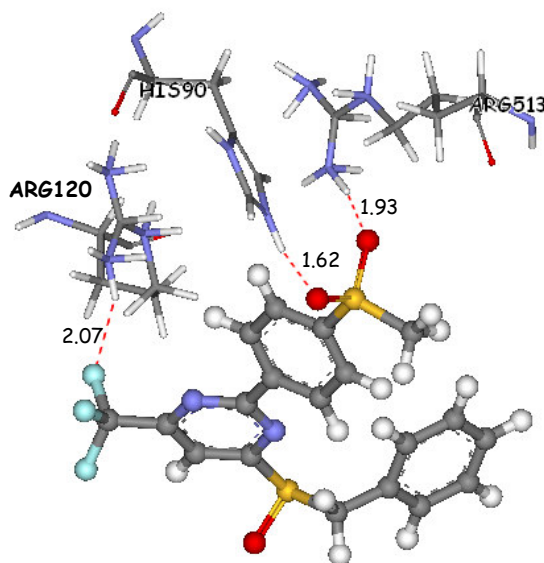


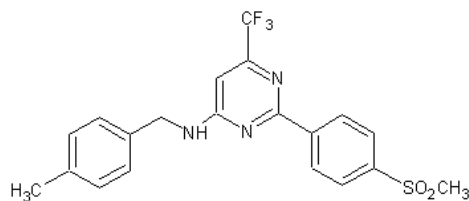
Figura 4.3.11 Pirimidina **11** no sítio da ciclooxigenase 2. Ligações de hidrogênio (tracejado vermelho) entre o ligante e os resíduos His90, Arg120 e Arg513. Distâncias de interação em Å.

Tabela 4.3.12 Interações medidas para a pirimidina **11** com a ciclooxygenase 2

Átomos do ligante	Distância (Å)	Átomos da Proteína	Átomos do ligante	Distância (Å)	Átomos da Proteína
H1a	2.924	OE1/Gln192	H7	2.567	O/Leu352
H1a	2.734	O/Leu352	N2	3.017	HG11/Val349
H1b	3.182	OE1/Gln192	F1	2.698	HD11/Leu359
S1	2.413	HE2/His90	F1	2.471	HG12/Val349
S1	2.874	HG22/Val523	F1	2.870	HD22/Leu531
O1	2.743	O/Ser353	F2	2.956	HD12/Leu531
O1	1.619	HE2/His90	F2	2.666	HD2/Arg120
O1	2.547	NE2/His90	F2	2.069	HH11/Arg120
O2	2.525	HE2/His90	F2	2.966	NH1/Arg120
O2	2.992	NE2/His90	F2	2.964	HB/Val516
O2	3.073	HD2/His90	F3	2.078	HE2/Tyr355
O2	2.918	NH1/Arg513	F3	2.662	HD12/Leu359
O2	1.932	HH11/Arg513	S2	2.522	HA/Ala527
O2	2.595	HD1/Arg513	S2	2.413	HB1/Ser530
O2	2.460	HD2/Arg513	O3	2.526	HB1/Ser530
O2	2.417	HG22/Val523	O3	2.683	HG22/Val349
H3	2.873	NE2/His90	O3	2.375	HG23/Val349
H3	3.180	OH/Tyr355	O3	3.151	HG11/Val349
H4	2.061	OH/Tyr355	H18	2.913	OG/Ser530

O complexo entre a pirimidina **10** e o sítio de ligação da ciclooxygenase 2 se mostrou mais favorável do que o complexo **11**-COX-2 pelo fato do primeiro apresentar um maior número de interações de van der Waals favoráveis (consequentemente maior *score* de *fitness*), além do **11** fazer interações intramoleculares desfavoráveis.

- PIRIMIDINA **12**



O composto **12** se complexa ao sítio da ciclooxygenase 2 com seu grupo SO₂Me no bolso lateral, formando ligações de hidrogênio com os resíduos His90 e Arg513 (Figura 4.3.12). O inibidor SC-558 (KURUMBAIL *et al.*, 1996) e um análogo piridínico da nimesulida (MICHAUX *et al.*, 2005) também formam ligações de hidrogênio com a His90 e Arg513 no bolso lateral da COX-2. O anel fenila ligado ao grupo SO₂Me faz interações com a His90, Ser353 e Tyr355. O N1 e o N2 pirimidínicos interagem com a Tyr355 e Val349 respectivamente. A porção CF₃ interage com os aminoácidos Val116, Arg120, Tyr355, Leu359 e Leu531. O N3 amina faz interações com a Val349, Ala527 e Ser530. Interações entre o grupo diclorofenil do diclofenaco e os resíduos Val349, Ala527 e Ser530 do sítio da

ciclooxigenase 2 foram descritas por Rowlinson *et al.*, 2003. Finalmente, a porção 4-metilfenila do ligante **12** interage com a Tyr385, Met522, Val523 e Ala527. Na Tabela 4.3.13 estão as interações do complexo **12**-COX-2.

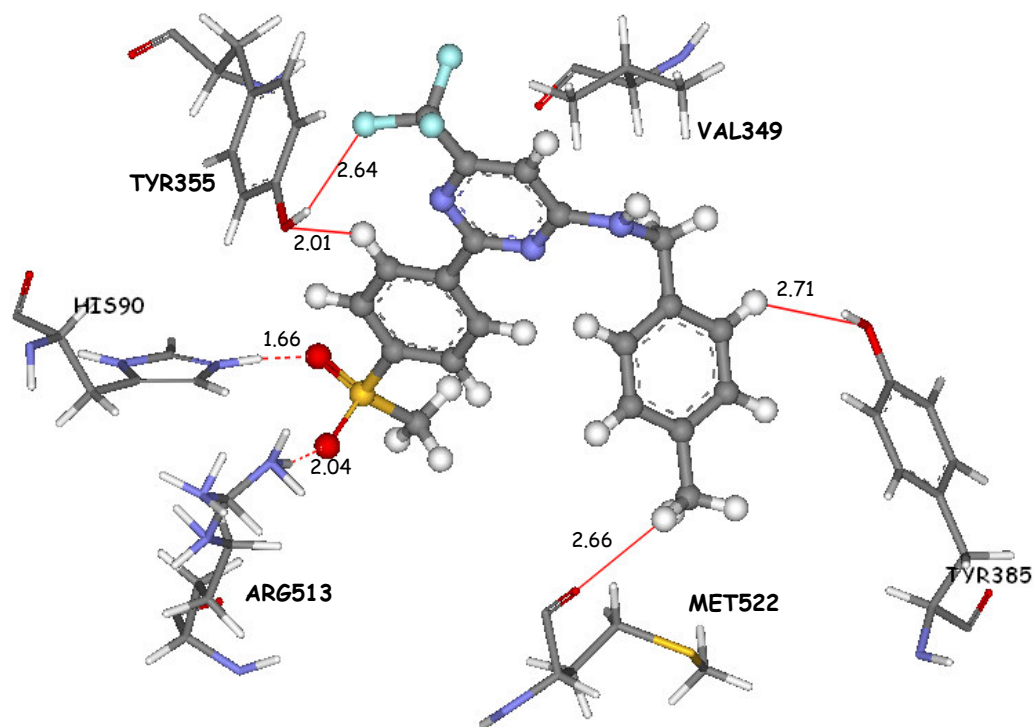


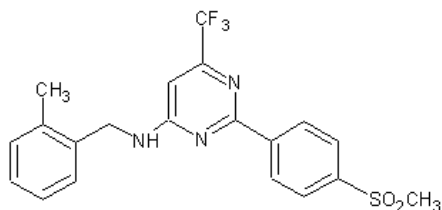
Figura 4.3.12 Ligante **12** no sítio da ciclooxigenase 2. Estão representadas algumas interações do sítio (linhas vermelhas). Note as ligações de hidrogênio com os resíduos His90 e Arg513 (tracejado vermelho). Distâncias de interação em Å.

Tabela 4.3.13 Interações medidas para a pirimidina **12** com a ciclooxigenase 2

Átomos do ligante	Distância (Å)	Átomos da Proteína	Átomos do ligante	Distância (Å)	Átomos da Proteína
H1a	2.802	OE1/Gln192	F1	2.637	HH/Tyr355
H1c	2.264	O/Leu352	F1	2.882	NH1/Arg120
O1	2.590	O/Ser353	F1	2.397	HH11/Arg120
O1	2.615	NE2/His90	F2	2.791	HD23/Leu359
O1	1.664	HE2/His90	F2	3.187	HD12/Leu359
O2	2.564	HE2/His90	F3	2.296	HD12/Leu531
O2	3.099	NE2/His90	F3	2.184	HD2/Arg120
O2	3.191	HD2/His90	F3	3.056	NH1/Arg120
O2	2.843	HD1/Arg513	F3	2.735	HB/Val116
O2	3.025	NH1/Arg513	N3	3.175	HG11/Val349
O2	2.044	HH11/Arg513	N3	2.813	HA/Ala527
O2	3.181	HG12/Val523	N3	2.844	HB1/Ser530
O2	2.644	HD2/Arg513	H12a	2.997	OG/Ser530
O2	2.285	HG22/Val523	H14	2.706	OH/Tyr385
H3	2.986	NE2/His90	H15	3.028	OH/Tyr385
H3	2.961	O/Ser353	H17	3.000	O/Val523
H3	3.175	OH/Tyr355	H17	2.883	N/Ala527
H4	2.008	OH/Tyr355	H18	3.164	N/Ala527
N1	3.072	HH/Tyr355	H20b	2.661	O/Met522
N2	2.794	HG11/Val349			

O composto **12** se complexa de maneira muito semelhante ao seu análogo composto **1**. Ambos apresentam o mesmo padrão de orientação no sítio de ligação da ciclooxigenase 2, formando ligações de hidrogênio com os resíduos do bolso lateral His90 e Arg513, além dos nitrogênios pirimidínicos (N1 e N2) de ambas estarem próximos à Tyr355 na entrada do sítio. Portanto, tiveram *score* de *fitness* próximos, tendo probabilidades parecidas para a formação de complexo no sítio da COX-2.

- PIRIMIDINA 13



O composto **13** se liga a ciclooxigenase 2 com a porção SO₂Me no bolso lateral fazendo interações com a His90, Gln192, Arg513 e Val523. A seletividade de alguns inibidores de COX-2 é em parte definida por interações neste bolso (KURUMBAIL *et al.*, 1996; MICHAUX *et al.*, 2005). O anel fenila da pirimidina **13** faz interações com a His90, Leu352, Tyr355 e Arg513. O N1 pirimidínico forma uma ligação de hidrogênio com a Tyr355 (Figura 4.3.13) e o grupo CF₃ faz várias interações com a Arg120 e Tyr355, inclusive ligações de hidrogênio com estes resíduos na entrada do sítio (Figura 4.3.13). O inibidor flurbiprofeno e o substrato ácido araquidônico (KURUMBAIL *et al.*, 1996; KIEFER *et al.*, 2000) em seus complexos com a ciclooxigenase 2 formam ligações de hidrogênio com a Arg120 e Tyr355. A porção amina do ligante **13** interage com a Ala527 e Leu531 e o grupo 2-metilfenil faz interações com a Tyr355, Tyr385, Val523, Ala527 e Ser530. As interações do ligante **13** em complexo com a ciclooxigenase 2 são apresentadas na Tabela 4.3.14.

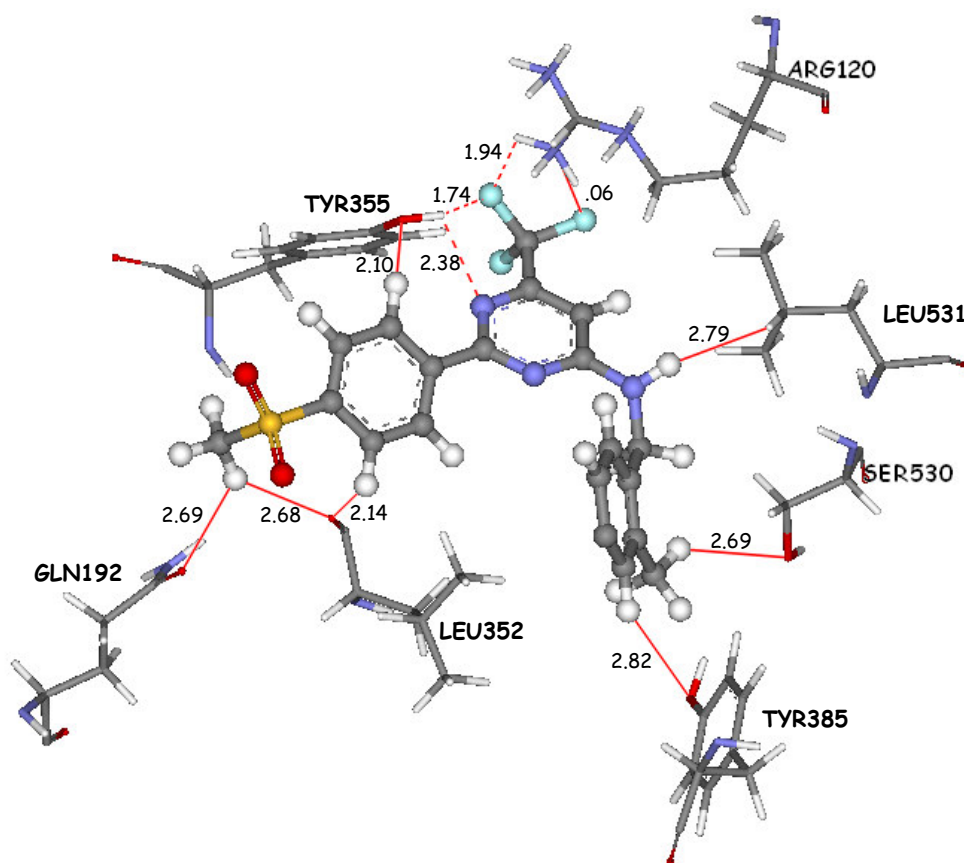


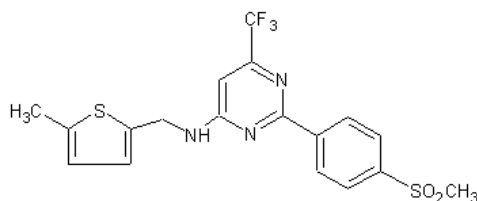
Figura 4.3.13 Pirimidina **13** no sítio de ligação da ciclooxigenase 2. São mostradas algumas interações (em linhas vermelhas) e as ligações de hidrogênio (tracejado vermelho) do sítio. Distâncias de interação em Å.

Tabela 4.3.14 Interações medidas para a pirimidina **13** com a ciclooxigenase 2

Átomos do ligante	Distância (Å)	Átomos da Proteína	Átomos do ligante	Distância (Å)	Átomos da Proteína
H1a	3.169	NE2/His90	N1	2.830	OH/Tyr355
H1a	2.241	O/Ser353	N1	2.380	HH/Tyr355
H1b	2.781	OE1/Gln192	F1	2.477	HB/Val116
H1c	2.678	OE1/Gln192	F1	3.065	NH1/Arg120
H1c	2.944	NE2/Gln192	F1	2.304	HH11/Arg120
H1c	2.667	O/Leu352	F2	2.483	NH1/Arg120
H1c	2.991	O/Ser353	F2	1.943	HH12/Arg120
S1	2.595	HB2/Ala516	F2	1.742	HH/Tyr355
S1	3.011	HG/Val523	F2	2.610	OH/Tyr355
S1	2.854	HE2/His90	F2	1.973	HE2/Tyr355
O1	2.938	NE2/His90	F3	1.738	HE2/Tyr355
O1	2.698	HD1/Arg513	F3	2.134	HD22/Leu352
O1	3.150	HB2/Arg513	N3	3.170	HB3/Ala527
O1	2.878	HB2/Ala516	H1N3	2.841	O/Ala527
O1	3.003	HG22/Val523	H1N3	2.787	HG/Leu531
O2	2.825	HG22/Val523	H15	2.821	OH/Tyr355
O2	2.406	HB2/Ala516	H17	3.088	O/Val523
O2	2.948	H/Phe518	H17	3.177	N/Ala527
O2	3.122	H/Ile517	H18	2.820	N/Ala527
H3	2.287	NE2/His90	H20a	2.688	OG/Ser530
H3	2.986	NH1/Arg513	H20c	2.862	OG/Ser530
H4	2.101	OH/Tyr355	H20c	2.342	OH/Tyr385
H7	2.137	O/Leu352			

A pirimidina **12** se complexa mais favoravelmente ao sítio da ciclooxigenase 2 do que seu isômero **13**. Isto se deve ao fato do composto **12** formar ligações de hidrogênio com os resíduos His90 e Arg513 no bolso lateral, sendo que seu isômero **13** perdeu estas ligações de hidrogênio. O grupo metila na posição 2 (ligante **13**) ocasionou uma mudança de conformação em relação ao seu isômero **12** fazendo com que as ligações de hidrogênio com os resíduos His90 e Arg513 não fossem formadas.

- PIRIMIDINA 14



A pirimidina **14** se complexa a COX-2 com a porção SO₂Me orientada no bolso lateral (His90, Gln192, Arg513 e Val523) formando ligações de hidrogênio com os resíduos His90 e Arg513 (Figura 4.3.14). As porções sulfonamidas do inibidor SC-558 (KURUMBAIL *et al.*, 1996) e de um análogo piridínico da nimesulida (MICHAUX *et al.*, 2005) também formam ligações de hidrogênio com a His90 e Arg513 do bolso lateral da COX-2. O anel fenila interage com a His90, Ser353 e Tyr355 e o N1 pirimidínico está próximo a Tyr355. O grupo CF₃ forma ligações de hidrogênio com a Arg120 (Figura 4.3.14), além de interagir com os aminoácidos Val116, Leu359 e Leu531. Tanto o substrato ácido araquidônico (KIEFER *et al.*, 2000) como o inibidor flurbiprofeno (KURUMBAIL *et al.*, 1996) formam ligações de hidrogênio com a Arg120 no sítio de ligação da ciclooxigenase 2. O N3 amina faz interações com a Ala527 e Ser530 na parte mais alta do sítio e o anel tiofenila com uma metila na posição 2 interage com a Tyr385, Met522, Val523, Ala527 e Ser530. Na Tabela 4.3.15 estão as interações do ligante **14** no sítio de ligação da ciclooxigenase 2.

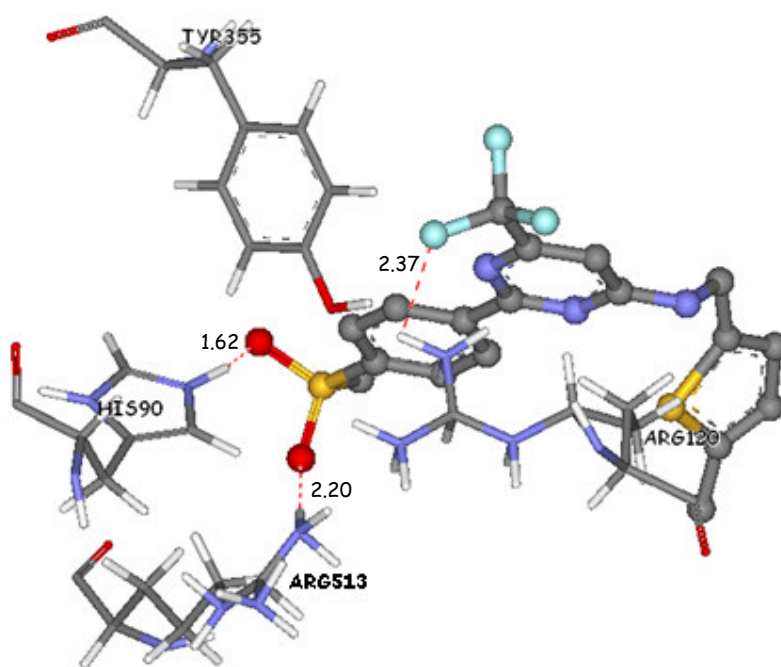
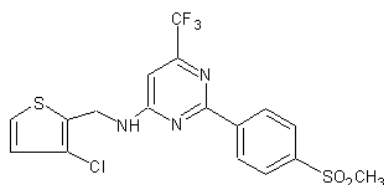


Figura 4.3.14 Ligações de hidrogênio (tracejado vermelho) entre o ligante **14** e os resíduos His90, Arg120, Tyr355 e Arg513 do sítio da ciclooxigenase 2. Distâncias de interação em Å.

Tabela 4.3.15 Interações medidas para a pirimidina **14** com a ciclooxigenase 2

Átomos do ligante	Distância (Å)	Átomos da Proteína	Átomos do ligante	Distância (Å)	Átomos da Proteína
H1a	2.206	O/Leu352	F1	2.689	NH1/Arg120
H1a	3.128	OE1/Gln192	F1	2.336	HH11/Arg120
H1b	2.600	OE1/Gln192	F1	3.186	HB/Val116
H1b	3.161	N/Ile517	F2	2.551	HB/Val116
S1	2.438	HE2/His90	F2	2.563	HD12/Leu531
S1	2.984	HG22/Val523	F2	2.569	HH11/Arg120
O1	2.718	O/Ser353	F3	2.827	HE2/Tyr355
O1	2.537	NE2/His90	F3	2.411	HD22/Leu359
O1	1.618	HE2/His90	F3	2.557	HD23/Leu359
O2	2.663	HE2/His90	N3	2.250	HA/Ala527
O2	2.786	HD1/Arg513	N3	3.124	HB1/Ser530
O2	2.202	HH11/Arg513	H1N3	2.744	O/Ala527
O2	2.331	HG22/Val523	H12a	3.054	OG/Ser530
H3	2.717	O/Ser353	H14	2.837	OG/Ser530
H3	2.783	NE2/His90	H14	3.126	Oh/Tyr385
H4	1.944	OH/Tyr355	S2	2.761	HA/Ala527
N1	2.746	HH/Tyr355	H18c	2.375	O/Met522
F1	1.929	HE2/Tyr355	H18c	3.171	N/Val523
F1	2.372	HH12/Arg120			

- PIRIMIDINA 15

O composto **15** se orienta no sítio da COX-2 com seu grupo SO_2Me no bolso lateral fazendo ligações de hidrogênio com a His90 e Arg513 (Figura 4.3.15). O anel fenila do ligante **15** interage com a His90 e Leu352 e os nitrogênios pirimidínicos N1 e N2 fazem interações com a Tyr355 e Val349 respectivamente. A porção CF_3 faz interações com os resíduos Val116, Arg120, Val349, Leu531, Leu539 e uma ligação de hidrogênio com a Tyr355 (Figura 4.3.15). O N3 amina está próximo a Ala527 e Ser530 e o anel tiofenila com um Cl na posição 5 interage com os aminoácidos Tyr385, Trp387, Ala527 e Ser530, inclusive há uma ligação de hidrogênio entre o Cl11 da pirimidina **15** e o HH da Tyr385 (Figura 4.3.15). Ligação de hidrogênio entre a Tyr385 e o carboxilato do inibidor diclofenaco foi descrita como essencial para formação do complexo diclofenaco-COX-2 (ROWLINSON *et al.*, 2003).

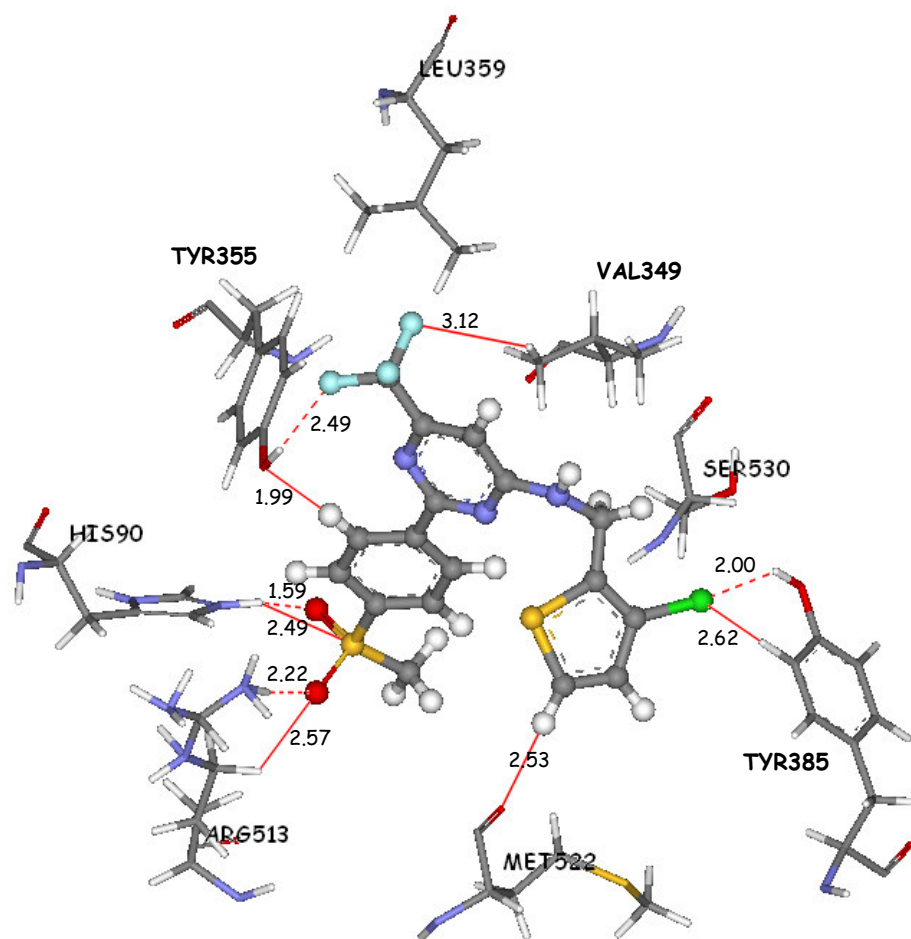


Figura 4.3.15 Pirimidina **15** no sítio da COX-2. Interações em linhas vermelhas e ligações de hidrogênio com os resíduos His90, Tyr385, Tyr355 e Arg513 estão em tracejado vermelho. Distâncias de interação em Å.

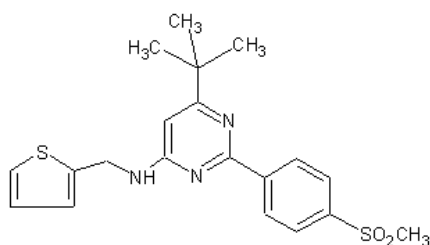
Na Tabela 4.3.16 estão as interações do complexo **15**-ciclooxigenase 2.

Tabela 4.3.16 Interações medidas para a pirimidina **15** em complexo com a ciclooxigenase 2

Átomos do ligante	Distância (Å)	Átomos da Proteína	Átomos do ligante	Distância (Å)	Átomos da Proteína
H1a	2.286	O/Leu352	F1	2.492	HH/Tyr355
H1a	2.896	OE1/Gln192	F1	2.257	HE2/Tyr355
H1b	2.683	OE1/Gln192	F2	3.034	HB/Val116
H1b	3.110	N/Ile517	F2	2.209	HH11/Arg120
S1	2.486	HE2/His90	F2	2.076	HD2/Arg120
S1	2.957	HG22/Val523	F2	2.114	HD12/Leu531
O1	2.529	NE2/His90	F3	2.932	HD11/Leu359
O1	2.680	O/Ser353	F3	3.119	HG12/Val349
O1	1.594	HE2/His90	N3	2.305	HA/Ala527
O2	2.307	HG22/Val523	N3	2.772	HB1/Ser530
O2	2.576	HD2/Arg513	H1N3	3.142	O/Ala527
O2	2.220	HH11/Arg513	H12a	2.860	OG/Ser530
O2	2.692	HE2/His90	S2	2.614	HA/Ala527
H3	2.794	NE2/His90	S2	2.882	N/Ala527
H7	2.508	O/Leu352	H16	2.526	O/Met522
N1	3.098	HH/Tyr355	C11	2.615	HE2/Tyr385
N2	3.187	HG11/Val349	C11	2.000	HH/Tyr385
F1	2.035	HH11/Arg120	C11	2.611	HH2/Trp387
F1	2.555	NH1/Arg120			

As pirimidinas **2** e **15** se orientam de maneira muito semelhante no sítio da COX-2. Ambas formam ligações de hidrogênio com os resíduos His90 e Arg513 no bolso lateral, além de uma ligação de hidrogênio com a Tyr355 na entrada do sítio. Além disso, o N1 e N2 pirimidínicos de ambas fazem interações com a Tyr355 e Val349 respectivamente. Ou seja, os complexos **2**-COX-2 e **15**-COX-2 se mostraram favoráveis formando ligações de hidrogênio no bolso lateral e na entrada do sítio. Assim, a análise dos cálculos de *docking* indicam que os ligantes **2** e **15** tem um bom potencial para atuar como antiinflamatórios.

- PIRIMIDINA 16



O ligante **16** se liga ao sítio da ciclooxigenase 2 com a porção SO₂Me no bolso lateral (His90, Gln192, Arg513 e Val523) fazendo ligações de hidrogênio com a His90 e Arg513 (Figura 4.3.16). O inibidor SC-558 (KURUMBAIL *et al.*, 1996) e um análogo piridínico da nimesulida (MICHAUX *et al.*, 2005) também formam ligações de hidrogênio com os resíduos His90 e Arg513 da COX-2. O anel fenila do composto **16** está próximo a

Leu352 e Tyr355 e o N1 e N2 pirimidínicos interagem com a Val349. O substituinte tBu faz interações com a Arg120 e Tyr355 na boca do sítio. O N3 amina faz interações com Val349, Ala527 e Ser530 e o anel tiofenila interage com a Tyr385, Met522 e Ala527. As interações da pirimidina **16** com a ciclooxigenase 2 são apresentadas na Tabela 4.3.17.

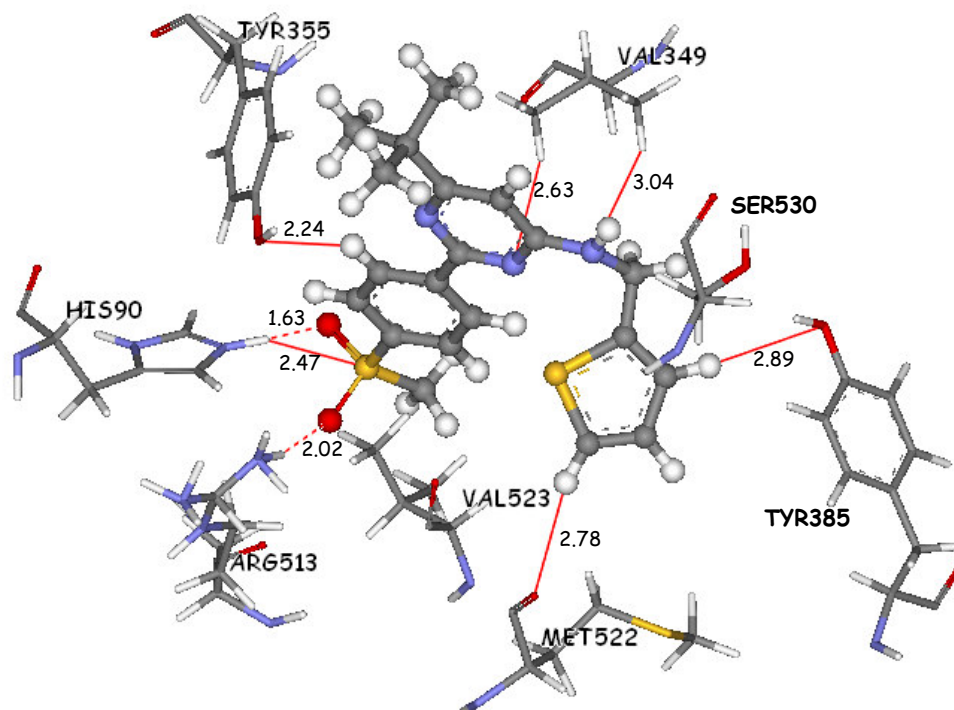
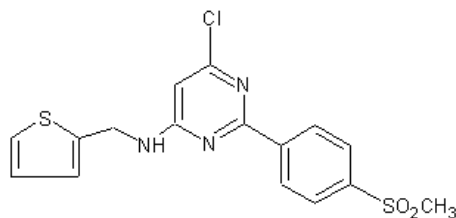


Figura 4.3.16 Ligante **16** em complexo com a ciclooxigenase 2. Estão representados alguns aminoácidos do sítio, além de interações (linhas vermelhas) e ligações de hidrogênio (tracejado vermelho). Distâncias de interação em Å.

Tabela 4.3.17 Interações medidas para a pirimidina **16** com a ciclooxigenase 2

Átomos do ligante	Distância (Å)	Átomos da Proteína	Átomos do ligante	Distância (Å)	Átomos da Proteína
H1a	2.279	O/Leu352	H7	2.937	O/Leu352
H1a	3.027	OE1/Gln192	N1	3.114	HG11/Val349
H1b	2.888	OE1/Gln192	N2	2.628	HG11/Val349
S1	2.469	HE2/His90	H18c	3.091	NH1/Arg120
S1	2.986	HG22/Val523	H18c	3.131	OH/Tyr355
O1	2.448	O/Ser353	H19c	2.193	NH1/Arg120
O1	2.590	NE2/His90	N3	2.608	HB1/Ser530
O1	1.626	HE2/His90	N3	3.088	HA/Ala527
O2	2.299	HG22/Val523	N3	3.038	HG23/Val349
O2	2.021	HH/Arg513	H12a	2.833	OG/Ser530
O2	2.923	HD1/Arg513	H14	2.888	OH/Tyr385
O2	2.487	HE2/His90	H16	2.778	O/Met522
H3	3.004	OH/Tyr355	S2	2.708	HA/Ala527
H4	2.236	OH/Tyr355			

- PIRIMIDINA 17

A pirimidina **17** se complexa ao sítio de ligação da ciclooxigenase 2 com seu grupo SO_2Me no bolso lateral formando ligações de hidrogênio com os resíduos His90 e Arg513 (Figura 4.3.17). Ligações de hidrogênio com os resíduos His90 e Arg513 da COX-2 já foram descritas para o ligante SC-558 (KURUMBAIL *et al.*, 1996) e para um análogo piridínico da nimesulida (MICHAUX *et al.*, 2005). O anel fenila interage com a His90, Leu352 e Tyr355. O anel pirimidínico está próximo a Val349 e Tyr355 e o Cl11 faz interações com os aminoácidos Val116, Leu531, além de formar uma ligação de hidrogênio com a Arg120 (Figura 4.3.17). O ácido araquidônico (KIEFER *et al.*, 2000) e o inibidor flurbiprofeno (KURUMBAIL *et al.*, 1996) também formam ligações de hidrogênio com a Arg120 na boca do sítio de ligação da ciclooxigenase 2. O N3 amina interage com a Ala527 e Ser530 e o anel tiofenila faz interações com a Ala527 e Met522. Na Tabela 4.3.18 são mostradas as interações medidas para o complexo **17**-COX-2.

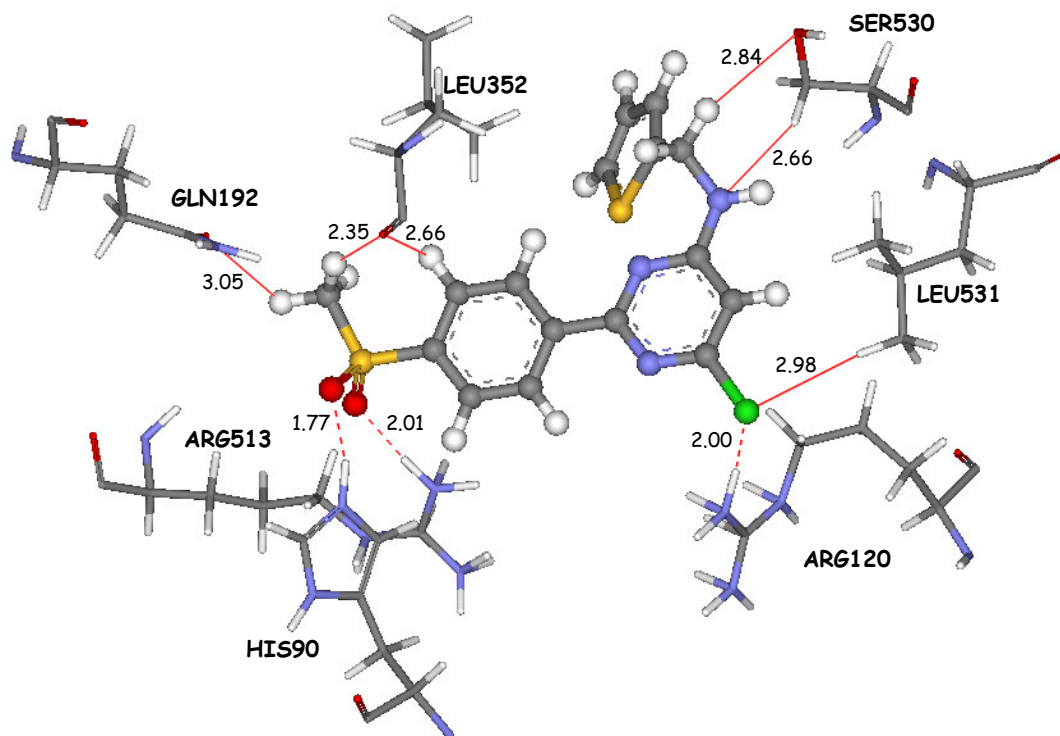


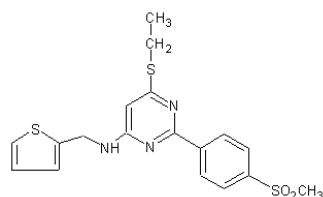
Figura 4.3.17 Composto **17** no sítio de ligação da ciclooxigenase 2. São mostradas as interações do sítio (linhas vermelhas) e ligações de hidrogênio (tracejado vermelho). Distâncias de interação em Å.

Tabela 4.3.18 Interações medidas para a pirimidina **17** com a ciclooxigenase 2

Átomos do ligante	Distância (Å)	Átomos da Proteína	Átomos do ligante	Distância (Å)	Átomos da Proteína
H1a	2.349	O/Leu352	H6	1.941	OH/Tyr355
H1a	3.200	OE1/Gln192	H7	3.058	OH/Tyr355
H1b	3.048	OE1/Gln192	H7	2.999	NE2/His90
S1	2.531	HE2/His90	N1	3.123	HH/Tyr355
S1	2.864	HG22/Val523	N2	2.995	HG11/Val349
O1	2.530	O/Ser353	C11	2.980	HD12/Leu531
O1	2.733	NE2/His90	C11	2.607	HD2/Arg120
O1	1.770	HE2/His90	C11	3.142	HB/Val116
O2	2.509	HE2/His90	C11	2.002	HH11/Arg120
O2	3.039	NE2/His90	N3	2.632	HA/Ala527
O2	2.821	HD1/Arg513	N3	2.658	HB1/Ser530
O2	2.009	HH11/Arg513	H12a	2.837	OG/Ser530
O2	2.653	HD2/Arg513	S2	2.849	HA/Ala527
O2	2.325	HG22/Val523	H16	2.804	O/Met522
H3	2.664	O/Leu352			

A formação de complexo entre o ligante **17** e o sítio da ciclooxigenase 2 se mostrou muito favorável. O composto **17** teve um ótimo padrão de ligação neste sítio, além de apresentar um *score* de -81,19 kcal/mol, relativamente melhor que o das pirimidinas estudadas (Tabela 4.3.1). Isto se deve ao fato da pirimidina **17** formar ligações de hidrogênio com os resíduos do bolso lateral His90 e Arg513 (mantendo o padrão mostrado pelos ligantes no sítio da COX-2). Além disso, o Cl formou uma ligação de hidrogênio com a Arg120 na entrada do sítio. O tamanho menor do Cl provavelmente permitiu uma melhor acomodação do composto no sítio da COX-2 do que seus análogos que apresentam um CF₃ na mesma posição. Assim, a pirimidina **17** pode ser considerada um promissor inibidor para a COX-2.

- PIRIMIDINA **18**



O composto **18** se liga ao sítio da COX-2 orientando sua porção SO₂Me no bolso lateral e esta porção forma ligações de hidrogênio com os resíduos His90 e Arg513 (Figura 4.3.18). O ligante SC-558 (KURUMBAIL *et al.*, 1996) e um análogo piridínico da nimesulida (MICHAUX *et al.*, 2005) também formam ligações de hidrogênio com os aminoácidos His90 e Arg513 do bolso lateral da COX-2. O anel fenila da pirimidina **18** interage com a His90, Leu352, Tyr355 e Arg513. O N1 e N2 pirimidínicos fazem interações com a Tyr355 e Ala527 respectivamente e o grupo S_{Et} faz uma ligação de hidrogênio com a Arg120 na entrada do sítio (Figura 4.3.18). Ligações de hidrogênio entre a Arg120 e os

ligantes ácido araquidônico (KIEFER *et al.*, 2000) e flurbiprofeno (KURUMBAIL *et al.*, 1996) já foram descritas para a ciclooxigenase 2. O grupo amina do ligante **18** interage com a Ala527 e Ser530 e o anel tiofenil faz interações com a Met522 e Val523. As interações do complexo entre a pirimidina **18** e a ciclooxigenase 2 estão na Tabela 4.3.19.

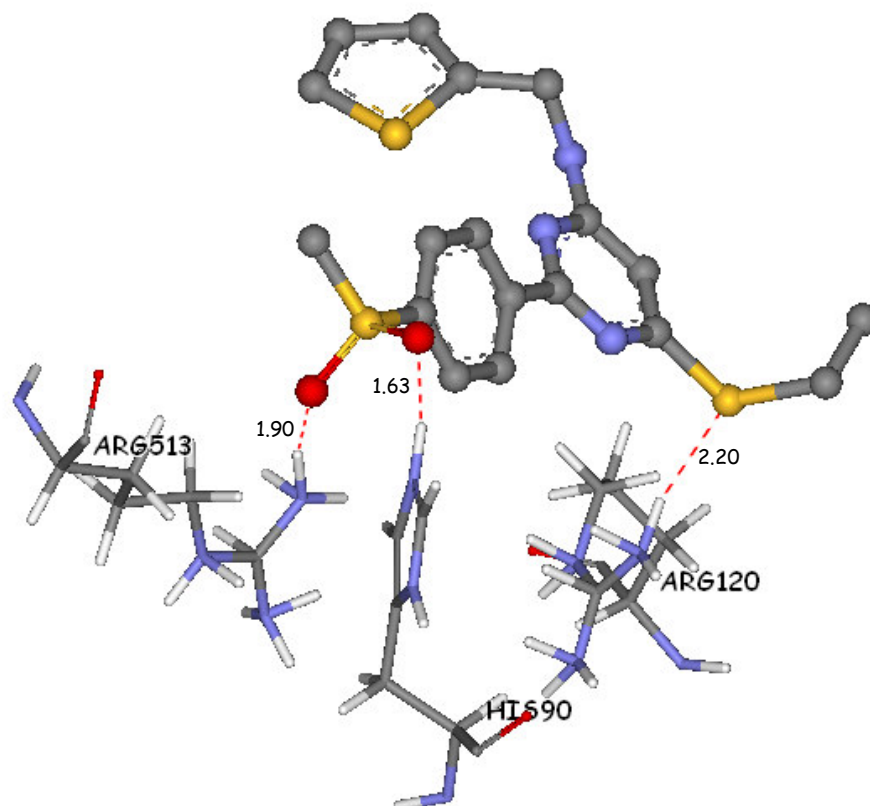
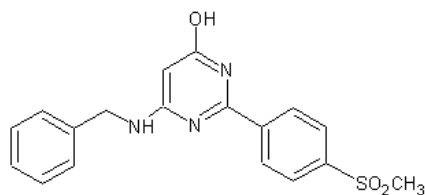


Figura 4.3.18 Ligações de hidrogênio (tracejado vermelho) entre a pirimidina **18** e o sítio de ligação da ciclooxigenase 2. Distância de interação em Å.

Tabela 4.3.19 Interações medidas para a pirimidina **18** com a ciclooxigenase 2

Átomos do ligante	Distância (Å)	Átomos da Proteína	Átomos do ligante	Distância (Å)	Átomos da Proteína
H1a	3.094	O/Phe518	H3	2.877	NE2/His90
H1c	2.959	OE1/Gln192	H3	2.935	NH1/Arg513
H1c	2.981	O/Leu352	H4	2.180	OH/Tyr355
S1	3.126	NE2/His90	H7	2.469	O/Leu352
S1	3.119	HH11/Arg513	N2	3.184	HH/Tyr355
S1	2.893	HG22/Val523	N3	3.133	HB3/Ala527
O1	2.661	O/Ser353	S3	3.132	NH1/Arg120
O1	1.631	HE2/His90	S3	2.779	HD2/Arg120
O1	2.565	NE2/His90	S3	2.200	HH11/Arg120
O2	2.709	NE2/His90	N3	2.224	HA/Ala527
O2	2.367	HD1/Arg513	N3	3.157	O/Ala527
O2	2.860	HD2/His90	H1N3	2.753	HB1/Ser530
O2	1.898	HH11/Arg513	H12a	2.995	OG/Ser530
O2	2.441	HD2/Arg513	S2	3.084	HA/Val523
O2	2.717	HG22/Val523	H16	2.922	O/Met522

- PIRIMIDINA 20

O composto **20** se liga a ciclooxigenase 2 com o SO₂Me no bolso lateral (His90, Gln192, Arg513 e Val523) fazendo ligações de hidrogênio com os resíduos His90 e Arg513 (Figura 4.3.19). Ligações de hidrogênio com os aminoácidos His90 e Arg513 do bolso lateral já foram descritas para o complexo da enzima COX-2 com os ligantes SC-558 (KURUMBAIL *et al.*, 1996) e um análogo piridínico da nimesulida (MICHAUX *et al.*, 2005). O anel fenila ligado ao SO₂Me faz interações com a His90, Leu352, Tyr355 e Arg513. O N2 pirimidínico interage com a Val349 e o grupo OH forma uma ligação de hidrogênio com Arg120 (Figura 4.3.19), além de interagir com a Ala527 e Leu531. A ligação de hidrogênio com a Arg120 é essencial para o complexo do substrato ácido araquidônico (KIEFER *et al.*, 2000) e do inibidor flurbiprofeno (KURUMBAIL *et al.*, 1996) no sítio de ligação da ciclooxigenase 2. O N3 amina do ligante **20** está próximo a Val349 e Ser530 e o anel fenila substituinte interage com a Tyr385 e Ala527 na parte mais alta do sítio. As interações do complexo **20**-COX-2 estão na Tabela 4.3.20.

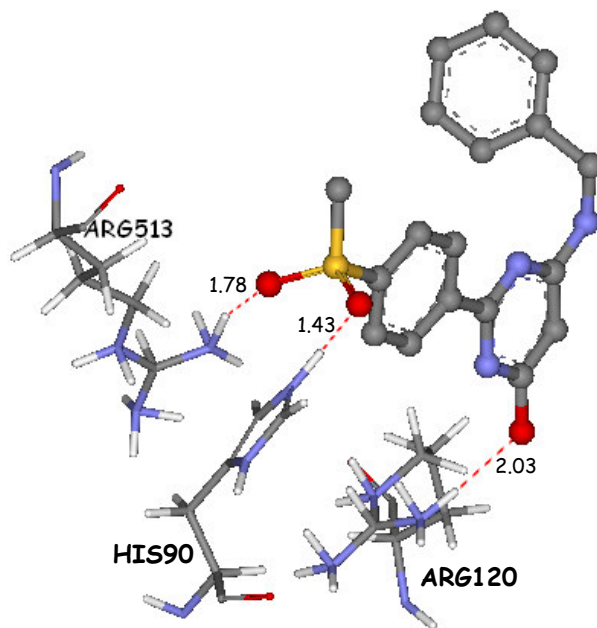
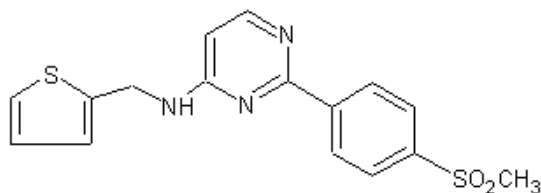


Figura 4.3.19 Composto **20** no sítio da COX-2. Destaque para as ligações de hidrogênio (tracejado vermelho) que o ligante forma com os resíduos His90, Arg120 e Arg513. Distâncias de interação em Å.

Tabela 4.3.20 Interações medidas para a pirimidina **20** com a ciclooxigenase 2

Átomos do ligante	Distância (Å)	Átomos da Proteína	Átomos do ligante	Distância (Å)	Átomos da Proteína
H1a	3.090	OE1/Gln192	H6	2.192	OH/Tyr355
H1a	2.490	O/Ser353	H7	3.148	NE2/His90
S1	2.960	HG22/Val523	H7	3.044	NH1/Arg513
S1	3.133	HH11/Arg513	N2	2.740	HG11/Val349
S1	2.215	HE2/His90	O3	2.026	HH11/Arg120
O1	2.490	O/Ser353	O3	2.183	HD2/Arg120
O1	2.390	NE2/His90	O3	2.730	HD12/Leu531
O1	1.428	HE2/His90	O3	3.099	HB2/Ala527
O2	2.573	HG22/Val523	N3	2.922	HB1/Ser530
O2	1.782	HH11/Arg513	N3	2.824	HG23/Val349
O2	2.580	HD2/Arg513	H14	2.521	OH/Tyr385
O2	2.737	NE2/His90	H17	2.524	N/Ala527
H3	2.250	O/Leu352			

- PIRIMIDINA 22

O composto **22** se liga a ciclooxigenase 2 com a porção SO₂Me no bolso lateral (His90, Gln192, Val523 e Arg513) formando ligações de hidrogênio com a His90 e Arg513 (Figura 4.3.20). O inibidor SC-558 (KURUMBAIL *et al.*, 1996) e um análogo piridínico da nimesulida (MICHAUX *et al.*, 2005) também formam ligações de hidrogênio com os resíduos His90 e Arg513 da COX-2. O anel fenila interage com a His90, Leu352 e Tyr355. O N1 e N2 pirimidínicos interagem com a Tyr355 e Val349 respectivamente e o H9 faz interação com a Arg120. O grupo amina interage com a Ala527 e Ser530 e o anel tiofenila faz interações com os aminoácidos Tyr385, Met522, Ala527 e Ser530. As interações do complexo entre o ligante **22** e a ciclooxigenase 2 estão na Tabela 4.3.21.

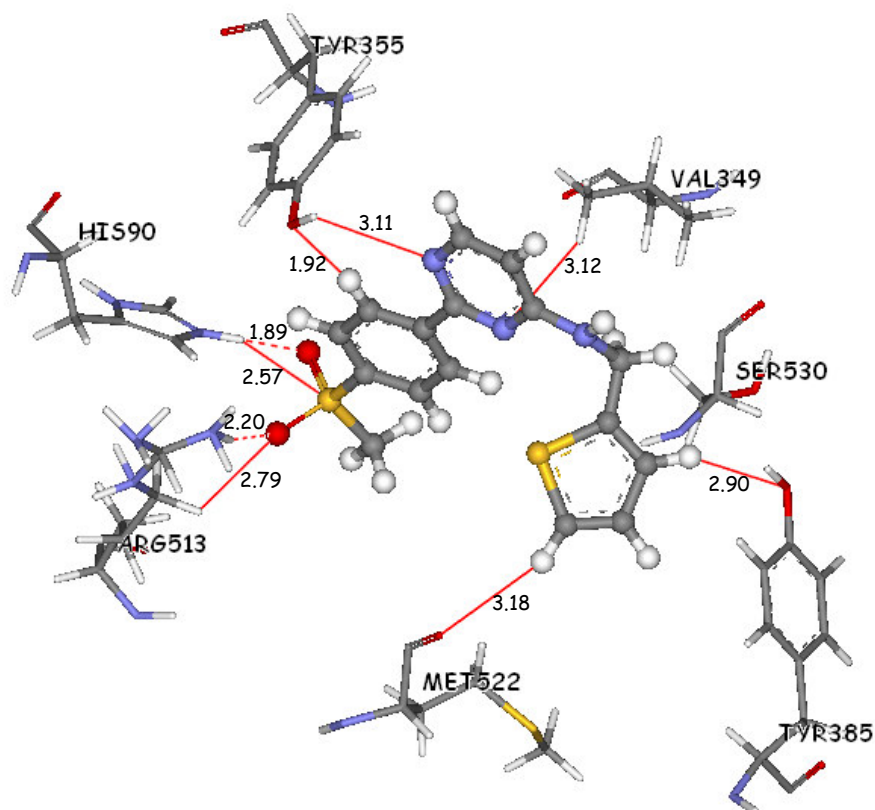


Figura 4.3.20 Composto **22** no sítio de ligação da ciclooxigenase 2. São mostradas algumas interações enzima-ligante em linhas vermelhas e em tracejado vermelho estão as ligações de hidrogênio com os aminoácidos His90 e Arg513 do bolso lateral. Distâncias de interação em Å.

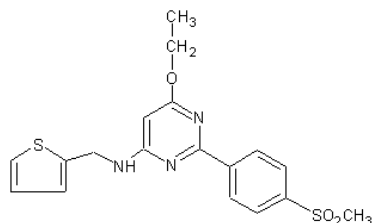
Tabela 4.3.21 Interações medidas para a pirimidina **22** em complexo com a ciclooxigenase 2

Átomos do ligante	Distância (Å)	Átomos da Proteína	Átomos do ligante	Distância (Å)	Átomos da Proteína
H1a	2.803	OE1/Gln192	H7	3.090	OH/Tyr355
H1c	3.159	OE1/Gln192	H7	2.970	NE2/His90
H1c	2.179	O/Leu352	N1	3.106	HH/Tyr355
S1	2.574	HE2/His90	N2	3.117	HG11/Val349
S1	2.983	HG22/Val523	H9	3.158	NH1/Arg120
O1	2.852	NE2/His90	N3	2.371	HA/Ala527
O1	1.892	HE2/His90	N3	2.625	HB1/Ser530
O1	2.406	O/Ser353	H1N3	3.045	O/Ala527
O2	2.472	HE2/His90	H12a	2.793	OG/Ser530
O2	2.201	HH11/Arg513	S2	2.901	HA/Ala527
O2	2.790	HD2/Arg513	H14	2.895	OH/Tyr385
O2	2.384	HG22/Val523	H14	2.956	OG/Ser530
H3	2.709	O/Leu352	H16	3.176	O/Met522
H6	1.922	OH/Tyr355			

A análise dos resultados de *docking* indicou que o complexo entre o composto **22** e o sítio de ligação da COX-2 é muito favorável com um *score* de *fitness* de -83,47 kcal/mol. O ligante **22** teve um ótimo padrão de ligação no sítio formando ligações de hidrogênio com os resíduos His90 e Arg513 do bolso lateral. Além disso, o anel tiofenila

também contribui para este complexo fazendo interações favoráveis com os aminoácidos Tyr385, Met522, Ala527 e Ser530.

- PIRIMIDINA 23



O ligante **23** se complexa COX-2 com o grupo SO₂Me no bolso lateral e faz ligações de hidrogênio com a His90 e Arg513 (Figura 4.3.21). Ligações de hidrogênio com tais resíduos da COX-2 já foram descritas para as sulfonamidas do inibidor SC-558 (KURUMBAIL *et al.*, 1996) e para um análogo piridínico da nimesulida (MICHAUX *et al.*, 2005). O anel fenila do composto **23** faz interações com a His90, Leu352, Ser353 e Tyr355. A porção OEt interage com a Arg120, Val349 e Tyr355 e o grupamento amina está próximo a Ala527 e Ser530. O anel tiofenila faz interações com a Tyr385, Met522 e Val523.

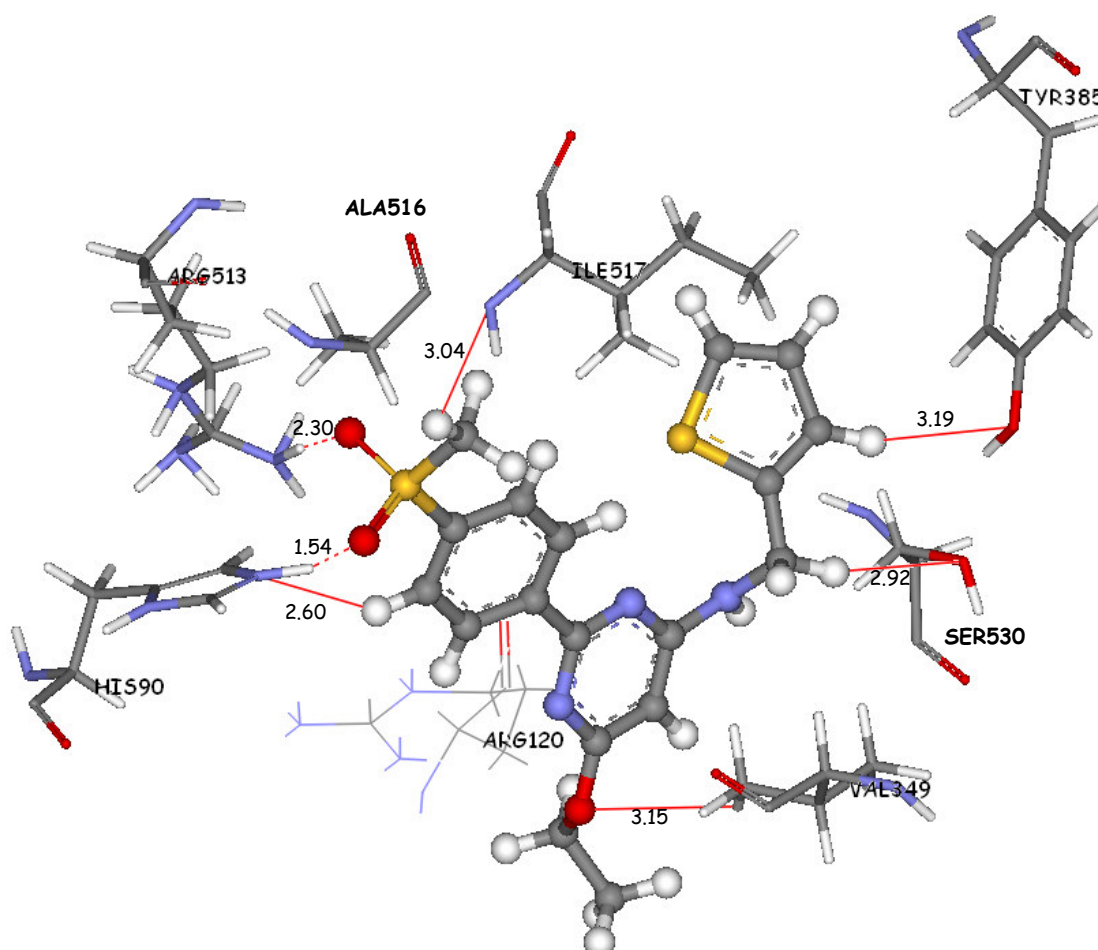


Figura 4.3.21 Pirimidina **23** no sítio da COX-2. Algumas interações em linhas vermelhas e ligações de hidrogênio em tracejado vermelho. Distâncias de interação em Å.

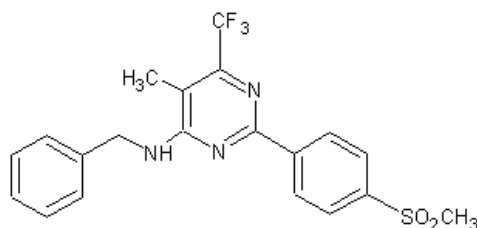
Na Tabela 4.3.22 são apresentadas as interações do complexo **23**-COX-2

Tabela 4.3.22 Interações medidas para a pirimidina **23** com a ciclooxigenase 2

Átomos do ligante	Distância (Å)	Átomos da Proteína	Átomos do ligante	Distância (Å)	Átomos da Proteína
H1a	2.498	OE1/Gln192	H3	2.600	NE2/His90
H1a	3.038	N/Ile517	H3	3.088	O/Ser353
H1c	2.764	OE1/Gln192	H4	2.054	OH/Tyr355
H1c	2.496	O/Leu352	H7	3.002	O/Leu352
S1	2.380	HE2/His90	O3	3.147	HG12/Val349
S1	3.084	HG22/Val523	O3	3.156	HE2/Tyr355
O1	2.835	O/Ser353	H17a	2.720	NH1/Arg120
O1	3.039	HE1/His90	N3	2.989	HB1/Ser530
O1	1.545	HE2/His90	N3	2.204	HA/Ala527
O2	3.188	NE2/His90	H1N3	3.023	O/Ala527
O2	2.298	HH11/Arg513	H12a	2.919	OG/Ser530
O2	2.493	HD2/Arg513	S2	3.071	HA/Val523
O2	3.125	HB2/Ala516	H14	3.191	OH/Tyr385
O2	2.469	HG22/Val523	H16	2.881	O/Met522

A análise por visualização gráfica dos cálculos de *docking* indicou que a formação de complexo entre o ligante **23** e a ciclooxigenase 2 se mostrou favorável. Além de apresentar um bom padrão de ligação, a pirimidina **23** manteve as ligações de hidrogênio com os resíduos His90 e Arg513 no bolso lateral, fato que tem sido essencial para a ligação das pirimidinas estudadas neste sítio. Os cálculos de *docking* não indicaram a formação de complexo entre o composto **23** e o sítio da ciclooxigenase 1, assim a pirimidina **23** pode ser considerada um promissor inibidor seletivo para o sítio da ciclooxigenase 2.

- PIRIMIDINA 24



A pirimidina **24** se liga à ciclooxigenase 2 com sua porção SO₂Me no bolso lateral interagindo com os resíduos His90, Gln192, Val523 e Arg513. O anel fenila ligado ao grupo SO₂Me faz interações com His90, Leu352, Tyr355 e Arg513. O grupo CF₃ interage com os aminoácidos Arg120, Val349, Tyr355, Leu359 e Leu531, inclusive forma ligações de hidrogênio com a Arg120 e Tyr355 (Figura 4.3.22). Ligações de hidrogênio com a Arg120 e Tyr355 já foram descritas para o substrato ácido araquidônico (KIEFER *et al.*, 2000) e para o

inibidor flurbiprofeno (KURUMBAIL *et al.*, 1996). O N3 amina do composto **24** interage com a Ala527 e Ser530 e o H16 faz uma interação com a Met522. As interações do composto **24** no sítio de ligação da ciclooxigenase 2 estão na Tabela 4.3.23.

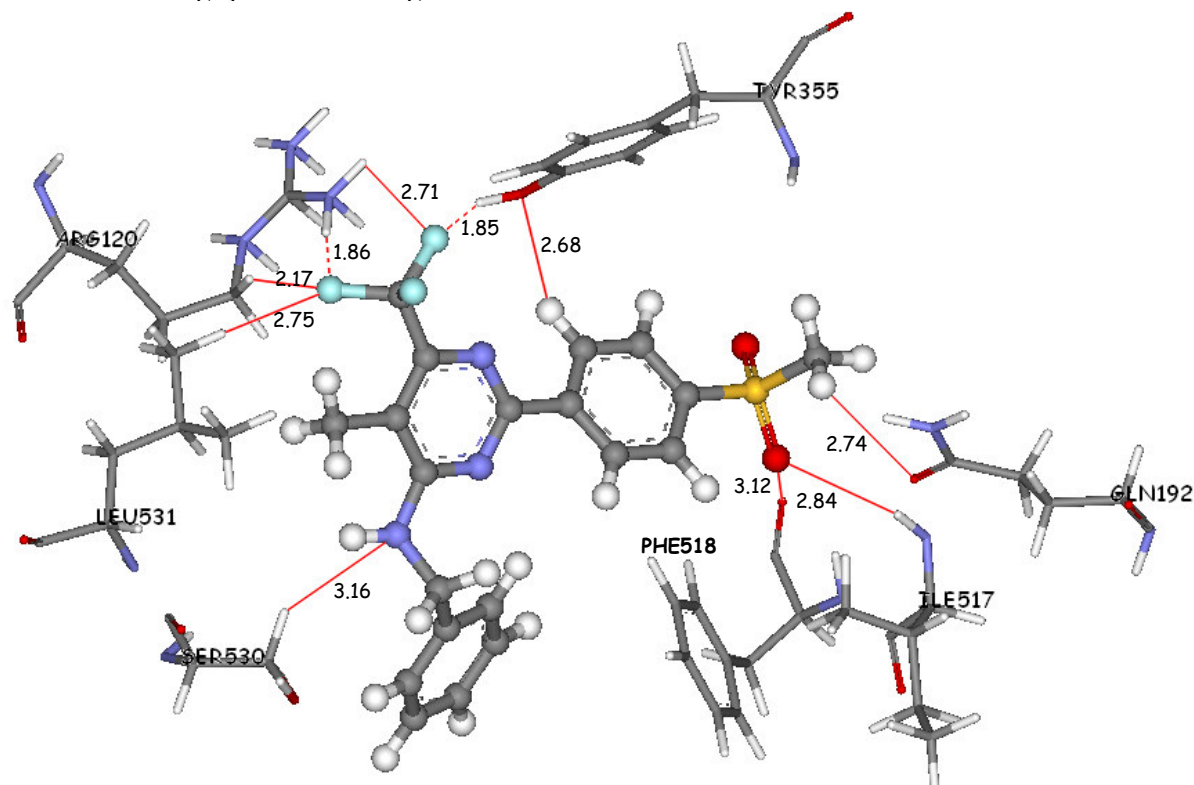


Figura 4.3.22 Composto **24** no sítio da ciclooxigenase 2. Em linhas vermelhas estão algumas interações do sítio e em tracejado vermelho as ligações de hidrogênio com os resíduos Arg120 e Tyr355. Distâncias de interação em Å.

Tabela 4.3.23 Interações medidas para a pirimidina **24** com a ciclooxigenase 2

Átomos do ligante	Distância (Å)	Átomos da Proteína	Átomos do ligante	Distância (Å)	Átomos da Proteína
H1a	2.991	OE1/Gln192	H4	3.004	O/Leu352
H1b	2.736	OE1/Gln192	H6	2.684	OH/Tyr355
H1b	2.979	O/Leu352	H7	2.529	NE2/His90
H1b	2.933	O/Ser353	H7	2.872	NH1/Arg513
H1c	2.448	O/Ser353	F1	2.754	HD12/Leu531
H1c	2.899	NE2/His90	F1	2.172	HD2/Arg120
S1	2.854	HE2/His90	F1	1.865	HH11/Arg120
S1	3.058	HG22/Val523	F2	2.483	HH11/Arg120
S1	2.707	HB2/Ala516	F2	1.848	HH/Tyr355
O1	2.455	HE2/His90	F2	2.709	HH12/Arg120
O1	2.670	HH11/Arg513	F2	1.938	HE2/Tyr355
O1	2.514	HD1/Arg513	F3	3.161	HE2/Tyr355
O1	2.844	HB3/Ala516	F3	2.885	HD12/Leu359
O1	3.061	HG22/Val523	F3	2.823	HG12/Val349
O2	3.072	HG22/Val523	N3	2.311	HA/Ala527
O2	3.117	O/Phe518	N3	3.160	HB1/Ser530
O2	1.898	HB2/Ala516	H16	3.191	SD/Met522
O2	2.841	H/Ile517	H20a	2.842	O/Ala527
H3	2.283	O/Leu352			

Apesar do ligante **24** se complexar ao sítio de ligação da ciclooxigenase 2 formando ligações de hidrogênio com os resíduos Arg120 e Tyr355, este composto perdeu as ligações de hidrogênio com a His90 e Arg513 do bolso lateral (padrão que tem se mostrado fundamental para formação de complexos entre as pirimidinas estudadas e o sítio da COX-2). Comparando a pirimidina **24** com seu análogo **1**, pode-se observar que o composto **1** se complexou mais favoravelmente a COX-2, apresentado melhor padrão de ligação neste sítio e melhor *score* de *fitness* (-82,34 e -78,99 kcal/mol para **1** e **24** respectivamente). Isto se deve principalmente ao fato da pirimidina **1** formar as ligações de hidrogênio com os resíduos His90 e Arg513.