



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA



“Análise *in silico*, *in vitro* e *in vivo* de compostos organocalcogênios como possíveis anti-inflamatórios”

NATÁLIA BAPTISTINI

**São Carlos
2015**

NATÁLIA BAPTISTINI

“Análise *in silico*, *in vitro* e *in vivo* de compostos organocalcogênios como possíveis anti-inflamatórios”

Tese apresentada ao Programa de Doutorado em Biotecnologia do Programa de Pós Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal de São Carlos.

Bolsa FAPESP DD
Processo 2011/08332-7

Orientadores: Prof^a Dr^a Ignez Caracelli
Prof. Dr. Julio Zukerman Schpector

São Carlos
2015

Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da Biblioteca Comunitária UFSCar
Processamento Técnico
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

B222as Baptistini, Natália
Análise in silico, in vitro e in vivo de
compostos organocalcogênicos como possíveis anti-
inflamatórios / Natália Baptistini. -- São Carlos :
UFSCar, 2016.
258 p.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal de São
Carlos, 2015.

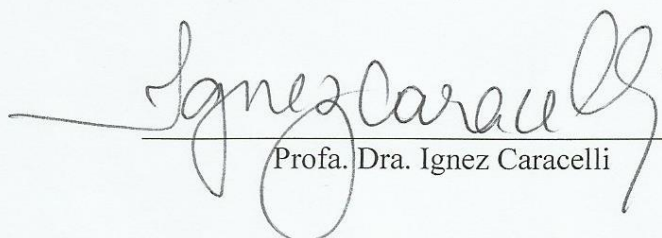
1. Biotecnologia. 2. Ciclooxigenase. 3. Anti-
inflamatório. 4. Docking molecular. 5.
Organocalcogênicos. I. Título.

Natalia Baptistini

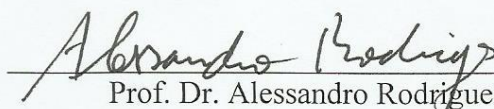
Tese de Doutorado submetida à
Coordenação do Programa de Pós-
Graduação em Biotecnologia, da
Universidade Federal de São
Carlos, como requisito parcial para
a obtenção do título de Doutor em
Biotecnologia

Aprovado em: 30/06/2015

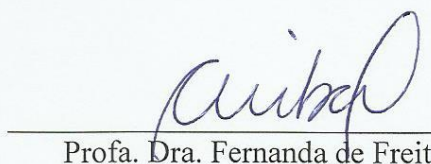
BANCA EXAMINADORA



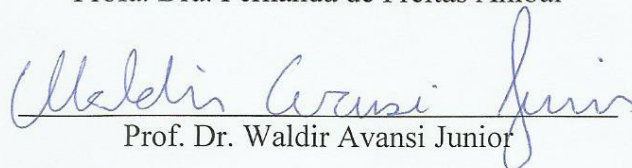
Prof. Dra. Ignez Caracelli



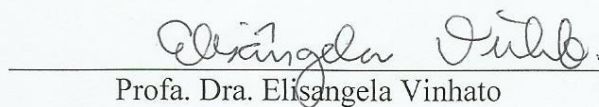
Prof. Dr. Alessandro Rodrigues



Prof. Dra. Fernanda de Freitas Anibal



Prof. Dr. Waldir Avansi Junior



Prof. Dra. Elisângela Vinhato

*O que faz andar a estrada?
É o sonho. Enquanto a gente sonhar
A estrada permanecerá viva.
É para isso que servem os caminhos,
Para nos fazerem parentes do futuro.*

Mia Couto

Agradecimentos

Aos meus pais, José Aparecido Baptistini e Maria Petronilha Basílio Baptistini, por todo apoio de sempre, inclusive nas decisões mais confusas e insanas.

À profa. Dra. Ignez Caracelli e ao prof. Dr. Júlio Zukerman Schpector pela orientação e dedicação e pela oportunidade de desenvolver o projeto.

À FAPESP pela bolsa cedida para realização do trabalho.

À profa. Dra. Fernanda de Freitas Anibal pela colaboração e por ter cedido o laboratório para os experimentos in vitro e in vivo.

Ao grupo do professor Paulo Roberto Olivato pelos compostos sintetizados e enviados para realização dos experimentos.

Ao grupo do professor Edson Garcia Soares pelo preparo das lâminas para análise imuno-histoquímica e histopatológica.

À Mirian Denise Stringasci pela colaboração com a máquina termográfica.

Aos amigos do BioMat e do LaCrEMM pela companhia e pelo apoio, principalmente Denis da Silva Correa e Sergio Ricardo Pizano Rodrigues pelo companheirismo e pelas risadas, e ao amigo Antonio César Antônio Sacco pelo auxílio com o programa para o cálculo das interações.

Aos amigos do LAP, principalmente à Greicy Kelly Bonifácio Pereira e Elisandra Montija pela ajuda durante os experimentos.

Aos meus irmãos, às minhas cunhadas e aos meus sobrinhos pelo apoio e companheirismo durante esse período.

Às amigas da graduação Marcela Vedolin, Flávia Zanella, Ariane Escobar e Jacqueline Farina por estarem sempre presentes mesmo que à distância.

À amiga Maria José Ferreira Alves por todo apoio e dedicação sempre.

A Thiago Martins.

A todos familiares e amigos (citados ou não) que sempre me apoiaram e estiveram presentes nessa etapa.

Baptistini, Natália. **Análise *in silico*, *in vitro* e *in vivo* de compostos organocalcogênicos como possíveis anti-inflamatórios.** 2015. Tese (Programa de Pós-graduação em Biotecnologia) – UFSCar, São Carlos, 2015.

RESUMO

Neste trabalho são apresentados o estudo *in silico* da formação de complexos entre compostos organocalcogênicos e as enzimas COX-1 e COX-2 realizado com o objetivo de estudar seu potencial para atuar como inibidores seletivos da COX-2, e portanto como anti-inflamatórios, bem como os resultados dos experimentos *in vitro* e *in vivo* desta atividade. Na presente pesquisa, foram modelados e estudados 15 compostos organocalcogênicos e seus enantiômeros, com estrutura similar à do fármaco seletivo celecoxibe. Os compostos da família 2-(fenilseleno)-2-(etil-X)acetofenonas-4'Y-substituídas, com Y = H, Br, CH₃, OCH₃, NO₂ e X = SO₂, SO, S, foram modelados tendo como ponto de partida a estrutura cristalográfica do composto da mesma família com Y = Br e X= SO. As estruturas tridimensionais das enzimas COX-1 e COX-2 foram obtidas no PDB. Os resultados dos cálculos de docking molecular foram avaliados considerando-se o padrão de orientações/conformações, as interações intermoleculares, as interações π e os escores. Os resultados desses experimentos permitiram propor um mecanismo de ação, bem como um modo de ligação preferencial para explicar a atuação desses compostos como possíveis inibidores da COX-2, condição necessária para atuar como anti-inflamatório. Em particular, o composto com Y = OCH₃ e X = SO₂ (5-OCH₃) é o que apresentou o melhor potencial para atuar como anti-inflamatório, sendo seletivo à COX-2. Isto porque o substituinte OCH₃ ocupou o subsítio S1 dessa enzima, mantendo a interação com a His90 e o grupo SO₂, apresentou interação com a Tyr355, aminoácido importante para o metabolismo do substrato da COX-2, o ácido araquidônico. As outras interações feitas pelo composto, como as interações π , são importantes para fixação do ligante ao sítio ativo, embora não estejam diretamente ligadas com a sua seletividade. Os experimentos *in vitro* e *in vivo* permitiram confirmar os resultados dos experimentos *in silico*, uma vez que o ensaio imunoenzimático mostrou que este composto apresenta maior inibição da COX-2 em relação à COX-1. Ainda, a atividade do composto 5-OCH₃ foi avaliada em modelo de edema de pata induzido por carragenina e zymosan, como agentes irritantes, resultando em uma diminuição significativa da espessura das patas após duas horas e diminuição da temperatura após uma hora da aplicação do agente anti-inflamatório. Uma vez que os melhores resultados foram obtidos para o modelo do edema de pata com a carragenina isto sugere o composto atua melhor no caso da inflamação aguda.

Palavras-chave: COX-2, organocalcogênicos, docking molecular, anti-inflamatórios.

Baptistini, Natália. **Analysis *in silico*, *in vitro* e *in vivo* of organochalcogens compounds as possible anti-inflammatories** 2015. Tese (Programa de Pós-graduação em Biotecnologia) – UFSCar, São Carlos, 2015.

ABSTRACT

In this work are presented the *in silico* study of the formation of complexes between organochalcogens compounds with enzymes COX-1 and COX-2 that were carried out in order to study their potential to act as selective inhibitors of COX-2 and thus as anti-inflammatories, as well as the results of *in vitro* and *in vivo* experiments of this activity. There were modeled and studied 15 organochalcogens compounds and their enantiomers, with a structure similar to that of the selective drug celecoxib. Compounds 2-(phenylseleno)-2-(2-ethyl-X)acetophenones-4'Y-substituted, with Y = H, Br, CH₃, OCH₃, NO₂ and X = SO₂, SO, S, were modeled using as starting point the crystallographic structure of the compound with Y = Br and X = SO. The three dimensional structures of the COX-1 and COX-2 enzymes were obtained from the PDB. The results of the molecular docking calculations were evaluated considering the patterns of orientations/conformations, intermolecular interactions, π interactions and scores. The results of these experiments allowed to propose a mechanism of action as well as a preferred bonding mode that would explain the activity of these compounds as possible inhibitors of COX-2, which is a condition necessary to act as anti-inflammatory. In particular, the compound where Y = OCH₃ and X = SO₂ (5-OCH₃) being selective to COX-2 is the one with the best chances to act as an anti-inflammatory. This is because the OCH₃ substituent occupied the S1 subsite of the enzyme, maintaining the interaction with His90 and the SO₂ moiety interacts with the Tyr355, an important amino acid for the metabolism of the COX-2 substrate, the arachidonic acid. The other interactions made by the compound, such as π interactions, are important for fixing the ligand in the active site, although they are not directly related to its selectivity. The experiments *in vitro* and *in vivo* confirm the *in silico* results, as the enzyme immunoassay showed that this compound exhibits greater inhibition of COX-2 relative to COX-1. Furthermore, the activity of the 5-OCH₃ compound was evaluated with the classical models of edema formation, that is the carrageenan and zymosan induced inflammation in the rat paw, resulting in a significant reduction in paw thickness after two hours and decreasing of the temperature after one hour of the application of the anti-inflammatory agent. As the best results were obtained for the model of paw edema elicited by carrageenan this suggests that the compound acts better in the case of acute inflammation.

Keywords: COX-2, organochalcogens, molecular docking, antiinflammatories

LISTA DE FIGURAS

página

Capítulo 1 – Introdução

- Figura 1. 1.** Representação da superfície da enzima COX-2. Uma região da proteína está ligada à membrana (roxo) e corresponde dos resíduos de aminoácidos Thr70 até Leu117. O grupo Heme está representado na cor azul, em *stick*. No sítio ativo, o ácido araquidônico está substituído pelo inibidor cristalográfico SC-558, o qual está representado na cor verde, em *ball and stick*. A enzima da figura tem código pdb 1cx2. Figura construída com DS Visualizer 3.0 23
- Figura 1. 2.** Representação da enzima COX-2, mostrando as estruturas secundárias, o grupo heme e o sítio ativo com um inibidor. Em destaque é apresentada a cavidade onde está inserido o ligante, com seus anéis ao fundo da cavidade e voltado para o solvente está o grupo sulfonamida. Figura construída com DS 24
- Figura 1. 3.** Esquema dos processos ocorridos na conversão do Ácido Araquidônico (AA) em Prostaglandina. Primeiramente, duas moléculas de oxigênios são incorporadas no ácido araquidônico para conversão em PGG₂. Esta é reduzida a PGH₂, a qual é convertida em outras PGs e TxA₂. (Figura retirada de BLOBAUM e MARNETT, 2007). 24

Capítulo 2 – Materiais e Métodos

- Figura 2. 1.** Etapas envolvidas no processo de docking utilizado neste trabalho. 29
- Figura 2. 2. a.** Estrutura cristalográfica de código CSD URAREL, mostrando o esqueleto de partida para a modelagem dos compostos da família PRO. **b.** Esquema mostrando o esqueleto básico e os substituintes X (S, SO, SO₂) e Y (Br, H, CH₃, OCH₃, NO₂). (*) indica um centro quiral. Desenho feito com MarvinView & MarvinSketch da ChemAxon. 32
- Figura 2. 3.** Representação bidimensional dos compostos da família PRO. São apresentados os grupos de moléculas com **a.** SO₂, **b.** SO, **c.** S, bem como os substituintes do anel não ligado ao Se: Br, H, CH₃, OCH₃ e NO₂. Foram modelados os enantiômeros R e S. 33
- Figura 2. 4.** Compostos com grupo X = SO, apresentando os centros esterogênicos: **a.** carbono metínico e **b.** enxofre sulfinílico. 34
- Figura 2. 5.** Compostos com grupo X = SO, apresentando os centros esterogênicos: **a.** de mesma configuração relativa (Cr/Sr e Cs/Ss) e **b.** de configuração opostas (Cr/Ss e Cs/Sr). 34
- Figura 2. 6.** Fluxograma da operação de um algoritmo genético (adaptação de Miranda, 2000; Corrêa, 2010). 37
- Figura 2. 7.** Etapas utilizadas para o Redocking. O complexo cristalográfico obtido no PDB, formado por uma proteína e um ligante, é separado e as duas moléculas são utilizadas em cálculos de docking para a reconstrução do complexo. Os parâmetros utilizados para os cálculos que resultam no melhor complexo serão utilizados nos estudos posteriores com a mesma proteína (receptor) e os ligantes de interesse (obtidos por modelagem molecular). 38
- Figura 2. 8.** Subsítios do sítio ativo da COX-2 em representação tipo superfície. O subsítio S1 está representado em roxo, o S2 em rosa, o S3 em laranja e o S4 em verde. 39

Capítulo 3 – Resultados e Discussão

- Figura 3. 1.** **a.** Sobreposição da COX-1 humana e da COX-1 de camundongo com os resíduos de aminoácidos presentes no sítio ativo da enzima COX-1: 3KK6. **b.** Sobreposição da COX-2 humana e da COX-2 de ovelha com os resíduos de aminoácidos presentes no sítio ativo da enzima COX-2: 1CX2. 49
- Figura 3. 2.** Representação tridimensional de apenas um dos enantiômeros dos compostos modelados a partir da estrutura de código CSD URAREL. **a.** Compostos do grupo 1, apenas com Enxofre (S). **b.** Compostos do grupo 2, com substituição do Enxofre pelo grupo Sulfóxido (SO). **c.** Compostos do grupo 3, com substituição do Enxofre pelo grupo Sulfona (SO₂). 50
- Figura 3. 3.** Composto 6 do grupo 2 (X = SO), apresentando os centros esterogênicos: a. de mesma configuração relativa (Cr/Sr e Cs/Ss) e b. de configuração opostas (Cr/Ss e Cs/Sr). 51
- Figura 3. 4.** Redocking realizado com o complexo COX-2 de código pdb 1cx2. A molécula que tem os átomos de carbono em cinza é o ligante cristalográfico e a que tem os átomos de carbono em verde (escore 78,5 kcal/mol) é a pose obtida no processo de redocking. 52
- Figura 3. 5.** Redocking realizado com o complexo COX-1 de código pdb 3kk6. A molécula que tem os átomos de carbono em cinza é o ligante cristalográfico e a que tem os átomos de em rosa carbono (escore 78,3 kcal/mol) é a pose obtida no processo de redocking. 52
- Figura 3. 6.** Em cinza está o celecoxibe cristalográfico em sua posição dentro sítio ativo de COX-1 (3kk6). Em azul está a pose do ligante celecoxibe no sítio de COX-2. Os dois complexos foram superpostos e são apresentados os ligantes, após a superposição. Observa-se que adotaram comportamento similar nas duas isoformas. 53
- Figura 3. 7.** Para poder avaliar melhor a diferença R-S, o gráfico apresenta os Δ Escore = escore R – escore S, obtidos por cálculos de docking das poses selecionadas por visualização molecular. Acima do eixo x estão os resultados preferenciais para o enantiômero R e abaixo com o S, com um Δ Escore máximo = 4,5 kcal/mol. 54
- Figura 3. 8** Ligantes da família PRO no sítio ativo da COX-2. Os ligantes são apresentados nos grupos relativos ao substituinte X (SO₂, SO, S). Também podem ser observados enantiômeros S em cima e os R na parte de baixo. Os hidrogênios estão ocultos para facilitar a comparação. 55
- Figura 3. 9.** Em cima: O sítio ativo da enzima COX-2 é apresentado e é possível observar os aminoácidos que interagem com o ligante cristalográfico, apresentados com os átomos de C em magenta, e o melhor ligante da série estudada, 5_SO₂_OCH₃, com os átomos de C em azul, superpostos. A superfície de van der Waals foi calculada para o ligante cristalográfico, mas também é adequada para envolver o ligante selecionado. Embaixo: Os ligantes cristalográficos e o melhor composto da família PRO, sendo que na posição onde o ligante cristalográfico apresenta o anel triazol, os ligantes apresentam o carbono assimétrico. 56
- Figura 3. 10.** Pose dos compostos com X = SO no sítio ativo da enzima COX-2. É possível observar os aminoácidos que interagem com o ligante cristalográfico, apresentados com os átomos de C em laranja, e o ligante 10_SO_OCH₃, com os átomos de C em azul, superpostos. 57
- Figura 3. 11.** Ligantes da família PRO no sítio ativo da COX-1. Os ligantes são apresentados nos grupos relativos ao substituinte X (SO₂, SO, S). À esquerda podem ser observados os enantiômeros S e à direita os R. O grupo que apresenta poses mais similares é o do substituinte X = SO₂. Os hidrogênios estão ocultos para facilitar a comparação. 59

- Figura 3. 12.** Para poder avaliar melhor a diferença R-S, o gráfico apresenta os Δ Escore = escore R – escore S, obtidos por cálculos de docking das poses selecionadas por visualização molecular. Acima do eixo x estão os resultados que preferenciais para o enantiômero R e abaixo com o S, com um Δ Escore máximo = 8,6 kcal/mol. 59
- Figura 3. 13.** Representação da microplaca após incubação. Os poços com coloração amarelada durante o experimento (destacados com tracejado rosa), indicam que a inibição não ocorreu. 65
- Figura 3. 14.** Curva Padrão de Prostaglandina obtida. No eixo y encontram-se os valores de %B/B₀ calculados utilizando os valores de absorbância dos poços NSB, de B₀ e das amostras S1 à S8. No eixo x encontram-se os valores da concentração de prostaglandina em pg/mL. 66
- Figura 3. 15.** Valores de concentração de prostaglandina (eixo x) com as amostras dos compostos da família PRO, em concentração de 100 nM, para COX-1(em rosa) e COX-2 (em verde) e valores de %B/B₀ (eixo y), comparados com a Curva Padrão Obtida de PG (em amarelo). 66
- Figura 3. 16.** Valores de inibição para COX-2 na concentração de 100 nM. O composto 5_ OCH₃ apresentou melhor taxa de inibição para essa enzima. 67
- Figura 3. 17.** Valores de inibição para COX-1 na concentração de 100 nM. O composto 9_ NO₂ apresentou melhor taxa de inibição para essa enzima. 68
- Figura 3. 18.** Valores de inibição dos compostos à 100 nM para COX-2 (linha em azul) e para COX-1 (linha em rosa). O composto 5-OCH₃ obteve maior taxa de inibição para COX-2 (50%) e pequena taxa de inibição para COX-1 (próximo de 10%). O composto 6-Br foi o segundo melhor. 68
- Figura 3. 19.** Ocupação dos subsítios obtida por experimentos *in silico* para COX-2 para dois compostos e seus enantiômeros. **(a)** e **(b)** Observa-se que o substituinte Y ocupa o subsítio S1 tanto no caso do enantiômero R quanto do S. **(c)** e **(d)** O substituinte Y ocupa o subsítio S1 (c) e S2 (d), mostrando comportamento diferente para os enantiômeros. 70
- Figura 3. 20.** Representação do substituinte Y = OCH₃ (em destaque pelo círculo vermelho) no subsítio S1 (em roxo) da enzima COX-2. 71
- Figura 3. 21.** Média da variação da espessura das patas após 1, 2, 3, 4 e 24 horas da aplicação da Carragenina para cada grupo. O eixo das ordenadas apresenta o tempo em horas e o eixo das abcissas apresenta a espessura em mm. 76
- Figura 3. 22.** Média da variação da espessura das patas após 1, 2, 3, 4 e 24 horas da aplicação do Zymosan para cada grupo. O eixo das ordenadas apresenta o tempo em horas e o eixo das abcissas apresenta a espessura em mm. 77
- Figura 3. 23.** Média da variação da espessura das patas após 1, 2, 3, 4 e 24 horas da aplicação da Carragenina, para cada grupo. O eixo das ordenadas apresenta o tempo em horas e o eixo das abcissas apresenta a espessura em mm. 81
- Figura 3. 24.** Média da variação da espessura das patas após 1, 2, 3, 4 e 24 horas da aplicação do Zymosan, para cada grupo. O eixo das ordenadas apresenta o tempo em horas e o eixo das abcissas apresenta a espessura em mm. 82
- Figura 3. 25.** Temperaturas obtidas pela câmara termográfica para o animal do grupo 5_ OCH₃ - Carragenina. A temperatura varia de 17,6°C (coloração azul) até 33,3°C (coloração vermelha). Pode ser observado que a pata esquerda, a qual recebeu o agente inflamatório, possui maior temperatura e coloração mais avermelhada que a pata direita, que não recebeu o agente. A imagem foi analisada com o programa SmartView® 3.5 (Fluke, EUA). 83

- Figura 3.26.** Média da variação das temperaturas da pata esquerda para cada grupo com Carragenina. O eixo das ordenadas apresenta o tempo em horas e o eixo das abcissas apresenta a temperatura em °C. 84
- Figura 3.27.** Média da variação das temperaturas da pata esquerda para cada grupo com zymosan. O eixo das ordenadas apresenta o tempo em horas e o eixo das abcissas apresenta a temperatura em °C. 84

LISTA DE TABELAS

	página
Capítulo 1 – Introdução	
Tabela 1. 1. Classificação química dos AINEs de acordo com sua estrutura química e exemplos	22
Tabela 1. 2. Local de ação e efeitos fisiológicos das prostaglandinas (PGs)	25
Capítulo 2 – Materiais e Métodos	
Tabela 2. 1. Fontes das estruturas das enzimas COX-1 e COX-2	31
Tabela 2. 2. Separação dos animais por grupos	43
Tabela 2. 3. Doses dos compostos em mg / Kg	43
Capítulo 3 – Resultados e Discussão	
Tabela 3. 1. Alinhamento das sequencias das enzimas COX-1 humana, de camundongo e de ovelha (código pdb 3KK6)	48
Tabela 3. 2. Alinhamento das sequências das enzimas COX-2 humana, de camundongo (código pdb 1CX2) e de ovelha	48
Tabela 3. 3. Escores dos complexos calculados formados entre os ligantes PRO* e a enzima COX-2	54
Tabela 3. 4. Escores dos complexos formados entre os ligantes PRO* com X = SO e a enzima COX-2	57
Tabela 3. 5. Escores dos complexos calculados formados entre os ligantes PRO e a enzima COX-1	58
Tabela 3. 6. Interações dos ligantes celecoxibe, SC-558, R-PRO e S-PRO com os resíduos de aminoácido de COX-1 ^a	62
Tabela 3. 7. Interações dos ligantes celecoxibe ^a , SC-558, R-PRO e S-PRO com os resíduos de aminoácido de COX-2 ^a	63
Tabela 3. 8. Equivalência entre aminoácidos das estruturas de código pdb 1CX2 e 3LN1	64
Tabela 3. 9. Ocupação dos subsítios pelo substituinte Y em COX-2*	70
Tabela 3. 10. Ocupação dos subsítios pelo substituinte Y em COX-1*	73
Tabela 3. 11. Desenho do experimento I e do experimento II	74
Tabela 3. 12. Média da variação da espessura (mm) imediatamente após a aplicação da carragenina para todos os grupos	75
Tabela 3. 13. Média da variação da espessura (mm) imediatamente após a aplicação do Zymosan para todos os grupos	75
Tabela 3. 14. Comparação da variação da temperatura retal dos grupos com zymosan e com carragenina	78
Tabela 3. 15. Média da variação da espessura (mm) imediatamente após a aplicação do Carragenina para todos os grupos	80
Tabela 3. 16. Média da variação da espessura (mm) imediatamente após a aplicação do Zymosan para todos os grupos	80
Tabela 3. 17. Média das temperaturas para os grupos com carragenina	85

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AA	<i>Ácido Araquidônico</i>
AINEs	<i>Anti-inflamatórios Não Esteroidais</i>
B ₀	<i>Ligação máxima</i>
BC	<i>Background</i>
Blk	<i>Branco</i>
COX-1	<i>Ciclooxigenase-1</i>
COX-2	<i>Ciclooxigenase-2</i>
DMSO	<i>Dimetilsulfóxido</i>
EIA	<i>Ensaio Imunoenzimático</i>
HCl	<i>Ácido Clorídrico</i>
KOH	<i>Hidróxido de Potássio</i>
NSB	<i>Ligação não-específica</i>
PG	<i>Prostaglandina</i>
PGD ₂	<i>Prostaglandina D₂</i>
PGF _{2α}	<i>Prostaglandina F_{2α}</i>
PGH ₂	<i>Prostaglandina H₂</i>
PGI ₂	<i>Prostaglandina I₂</i>
SnCl ₂	<i>Cloreto de Estanho (II)</i>
TXA ₂	<i>Tromboxano A₂</i>

SUMÁRIO

página

Resumo

Abstract

Lista de Figuras

Lista de Abreviaturas e Siglas

Apresentação

18

Capítulo 1 – Introdução

21

1.1. Processo Inflamatório

21

1.1.1. A Enzima COX-2

23

1.1.2. As Prostaglandinas e as Medidas de Atividade Biológica

24

1.1.3. Desenvolvimento Racional de Fármacos e o Docking

25

1.2. Justificativa e Objetivos

26

Capítulo 2 – Materiais e Métodos

29

2.1 Experimentos *in silico*

29

2.1.1 Coordenadas das Macromoléculas

30

2.1.1.1 Alinhamento e Homologia da Estrutura Tridimensional do Receptor

30

2.1.2 Coordenadas dos Ligantes

31

2.1.2.1 Compostos da Família PRO

31

2.1.2.1.1 Compostos da Família PRO com Grupo X = SO

33

2.1.3 Docking Molecular

34

2.1.3.1 Algoritmo Genético

36

2.1.4 Redocking

37

2.1.5 Análise dos Subsítios e das Interações π

38

2.2. Experimentos *in vitro*

40

2.2.1. Ensaio Imunoenzimático – Inibição COX-1 e COX-2

40

2.3. Experimento *in vivo*

40

2.3.1 Edema de Pata

40

2.3.1.1. Inflamação Aguda e Edema de Pata

40

2.3.1.2. Experimento I

44

2.3.1.3. Experimento II

44

Capítulo 3 – Resultados e Discussão

47

3.1. Experimentos *in silico*

47

3.1.1. Alinhamento e Homologia da Estrutura Tridimensional do Receptor

47

3.1.2. Modelagem Molecular dos Compostos da Família dos Organocalcogênicos

49

3.1.2.1. Compostos da Família PRO com Grupo X = SO

51

3.2. Redocking

51

3.2.1. Enzima COX-2	51
3.2.2 Enzima COX-1	52
3.3. Análise das interações intermoleculares dos complexos cristalográficos	52
3.4. Estudos de Docking de Compostos da Família PRO	53
3.4.1. Estudos de Docking na Enzima COX-2	53
3.4.1.1. Compostos da Família PRO com Grupo X = SO	57
3.4.2 Estudos de Docking na Enzima COX-1	58
3.4.3 Análise dos Subsítios e das Interações π	58
3.5. Experimentos <i>in vitro</i>	64
3.5.1. Resultados dos Experimentos <i>in vitro</i>	64
3.5.1.1. Microplaca	65
3.5.1.2. Curva Padrão de Prostaglandina	65
3.5.1.3. Resultados de Inibição para COX-2	67
3.5.1.4. Resultados de Inibição para COX-1	67
3.5.1.5. Comparação das Atividades Biológicas dos Compostos PRO com as Enzimas COX-1 e COX-2	68
3.5.2. Comparação Entre Resultados Obtidos <i>in vitro</i> e <i>in silico</i>	69
3.6. Experimentos <i>in vivo</i>	73
3.6.1. Resultados dos Experimentos <i>in vivo</i>	73
3.6.1.1. Experimento I	74
3.6.1.1.1. Espessura da Pata	74
A. Grupos com Carragenina	74
B. Grupos com Zymosan	75
C. Comparação entre os grupos	76
3.6.1.1.2. Temperatura	77
3.6.1.1.3. Comparação entre Temperatura e Espessura	79
3.6.1.2. Experimento II	79
3.6.1.2.1. Espessura das Patas	79
A. Grupos com Carragenina	79
B. Grupos com Zymosan	80
C. Comparação entre os grupos	80
3.6.1.2.2. Temperatura	83
A. Grupos com Carragenina	83

B. Grupos com Zymosan	84
C. Comparação entre os grupos	85
3.6.1.2.3. Comparação entre Temperatura e Espessura	85
Capítulo 4 – Conclusões	88
Visão global e conclusões	88
Perspectivas	90
Referências	92
Anexo	
2.1. Aprovação do Comitê de Ética	98
Apêndices	
3.1. Alinhamento e homologia da estrutura tridimensional do receptor	101
3.2. Interações entre ligantes e receptores	103
3.3. Interações pi dos complexos da família PRO com as enzimas COX-1 e COX-2	133
3.4. Ocupação dos subsítios das enzimas COX-1 e COX-2	169
3.5. Espessura da pata - Experimento I e II	179
3.6. Imagens obtidas pela câmera termográfica	217

Apresentação

Este trabalho se insere nas linhas de pesquisa do Grupo de Física Teórica de Materiais e Biomoléculas (BioMat) do Departamento de Física e do Laboratório de Cristalografia, Estereodinâmica e Modelagem Molecular (LaCrEMM) ambos da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar). Dentre os trabalhos de pesquisa desenvolvidos nestes grupos encontram-se a busca de inibidores para enzimas relacionadas com processos inflamatórios como a ciclooxigenase (COX) e a nítrico óxido sintase (NOs).

Em 2009, comecei minha iniciação científica com estudos de docking molecular envolvendo as enzimas COX-1 e COX-2 com compostos organocalcogênicos cujas estruturas cristalinas já tinham sido depositadas no Cambridge Structural Database (CSD), apoiada por uma bolsa FAPESP (Processo 2009/10290-0). Estes estudos visavam apenas determinar a atividade dos compostos *in silico*. Em 2010, outros estudos realizados, por outros membros do grupo, realizaram a simulação computacional com compostos com atividade biológica conhecida e visavam associar os resultados dos estudos *in silico* com os realizados *in vitro* (ARMELIN, 2010; CASTILHO, 2011).

Também foram desenvolvidos estudos com COX e NOs, em associação com outros grupos de pesquisa, um de síntese orgânica e outro que realizou os experimentos *in vitro*. Nestes casos os experimentos *in silico* foram realizados no BioMat e LaCrEMM (STEFANI, BOTTESELLE et al., 2012; STEFANI, GUEOGJAN et al., 2012). Os estudos de docking ajudaram a entender os mecanismos de ação dos compostos.

O trabalho presente, apoiado por uma bolsa FAPESP de doutorado direto (Processo 2011/08332-7), envolve o estudo da formação de complexos entre compostos organocalcogênicos e as enzimas COX-1 e COX-2. Os 15 compostos estudados foram sintetizados no grupo do Professor Paulo Roberto Olivato (IQ-USP) (CERQUEIRA Jr., 2012). Com o intuito de propor novos possíveis fármacos esses compostos foram escolhidos por apresentarem estrutura semelhante à de anti-inflamatórios comercializados, como o Celecoxibe. Além disso, foram realizados testes *in vitro* de atividade nas enzimas, para o que foi importante o apoio recebido da Professora Fernanda de Freitas Anibal (Departamento de Morfologia e Patologia – UFSCar) que disponibilizou seu laboratório para que os ensaios fossem realizados. Os resultados de docking e estes ensaios

permitiram selecionar alguns compostos para os estudos de atividade *in vivo*, que foram realizados com a permissão do Comitê de Ética da UFSCar.

Os trabalhos realizados estão descritos da seguinte forma: o Capítulo 1 apresenta as características das enzimas estudadas, bem como suas funções, com ênfase em sua estrutura tridimensional. O Capítulo 2 contempla os materiais e métodos, os quais incluem os estudos *in silico*, *in vitro* e *in vivo*. Os estudos *in silico* envolvem alinhamento de sequências de enzimas, simulação computacional por meio de docking molecular, modelagem dos compostos estudados e visualização molecular para avaliação das interações intermoleculares e posicionamento dos compostos dentro de subsítios das enzimas. Os estudos *in vitro* e *in vivo* envolvem ensaio imunoenzimático para atividade de inibição das enzimas e presença de citocinas anti e pró-inflamatórias e análises histopatológicas e imunohistoquímicas. Nos estudos *in vivo*, em que foram realizados testes de edema de pata, foi feita uma inovação quanto à medida de temperatura dos edemas, com a implementação de análise termográfica para a avaliação dos edemas.

No Capítulo 3, são apresentados e discutidos os resultados dos cálculos e análises de docking, com ênfase na avaliação do modo de ligação dos compostos às enzimas, bem como os tipos de interações presentes nos complexos formados e na influência das estruturas e configurações dos ligantes. Além disso, são apresentados os resultados dos experimentos *in vitro* e *in vivo*, bem como a relação destes com os resultados obtidos por meio da simulação computacional.

No Capítulo 4 é apresentada uma visão geral do trabalho e as conclusões.

No Capítulo 5 estão as referências.

No Anexo encontra-se a aprovação do Comitê de Ética da UFSCar.

Finalmente, nos apêndices estão organizados os dados referentes ao alinhamento e homologia da estrutura tridimensional do receptor, as tabelas de interações entre ligantes e receptores, as tabelas mostrando as interações π dos complexos da família PRO com as enzimas COX-1 e COX-2, a ocupação dos subsítios das enzimas COX-1 e COX-2, os dados dos experimentos para medida de espessura da pata e as imagens obtidas pela câmera termográfica. Optou-se por adotar os apêndices devido ao grande número de dados nos experimentos.

CAPÍTULO 1

Introdução

1.1. PROCESSO INFLAMATÓRIO

Há cerca de 20 anos, foram descobertas duas isoformas da enzima ciclooxigenase (COX)¹: a COX-1, com função fisiológica constitutiva que participa de uma série dos processos do organismo como a proteção da mucosa gástrica, hemostasia e regulação de perfusão renal e a COX-2, responsável pelos fenômenos da inflamação e produção das prostaglandinas que produzem contração uterina (SCHELLACK, 2012). Posteriormente mais uma isoforma foi encontrada, a COX-3, mais similar à COX-1 (BAZAN, 2001; BOTTING e AYOUB, 2005). A enzima COX-2 tem sido considerada como a isoforma responsável pela síntese de prostaglandinas envolvendo processos patológicos, em estados agudos ou crônicos da inflamação e tem sido uma das enzimas alvo para busca de fármacos.

A enzima ciclooxigenase (COX) é uma glicoproteína dimérica integral da membrana e está envolvida no processo inflamatório. As isoformas COX-1 e COX-2 têm sido consideradas como alvos de diversos anti-inflamatórios não-esteroides (abreviadamente, AINEs ou NSAIDs, do inglês *Nonsteroidal anti-inflammatory drugs*) como a aspirina, ibuprofeno, meloxicam, piroxicam, paracetamol, diclofenaco, entre outros (KUMMER & COELHO, 2002). Novos inibidores da enzima COX-2 tem sido objeto de estudo a fim de aumentar a especificidade desses compostos e diminuir os efeitos adversos causados (CATIZONE, 2012).

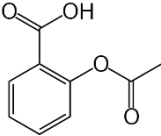
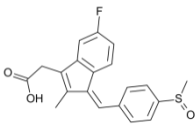
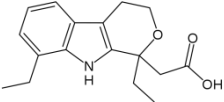
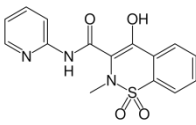
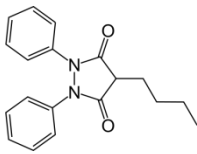
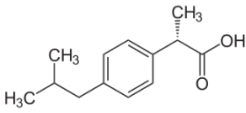
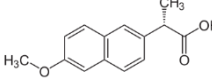
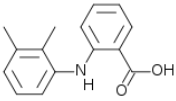
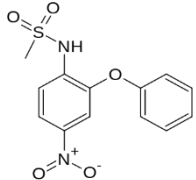
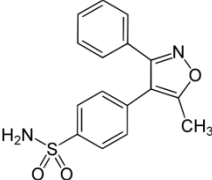
Os AINEs podem ser divididos em 4 categorias (SÜLEYMAN et al., 2007):

1. Inibidores seletivos da COX-1, como a aspirina;
2. Inibidores não seletivos: anti-inflamatórios com razão de $0,5 < IC_{50} \frac{COX-1}{COX-2} < 3,0^2$;
3. Inibidores relativamente seletivos da COX-2, com razão de $10 < IC_{50} \frac{COX-1}{COX-2} < 20$, como meloxicam, nimesulida, diclofenaco;
4. Inibidores altamente seletivos da COX-2, com razão $140 < IC_{50} \frac{COX-1}{COX-2} < 250$ como o SC-58125 (modelo do celecoxibe) e o rofecoxibe com razão $IC_{50} \frac{COX-1}{COX-2} > 400$;

¹ A enzima também é conhecida como Prostaglandina H sintase (PGHS).

² IC_{50} : A concentração de um inibidor que é necessária para inibir 50% atividade da enzima, *in vitro*.

A Tabela 1.1 mostra a classificação dos AINEs. Esta classificação está baseada na estrutura química dos compostos.

Tabela 1.1. Classificação química dos AINEs de acordo com sua estrutura química e exemplos				
salicilatos	derivados indólicos	derivados arilo-acéticos	ácidos enólicos	
			oxicams	pirazolonas
				
exemplo: aspirina	exemplo: sulindac	exemplo: etodolaco	exemplo: piroxicam	exemplo: fenilbutazona
derivados arilpropionícos		Fenematos	vários	coxibes
				
exemplo: (S)-ibuprofeno	exemplo: naproxeno	exemplo: ácido mefenâmico	exemplo: nimesulida	exemplo: valdecoxib

Os AINEs, embora com estruturas químicas diferentes, apresentam efeitos terapêuticos similares bem como os efeitos colaterais:

Efeitos benéficos dos AINEs: diminuem a resposta inflamatória; reduzem a dor de causa inflamatória e baixam a febre (SÜLEYMAN et al., 2007).

Efeitos adversos AINEs - COX-2: podem causar problemas gastrintestinais, como úlceras, insuficiência renal e hepática. Esses problemas são causados pela inibição da COX-1, uma vez que as Prostaglandinas (PGs) produzidas por esta enzima atuam como protetora da mucosa gástrica. Também podem aumentar o nível sérico da creatina induzindo disfunção renal aguda e nefrite intersticial, reduzir a taxa de filtração glomerular. No fígado, pode aumentar níveis de enzimas, causando a granulocitose, entre outros problemas graves (SÜLEYMAN et al., 2007). No caso dos problemas renais, os anti-inflamatórios seletivos podem agravar a situação dos pacientes que já apresentam alterações no rim de modo semelhante aos anti-inflamatórios não seletivos, apesar de

afetarem menos aqueles que não apresentam alterações neste órgão (MELGAÇO et al., 2010).

1.1.1. A ENZIMA COX-2

A enzima COX-2 tem como substrato o ácido araquidônico (AA) que é convertido, por oxigenação, em prostaglandina G₂ (PGG₂), e esta é subsequentemente reduzida à prostaglandina H₂ (PGH₂), devido à ação de hidropoxidase dessa enzima. Em seguida a PGH₂ é convertida nas diversas prostaglandinas (PGs) produzidas por essa enzima (FITZGERALD e MARDINI, 2001; SILVA et. al., 2003). As etapas descritas ocorrem em dois sítios distintos: no sítio ciclooxigenase e no sítio heme-peroxidase (SILVA et. al., 2003), apresentados na Figura 1.1.

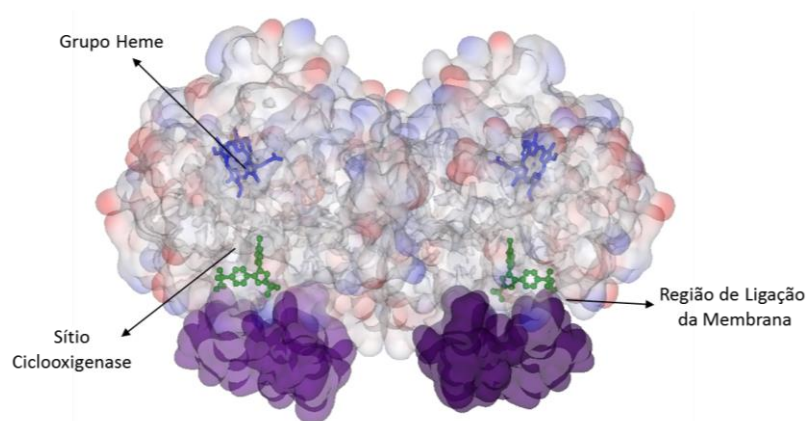


Figura 1.1. Representação da superfície da enzima COX-2. Uma região da proteína está ligada à membrana (roxo) e corresponde dos resíduos de aminoácidos Thr70 até Leu117. O grupo Heme está representado na cor azul, em *stick*. No sítio ativo, o ácido araquidônico está substituído pelo inibidor cristalográfico SC-558, o qual está representado na cor verde, em *ball and stick*. A enzima da figura tem código pdb 1cx2. Figura construída com DS Visualizer 3.0.

Na Figura 1.2 podem ser observados detalhes da proteína COX-2, com o inibidor SC58 (*1-phenylsulfonamide-3-trifluoromethyl-5-parabromophenylpyrazole*), uma molécula protótipo do celecoxibe, da estrutura cristalográfica de código pdb 1cx2.

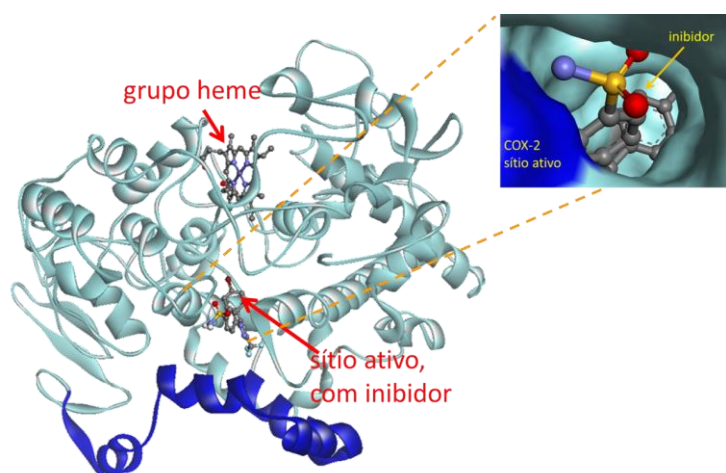


Figura 1.2. Representação da enzima COX-2, mostrando as estruturas secundárias, o grupo heme e o sítio ativo com um inibidor. Em destaque é apresentada a cavidade onde está inserido o ligante, com seus anéis ao fundo da cavidade e voltado para o solvente está o grupo sulfonamida. Figura construída com DS Visualizer 3.5.

1.1.2. AS PROSTAGLANDINAS E AS MEDIDAS DE ATIVIDADE BIOLÓGICA

As isoformas COX-1 e COX-2 são responsáveis pelo metabolismo do ácido araquidônico e produção de prostaglandinas e tromboxanos, conforme apresentado na Figura 1.3.

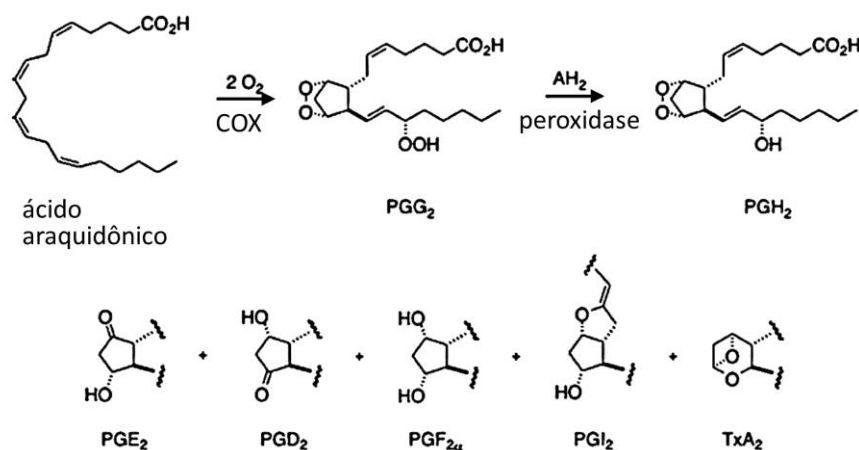


Figura 1.3 Esquema dos processos ocorridos na conversão do Ácido Araquidônico (AA) em Prostaglandina. Primeiramente, duas moléculas de oxigênio são incorporadas ao ácido araquidônico para conversão em PGG₂. Esta é reduzida a PGH₂, a qual é convertida em outras PGs e TxA₂. (Figura retirada de BLOBAUM e MARNETT, 2007).

Cada produto resultante da conversão de PGH₂ atua em locais específicos, com diferentes efeitos fisiológicos. Também, para cada produto produzido pela conversão do ácido araquidônico há um receptor específico, que detecta e sinaliza a presença de tais

moléculas (BLOBAUM & MARNETT, 2007; ABRAHÃO, 2009; CUNHA, 2012), como indicado na Tabela 1.2.

Tabela 1.2. Local de ação e efeitos fisiológicos das prostaglandinas (PGs)

Prostaglandina (PG)	Local de ação	Efeitos fisiológicos	Receptores
PGE ₂	Cérebro Rins Plaquetas Endotélio	Ventilação Hiperalgisia Febre Diurese Imunomodulação	EP1, EP2, EP3 e EP4
PGD ₂	Cérebro Mastócito Vias aéreas	Contração do músculo liso Inibição da agregação das plaquetas	DP1 e DP2
PGF _{2α}	Útero Olhos Vias aéreas Músculo liso vascular	Contração do músculo liso Broncoconstrição Risco de abortamento	FP
PGI ₂	Endotélios Rins Plaquetas	Vasodilatação Inibição da agregação plaquetária	IP
TXA ₂	Endotélios Rins Plaquetas Macrófagos	Angiogenese	TP

A PGF_{2α} é o produto dessa reação, medida por ensaios biológicos, por exemplo, para testar a atividade inibitória de compostos candidatos a anti-inflamatórios frente às enzimas COX-1 e COX-2.

1.1.3. DESENVOLVIMENTO RACIONAL DE FÁRMACOS E O DOCKING

O processo de desenvolvimento de novos fármacos requer normalmente entre 10 e 15 anos desde a descoberta até a aprovação pela FDA (*U.S. Food and Drug Administration*). O desenvolvimento de novas técnicas computacionais e de novos e mais poderosos hardwares têm permitido e ampliado o uso de métodos *in silico*. Ferramentas computacionais são aplicadas para facilitar várias fases da pesquisa como para modelar os dados experimentais. Docking molecular é uma técnica computacional que vem sendo utilizada com sucesso em ambas, na pesquisa e na explicação dos dados experimentais e tem tornado possível a identificação e otimização de compostos-líder (MOUSTAKAS et al., 2006; RESTER et al., 2006; CARACELLI et al., 2012; STEFANI et al., 2012).

A simulação computacional tornou-se cada vez mais importante em termos de aplicação prática da modelagem preditiva no processo de pesquisa e desenvolvimento, também na indústria farmacêutica. Ferramentas para exploração de estruturas de proteínas ou conjuntos de ligantes conhecidos por ligar em alvos particulares podem ser utilizadas para prever o modo de ligação e a atividade (KIRCHMAIR et al., 2008).

Softwares de docking, baseados nas mais diversas metodologias e algoritmos, estão sendo cada vez mais utilizados na descoberta de novos fármacos. O problema de modelar a "realidade" é o número grande de fatores envolvidos, tais como a flexibilidade do ligante e receptor, a coordenação de metais, ligação covalente, transferências de cargas, e estas últimas em particular são difíceis de serem parametrizadas de forma que muitas vezes são simplesmente ignoradas. Entretanto não deve ser esquecido que a precisão dos resultados depende da quantidade e qualidade das informações fornecidas ao programa (CORBEIL, THERRIEN & MOITESSIER, 2009). É interessante observar que um pesquisador experiente muitas vezes pode descobrir se um bolso pode ser um potencial sítio de ligação ou uma se molécula obedece a certas regras de semelhança com algum fármaco. No entanto, colocar esses conhecimentos em algoritmos de computador é praticamente impossível. Por conseguinte, é altamente recomendável não se ater a estratégias totalmente automatizadas nesta área (KLEBE, 2006).

Para alguns projetos, especialmente aqueles desenvolvidos em laboratórios acadêmicos, o uso de simulação computacional como o docking, é a melhor forma de aceder a um grande espaço de configuração química, sem a necessidade de material e infraestrutura laboratorial.

1.2. JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS

Embora haja no mercado inúmeros fármacos anti-inflamatórios, como descrito anteriormente, há necessidade de novos candidatos à anti-inflamatórios mais seletivos à COX-2.

O objetivo deste projeto é estudar a formação de complexos de uma série de compostos calcogênios com as enzimas COX-1 e COX-2 e se algum destes pode ser considerado candidato a fármaco.

A etapa inicial para estudar a formação de complexos se baseia na modelagem molecular dos compostos, nos estudos de docking molecular, na análise de aspectos estereoquímicos dos compostos calcogênicos que foram sintetizados no grupo do Professor Paulo Roberto Olivato (IQ-USP) e denominados compostos PRO.

Os objetivos específicos são:

- estudar e propor mecanismos de ligação dos compostos calcogênicos PRO nas enzimas COX-1 e COX-2;
- selecionar os melhores compostos por estudos de docking molecular, para estudos de atividade biológica;
- realizar estudos *in vitro*, por meio de ensaios biológicos, para medida de atividade de inibição das enzimas COX-1 e COX2;
- a partir dos resultados obtidos *in silico* e *in vitro*, realizar estudos *in vivo*, utilizando de modelos animais para avaliar a ação dos compostos estudados que apresentem maior atividade de inibição para COX-2 e ao mesmo tempo menor inibição para COX-1;
- relacionar os dados experimentais *in silico*, *in vitro* e *in vivo* obtidos durante o desenvolvimento do projeto;
- sugerir possíveis relações estrutura-atividade para os compostos estudados;
- sugerir aplicações técnicas e/ou terapêuticas para os compostos estudados.

CAPÍTULO 2

Materiais e Métodos

Este capítulo apresenta a metodologia referente aos experimentos realizados *in silico*, *in vitro* e *in vivo*. O primeiro trata da simulação computacional realizada, bem como da modelagem molecular, visualização e análise das interações dos complexos formados. O segundo trata de ensaios imunoenzimáticos para análise de atividade inibitória nas enzimas COX-1 e COX-2. O terceiro e último aborda experimentos realizados com camundongos e extração dos órgãos para posteriores análises imuno-histoquímica e histopatológica.

2.1. EXPERIMENTOS *IN SILICO*

Essa parte do trabalho foi desenvolvido no BioMat – Grupo de Física Teórica de Materiais e Biomoléculas, do Departamento de Física da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar).

As etapas envolvidas no processo de docking estão apresentadas na Figura 2.1 a seguir.

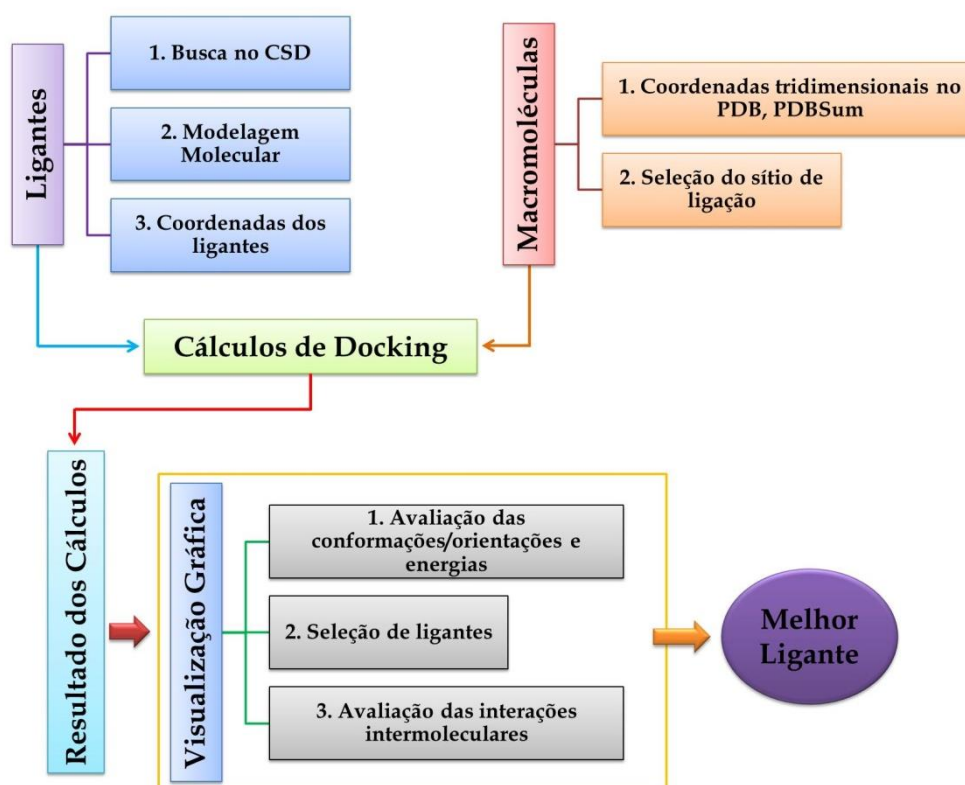


Figura 2.1. Etapas envolvidas no processo de docking utilizado neste trabalho.

Os estudos *in silico* foram realizados por simulação computacional utilizando o método de docking molecular, que consiste em obter o melhor ajuste entre receptor e ligante para a formação de complexos. O programa GOLD 5.0 foi utilizado para esses cálculos.

Os complexos formados foram analisados por visualização molecular com o programa DS Visualizer 3.0.

Os compostos estudados pertencentes à família das 2-(fenilseleno)-2-(etil-X)acetofenonas-4'-Y-substituídas, com Y = H, Br, CH₃, OCH₃, NO₂ e X = SO₂, SO, S foram sintetizados pelo grupo do professor Paulo Roberto Olivato (USP) e são citados neste trabalho como Compostos da Família PRO. Como suas estruturas não estão apresentadas em bancos de dados foi feita a modelagem molecular com o programa DS Visualizer 3.0.

2.1.1. COORDENADAS DAS MACROMOLÉCULAS

Primeiramente, foram selecionadas as coordenadas tridimensionais dos átomos das enzimas COX-1 e COX-2, utilizadas como alvos, e também foi selecionado o sítio de ligação.

As coordenadas tridimensionais das estruturas cristalográficas das enzimas foram obtidas no *Protein Data Bank* - PDB e no *PDBsum*.

Uma vez que as estruturas tridimensionais da COX-1 e COX-2 humanas não se encontram disponíveis em banco de dados, foram consideradas as estruturas das enzimas COX-1 (proveniente de ovelha) e COX-2 (proveniente de camundongo), encontradas, sob os códigos pdb 3KK6 e 1CX2, respectivamente.

A estrutura tridimensional de COX-1 apresenta como inibidor cristalográfico o ligante Celecoxibe com resolução de 2,75 Å (RIMON et al., 2010). A COX-2 apresenta como inibidor cristalográfico o ligante SC-558 e foi obtida com 3,00 Å de resolução (KURUMBAIL et al., 1996).

2.1.1.1. ALINHAMENTO E HOMOLOGIA DA ESTRUTURA TRIDIMENSIONAL DO RECEPTOR

As enzimas utilizadas para os estudos *in silico*, *in vitro* e *in vivo* são provenientes de fontes diferentes (Tabela 2.1).

Tabela 2.1. Fontes das estruturas das enzimas COX-1 e COX-2

Experimento	Enzimas	
	COX-1	COX-2
<i>In silico</i>	Ovelha (<i>Ovis aires</i>)	Camundongo (<i>Mus musculus</i>)
<i>In vitro</i>	Ovelha (<i>Ovis aires</i>)	Ovelha (<i>Ovis aires</i>)
<i>In vivo</i>	Camundongo (<i>Mus musculus</i>)	Camundongo (<i>Mus musculus</i>)

Como as estruturas tridimensionais da COX-1 e COX-2 humana, da COX-2 de ovelha e da COX-1 de camundongo não estão presentes em bancos de dados, foi feito o alinhamento das sequências humana, ovina e de camundongo dessas enzimas, e posterior modelagem por homologia dessas estruturas.

Dessa forma, foi possível comparar as sequências de aminoácidos das enzimas humana, de ovelha e de camundongo, a fim de estabelecer uma relação entre os aminoácidos encontrados no sítio ativo, no qual o substrato (ácido araquidônico) é metabolizado e também verificar a conservação das sequências dos aminoácidos presentes nesse sítio.

Para isso, uma busca das sequências de aminoácidos dessas enzimas foi feita utilizando o banco de dados NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) e o programa ClustalW2: *Multiple Sequence Alignment* - que possibilita fazer alinhamento de sequências de DNA e Proteínas utilizando sequências de aminoácidos já depositadas em banco de dados. Utilizando o SWISS-MODEL (servidor online para modelagem de estruturas por homologia) foram modeladas as estruturas tridimensionais da COX-1 e COX-2 humana, da COX-2 de ovelha e da COX-2 de camundongo, por homologia estrutural, utilizando as estruturas das enzimas de ovelha e de camundongo, presentes no banco de dados NCBI, homólogas à humana, como molde.

2.1.2. COORDENADAS DOS LIGANTES

As estruturas tridimensionais dos ligantes da família dos organocalcogênicos foram obtidas por modelagem molecular. Utilizou-se como molde inicial uma estrutura cristalográfica depositada no CSD - *Cambridge Structural Database*. As estruturas dos compostos foram modeladas utilizando as facilidades do Programa DS Visualizer 3.0.

2.1.2.1. COMPOSTOS DA FAMÍLIA PRO

Foram estudados compostos da família 2-(fenilseleno)-2-(etil-X)acetofenonas-4'-Y-substituídas sintetizados pelo grupo do professor Dr. Paulo Roberto Olivato, da USP,

denominados de família PRO. Foi considerada como estrutura de partida para a modelagem, a estrutura cristalográfica URAREL (ZUKERMAN-SCHPECTOR et al., 2011) apresentada na Figura 2.2.

Esses compostos são apresentados em três grupos distintos de acordo com o substituinte X: SO₂ (grupo 1), SO (grupo 2) e S (grupo 3). Os substituintes Y foram Br, CH₃, H, NO₂ e OCH₃. Como os compostos podem apresentar enantiômeros, foram modelados também os enantiômeros R e S.

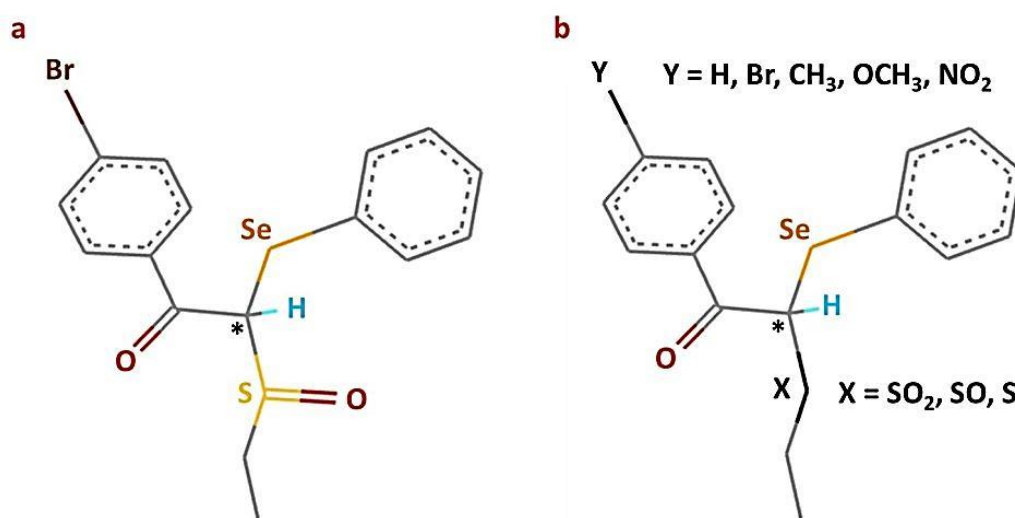


Figura 2.2. a. Estrutura cristalográfica de código CSD URAREL, mostrando o composto de partida para a modelagem dos compostos da família PRO. b. Esquema mostrando o esqueleto básico e os substituintes X (S, SO, SO₂) e Y (Br, H, CH₃, OCH₃, NO₂). (*) indica um centro quiral. Desenho feito com MarvinView & MarvinSketch da ChemAxon.

Para identificar os compostos, foram nomeados de 1 a 15, se é enantiômero R ou S, seguido do grupo X (SO₂, SO ou S) e o substituinte Y (Br, H, CH₃, NO₂ e OCH₃). Por exemplo, o composto 1, enantiômero R, com o grupo SO₂, com substituinte Br: 1r_SO₂_Br. Se fosse o enantiômero S, seria escrito dessa maneira: 1s_SO₂_Br. E assim por diante com os outros compostos. O composto URAREL (Figura 2.2), de acordo com esta nomenclatura, poderia ser 6r_SO_Br ou 6s_SO_Br, dependendo do enantiômero.

Na Figura 2.3 são apresentadas as estruturas bidimensionais das moléculas da família PRO que foram estudadas.

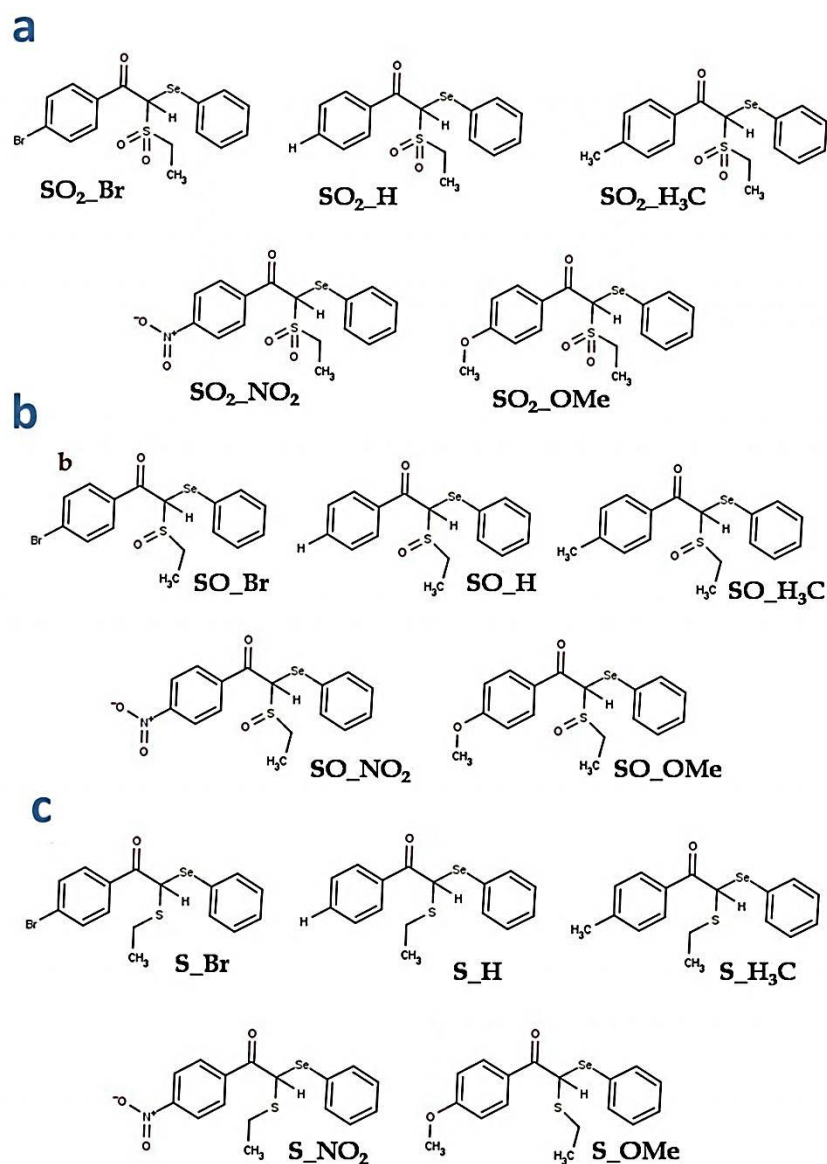


Figura 2.3. Representação bidimensional dos compostos da família PRO. São apresentados os grupos de moléculas com **a.** SO₂, **b.** SO, **c.** S, bem como os substituintes do anel não ligado ao Se: Br, H, CH₃, OCH₃ e NO₂. Foram modelados os enantiômeros R e S.

2.1.2.1.1. COMPOSTOS DA FAMÍLIA PRO COM GRUPO X = SO

Os compostos que apresentam grupo X = SO possuem dois centros estereogênicos em sua estrutura: o carbono metínico e o enxofre sulfinílico (Figura 2.4). Dessa forma, há dois possíveis diastereoisômeros, diferindo dos compostos com grupo X = S e SO₂, uma vez que estes apresentam somente um diastereoisômero. No entanto, devido à rota sintética, não há enantiosseletividade na preparação dos compostos (CERQUEIRA Jr., 2012).

Ao serem separados, esses diastereoisômeros formam duas séries distintas de compostos em misturas racêmicas. Uma delas corresponde aos diastereoisômeros com

centros estereogênicos de mesma configuração relativa, ou seja, quando carbono metínico for R, então o enxofre sulfinílico também será R (Cr/Sr), e quando o primeiro for S, o segundo também será S (Cs/Ss) (Figura 2.5). A outra série corresponde aos diastereoisômeros com centros estereogênicos de configuração opostas, ou seja, quando carbono metínico for S, então enxofre sulfinílico será R (Cs/Rr), e quando o primeiro for R, o segundo será S (Cr/Cs) (Figura 2.5) (CERQUEIRA Jr., 2012).

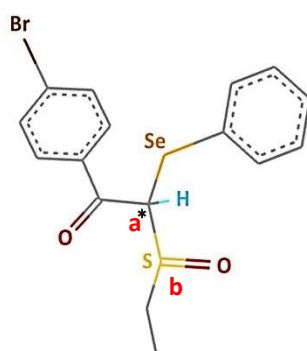


Figura 2.4. Compostos com grupo X = SO, apresentando os centros esterogênicos: **a.** carbono metínico e **b.** enxofre sulfinílico.

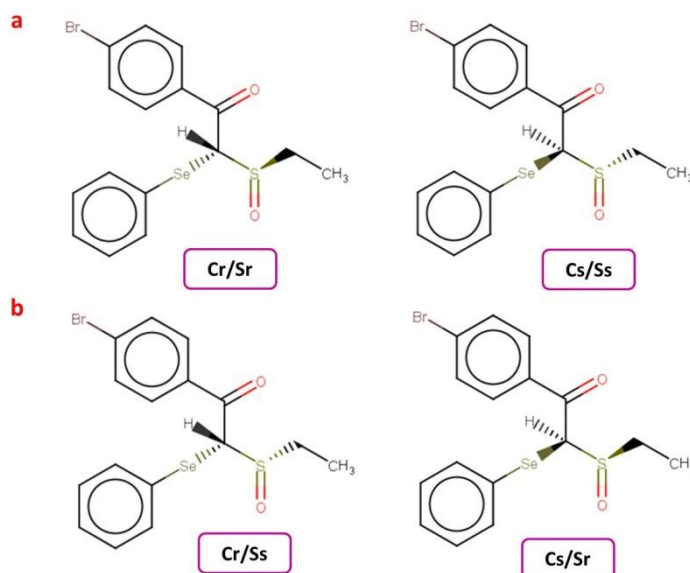


Figura 2.5. Compostos com grupo X = SO, apresentando os centros esterogênicos: **a.** de mesma configuração relativa (Cr/Sr e Cs/Ss) e **b.** de configuração opostas (Cr/Ss e Cs/Sr).

2.1.3. DOCKING MOLECULAR

O docking molecular é o estudo do melhor ajuste entre duas estruturas tridimensionais (BROOIJMANS e KUNTZ, 2003). Esse processo pode ser dividido nas

seguintes partes: planejamento do experimento *in silico*; realização do experimento computacional com objetivo de formar complexos; validação do experimento (*redocking*); avaliação dos resultados obtidos no experimento.

O programa empregado nas simulações foi o GOLD 5.0 (*Genetic Optimization for Ligand Docking*), o qual utiliza um algoritmo genético na busca de uma população de possíveis soluções.

A função escore utilizada foi a *GoldScore*, a fim de se ordenar as diferentes soluções obtidas. *GoldScore* é uma função baseada em mecânica molecular, que possui quatro termos:

$$\text{GOLD Fitness} = S_{hb_ext} + 1.375 * S_{vdw_ext} + S_{hb_int} + S_{vdw_int} ,$$

onde S_{hb_ext} representa a contribuição da energia das ligações de hidrogênio entre a proteína e o ligante; S_{vdw_ext} a contribuição da energia de van der Waals do complexo proteína-ligante; S_{hb_int} é a contribuição da energia de ligação de hidrogênio intramolecular à função; e S_{vdw_int} a energia de van der Waals interna do ligante. A multiplicação do fator S_{vdw_ext} por 1.375 é uma correção empírica para encorajar os contatos hidrofóbicos proteína-ligante. Como o *GoldScore* é tomado como sendo o negativo da soma dos termos de energia componentes, quanto maior o valor do escore, melhor (JONES et al., 1997). O campo de força (mecânica molecular) utilizado no programa GOLD é o Tripos 5.2 Force Field (CLARK, CRAMER, van OPDENBOSCH, 1989).

Para a simulação, foram consideradas as enzimas sob os códigos pdb 3KK6 e 1CX2 no PDB e os ligantes da família dos organocalcogênicos obtidos por modelagem molecular. O centro dos cálculos de docking foram os ligantes cristalográficos e a cavidade gerada pela retirada do ligante, e mais 6 Å; no caso de COX-2, isso resultou em uma esfera de 11,005 Å, onde foram considerados 321 átomos nos cálculos. Já para os cálculos com a enzima COX-1, a esfera considerada tinha 10,807 Å e 307 átomos. O programa GOLD utilizado, com a função de ajuste de escore *GoldScore*, foi a versão 5.0. Foram adicionados os hidrogênios, utilizando subrotina do programa, pois normalmente não estão presentes nas coordenadas obtidas do PDB/PDBSum. Para a proteína é permitida a flexibilidade das hidroxilas dos grupos carboxílicos e no caso dos ligantes, flexibilidade. A His90, presente no sítio ativo foi protonada para a realização dos cálculos. Foram geradas

até 10 saídas (soluções) em cada cálculo, ou até que o rmsd (*root-mean-square deviation*) entre as saídas fosse menor que 1.5 Å. As moléculas de água foram extraídas, pois análise prévia mostra que não há interação das águas com os ligantes no sítio ativo.

Dessa forma, foram geradas poses¹ desses compostos organocalcogênicos no sítio de ligação, o sítio ativo característico da atividade ciclooxygenase, com valores de escore associados a cada complexo formado. Estes complexos foram analisados com o programa de visualização molecular DS Visualizer 3.5.

Para se estabelecer os padrões de ligação dos compostos nas enzimas estudadas, uma série de parâmetros foi considerada: as orientações obtidas no cálculo de *docking* (saídas semelhantes em cada cálculo), as interações que os átomos dos inibidores fazem com átomos de resíduos de aminoácidos da enzima, os escores associados a cada orientação gerada e, por fim, se o modo de ligação é representativo para uma série de compostos de uma mesma família estudada (VEGA-TEIJIDO, CARACELLI e ZUKERMAN-SCHPECTOR, 2006).

2.1.3.1. ALGORITMO GENÉTICO

O Algoritmo Genético (AG) é um algoritmo estocástico utilizado para solucionar problemas de otimização. Os principais conceitos utilizados em AG são: (1) gene: representa cada parâmetro a ser explorado na otimização; (2) cromossomo: também chamado de indivíduo, é a cadeia de genes que representa uma solução possível para o problema; e (3) população: representa o conjunto de soluções no espaço de busca. Os ligantes podem ser rígidos ou flexíveis no Programa GOLD. No caso de considera-los flexíveis, são considerados ângulos torcionais observados na cristalografia. Na linguagem de AG usada, **solução** representa cada estrutura do ligante que o cálculo de docking ajustou no sítio receptor; **orientação** representa a posição no sítio que agrupa uma ou mais soluções com RMSD (*root mean square deviation*) baixo e superposição gráfica que permitem afirmar que formam um grupo de soluções equivalentes.

¹ Pose, orientação de um ligante em relação a um dado receptor, com uma dada conformação. (Perola et al. 2002).



Figura 2.6. Fluxograma da operação de um algoritmo genético (adaptação de Miranda, 2000; Corrêa, 2010).

Um número alto de soluções em um grupo será considerado como de certo peso estatístico que favorece a orientação por eles definida e uma delas será selecionada como representante da orientação. As duas primeiras definições referem-se aos complexos; o termo **conformação** é empregado para a estrutura tridimensional adotada pelo ligante, independentemente de estar ligado ou não.

A produção das soluções nos algoritmos genéticos consiste no cálculo de um grande número de indivíduos, realizando uma varredura tão extensa quanto necessária do espaço de soluções. Para cada indivíduo gerado, uma aptidão é calculada através de uma função de escore (*fitness*).

2.1.4. REDOCKING

O redocking é uma forma de validar os parâmetros de cálculos para reconstruir a estrutura cristalográfica do complexo receptor COX-ligante. Neste processo, como apresentado na Figura 2.7, o complexo proteína-ligante é separado e os cálculos de docking são realizados com o objetivo de reconstruir o complexo. Para isso são selecionados parâmetros como modo de busca, função de ajuste, raio da esfera construída, flexibilidade ou não de ligantes e/ou proteína.

A predição do modo de ligação é considerada bem sucedida se o rmsd, medida das diferenças entre os valores previstos pelo modelo e aqueles efetivamente observados, for menor do que, geralmente, 2 Å (VERDONK et al., 2003). Se o redocking é realizado com sucesso, então se segue com os ligantes a serem estudados.

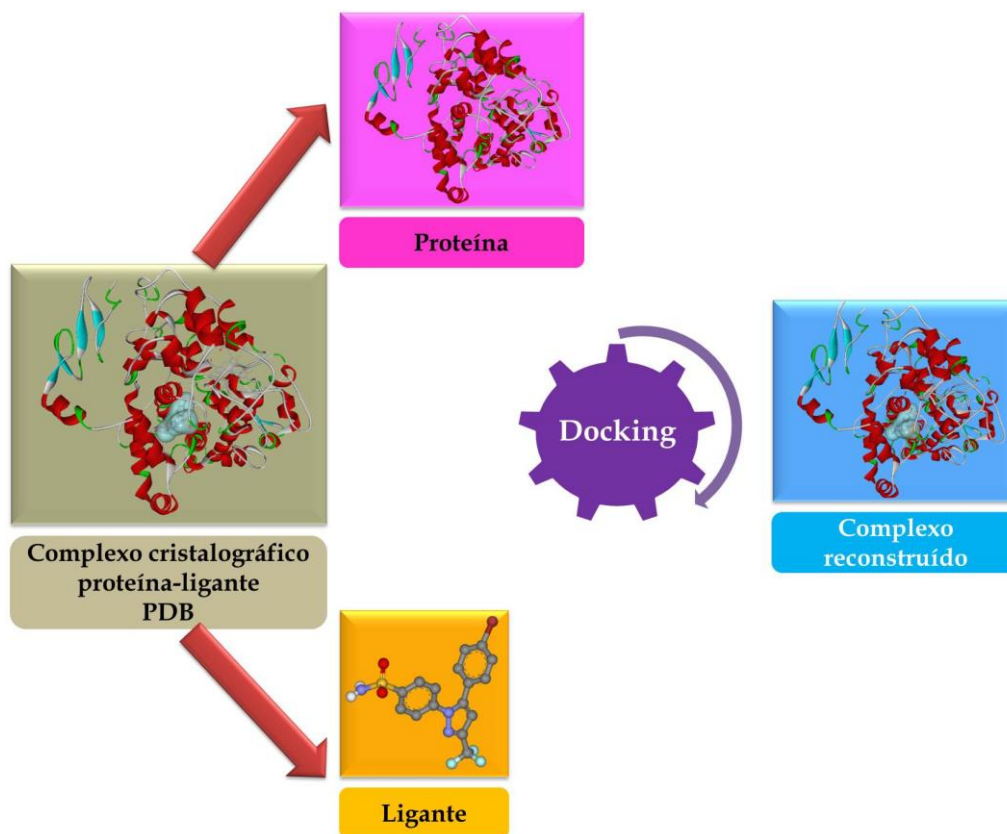


Figura 2.7. Etapas utilizadas para o Redocking. O complexo cristalográfico obtido no PDB, formado por uma proteína e um ligante, é separado e as duas moléculas são utilizadas em cálculos de docking para a reconstrução do complexo. Os parâmetros utilizados para os cálculos que resultam no melhor complexo serão utilizados nos estudos posteriores com a mesma proteína (receptor) e os ligantes de interesse (obtidos por modelagem molecular).

2.1.5. ANÁLISE DOS SUBSÍTIOS E DAS INTERAÇÕES π

Após análise dos cálculos de docking e análise das interações por visualização molecular, utilizou-se a descrição feita por BOUAZIZ-TERRACHET e colaboradores (2010), a qual considera subsítios presentes na COX-2 para explicar a atividade e/ou especificidade dos ligantes. Na Figura 2.8 pode ser observado o sítio ativo da COX-2 dividido nesses subsítios.

Usando esse tipo de aproximação, SANTOS e colaboradores, 2007, também observaram que para inibir a COX-2 e apresentar seletividade para essa enzima não é

necessária a interação das moléculas com as quatro regiões propostas. Os resíduos de aminoácidos que fazem parte dos subsítios S1, S2, S3 e S4 estão descritos a seguir:

S1: His90, Gln192, Arg513, Val516 e Phe518.

S2: Tyr348, Try385, Trp387 e Met522.

S3: Val116, Arg120, Tyr355 e Leu359.

S4: Ile345, Leu531 e Leu534.

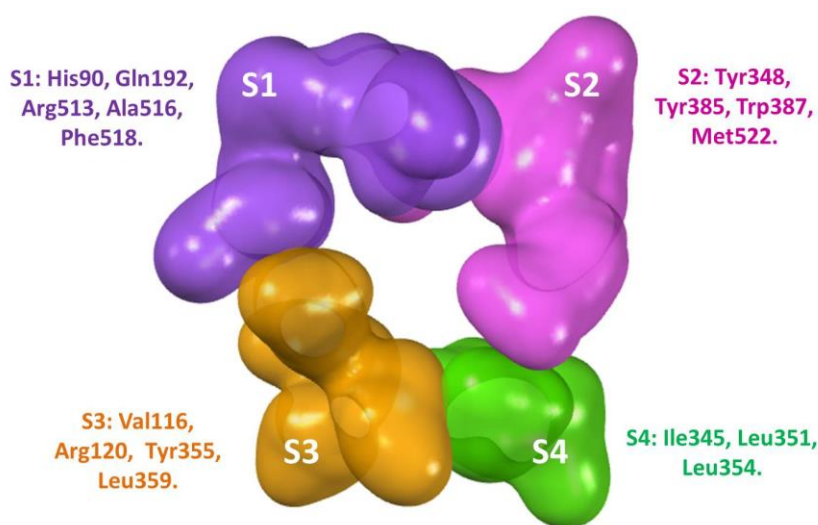


Figura 2.8. Subsítios do sítio ativo da COX-2 em representação tipo superfície. O subsítio S1 está representado em roxo, o S2 em rosa, o S3 em laranja e o S4 em verde.

Para a COX-1 não há esse tipo de análise na literatura, o que pode ser considerado como uma inovação uma análise feita para essa enzima. Para isso, foi feita sobreposição das estruturas tridimensionais das duas proteínas, COX-1 e COX-2 e então foram indicados os subsítios para a enzima COX-1.

Para facilitar a análise dos resultados, as 30 moléculas da família PRO foram consideradas em função dos substituintes X e Y (Figura 2.2b) e dos seus enantiômeros.

Para completar a análise das interações (envolvendo as ligações de hidrogênio e interações de van der Waals) que é feita por visualização molecular, a análise das interações π foi realizada com um programa baseado em mapeamento vetorial, desenvolvido por Sacco (2013), de forma a caracterizar esse tipo de interações, com a possibilidade de medir ângulos e distâncias das interações π . Em alguns casos, este tipo de interações fracas pode ser essencial e até mesmo um dos principais fatores responsáveis pela inibição (STEFANI et al., 2012b).

2.2. EXPERIMENTOS *IN VITRO*

2.2.1. ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO – INIBIÇÃO COX-1 E COX-2

Os ensaios *in vitro* foram realizados no laboratório da Prof^a. Fernanda de Freitas Anibal, do Departamento de Morfologia e Patologia – DMP – UFSCar, utilizando o kit COX Inhibitor Assay Co. 560101 (Cayman Chemical Company, Ann Arbor, MI, USA) para avaliação biológica da inibição das enzimas COX-1 e COX-2.

O procedimento realizado pode ser resumido nas seguintes etapas:

1. Os compostos da família PRO foram preparados pelo grupo do Prof. Olivato, USP, para serem submetidos ao experimento de inibição. O experimento iniciou com 15 compostos (mistura racêmica), para os quais já haviam sido feito estudos *in silico*.

2. Esses compostos foram diluídos em DMSO a 5%.

3. As soluções obtidas dos compostos foram adicionadas aos poços da microplaca adquirida com o kit de inibição da COX.

4. Também foram adicionadas à microplaca outras soluções determinadas e preparadas segundo o protocolo.

5. A microplaca foi incubada por 18 horas para que ocorressem as reações.

6. Após incubação da microplaca foi realizada a leitura da absorbância em leitor de placa (colorímetro) em comprimento de onda no intervalo de 405 – 420 nm.

7. Foram realizados os cálculos com os valores de absorbância de cada composto para obter a taxa de inibição para as enzimas COX-1 e COX-2.

Os compostos que apresentaram simultaneamente maior atividade de inibição para COX-2 e pouca atividade para COX-1 foram selecionados para realizar os experimentos *in vivo*.

2.3. EXPERIMENTOS *IN VIVO*

2.3.1. EDEMA DE PATA

2.3.1.1. INFLAMAÇÃO AGUDA E EDEMA DE PATA

A inflamação é um processo entendido como bioquímico e celular que ocorre no tecido conjuntivo vascularizado. Nesse processo tomam parte o plasma, as células circulantes, os vasos e os componentes celulares e extracelulares do tecido inflamado.

Esse processo tem por finalidade destruir, diluir ou isolar o agente estranho e/ou nocivo e estimular a cicatrização e reconstituição do tecido lesado (VIZIOLI, 2008; COSTA, 2004).

O processo inflamatório pode se manifestar de maneira aguda ou crônica. A forma aguda tem curta duração, podendo ser minutos, horas ou alguns dias. Tem como principais características a exsudação de líquidos e proteínas plasmáticas, ocasionando o edema, migração celular e sensibilização e ativação de nociceptores (VIZIOLI, 2008; COSTA, 2004). Todavia, a forma crônica da inflamação possui longa duração (VIZIOLI, 2008; COSTA, 2004). Nesta, há a presença de macrófagos e linfócitos e ocorre a proliferação de vasos sanguíneos, fibrose e necrose do tecido (VIZIOLI, 2008; COSTA, 2004).

A diversidade de modelos experimentais tem permitido realizar descobertas sobre as alterações ligadas à resposta inflamatória, aos mediadores envolvidos e aos compostos com atividade anti-inflamatória. A diferença entre tais **modelos** se dá em relação às células e aos mediadores envolvidos, às alterações observadas, à duração e à magnitude das alterações e recuperação da função tecidual (VIZIOLI, 2008; COSTA, 2004).

Os modelos para induzir a inflamação aguda utilizam agentes inflamatórios tais como Carragenina (WINTER et al. 1962), Zymosan, formaldeído (DAMAS & LIÉGEOIS, 1999; DUBUISSON & DENNIS, 1977; FRANÇA et al., 2001; Le BARS et al., 2001; TJØLSEN et al., 1992).

Para os experimentos *in vivo* realizados nesta parte do projeto, foram utilizados os modelos da Carragenina e do Zymosan.

A Carragenina é um polissacarídeo sulfatado presente em várias espécies de algas vermelhas da ordem Gigartinales. Esse modelo foi originalmente proposto por Winter et al. (1962) para a indução do edema de pata em ratos. Posteriormente, Levy (1969) demonstrou que a Carragenina também causa edema de pata em camundongos.

O Zymosan é derivado da parede celular de levedura *Saccharomyces cerevisiae* e consiste em um complexo de proteínas e carboidratos. É utilizado para induzir a inflamação em pata de ratos e camundongos (PILLEMER L et al., 1953; JAIN et al., 2008). Induz a produção de citocinas pró-inflamatórias em macrófagos, a mobilização do araquidonato, a fosforilação da proteína e a formação de fosfato de inositol (PILLEMER L

et al., 1953; JAIN et al., 2008). Também está relacionado com a ativação das células Th1 e Th17, as quais estão presentes em doenças inflamatórias crônicas, como a artrite reumatoide, e também pode ser utilizado para indução da inflamação crônica (ZARPELON, 2011; WEI et al., 2001).

Os efeitos observados para esses modelos são semelhantes. Por exemplo, há o aumento do calibre vascular e do fluxo sanguíneo, provocando o eritema e o calor. Esses sintomas iniciam logo após a administração do estímulo inflamatório e se manifestam ao longo do tempo de acordo com a dose usada, o tecido onde foi feita a administração e a espécie animal, entre outros fatores (VIZIOLI, 2008; COSTA, 2004).

Essas alterações são provocadas por diferentes mediadores inflamatórios, os quais também provocam aumento da permeabilidade dos capilares e das vênulas, resultando em extravasamento de um líquido rico em proteínas (exsudato) para o interstício e têm como função permitir o aporte de fatores solúveis, como anticorpos e proteínas de fase aguda, no sítio da lesão (VIZIOLI, 2008; COSTA, 2004).

O edema pode ser avaliado de forma direta, por meio da determinação do volume ou da espessura da pata, ou de forma indireta, por meio da determinação do extravasamento de corantes ou substâncias marcadas com elementos radioativos no local onde foi injetado o estímulo inflamatório (VIZIOLI, 2008; COSTA, 2004).

Os experimentos de inflamação aguda foram realizados seguindo o modelo de edema de pata, baseado no modelo de Jain e colaboradores, 2008.

Foram realizados dois experimentos, Experimento I e Experimento II, sendo que a diferença na execução deles se deu apenas em relação à medida da temperatura, como descrito nos itens 2.3.1.1 e 2.3.1.2, respectivamente.

A indução do exsudato inflamatório foi realizada com a Carragenina (Sigma-Aldrich®) 200 µg / pata e o Zymosan (Sigma-Aldrich®) 100 µg / pata. Esses compostos foram diluídos em PBS 1X.

Foram testados os compostos da família PRO que apresentaram simultaneamente maior inibição para a COX-2 e pouca inibição para COX-1 (5-OCH₃ e 6Br) e o composto que apresentou inibição parecida para as duas enzimas (10-OCH₃). O celecoxibe foi utilizado para comparação uma vez que se conhece sua atividade anti-inflamatória.

Os animais foram utilizados em conformidade com as normas e procedimentos éticos vigentes para a experimentação animal, conforme os princípios éticos do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal – COBEA.

Este estudo foi previamente analisado e aprovado pelo Comitê de Ética da UFSCar, protocolo nº 057/13 (**Anexo 2.1**).

Os camundongos foram mantidos no biotério do Departamento de Morfologia e Patologia da UFSCar durante os experimentos, com temperatura e umidade ambiente controladas. Foram alimentados com ração padrão e água *ad libitum*. Estes animais foram mantidos nestas condições por um período de adaptação sete dias antes do início dos experimentos.

Os animais foram divididos em 11 grupos, totalizando 41 camundongos com 4 semanas. A Tabela 2.2 apresenta a separação e quantidade de animais por grupos, bem como o composto aplicado para cada um.

Grupo	Animais por grupo	Composto Aplicado
Controle PBS	3	PBS
Controle CARRAGENINA	3	Carragenina
Controle ZYMOSAN	3	Zymosan
5-OCH ₃ - Carragenina	4	5-OCH ₃
5-OCH ₃ – Zymosan	4	5-OCH ₃
10-OCH ₃ - Carragenina	4	10-OCH ₃
10-OCH ₃ - Zymosan	4	10-OCH ₃
6Br – Carragenina	4	6Br
6Br – Zymosan	4	6Br
Celecoxibe - Carragenina	4	Celecoxibe
Celecoxibe - Zymosan	4	Celecoxibe

Os grupos receberam 30 µL dos agentes químicos irritantes, Carragenina e Zymosan, por via subplanta, na pata posterior esquerda. Os compostos com atividade anti-inflamatória *in vitro* foram administrados por via intraperitoneal, na dose de 100 nM, 60 minutos antes da aplicação dos agentes para indução da inflamação.

A dose aplicada em mg/mL está apresentada na Tabela 2.3.

Compostos	Peso molecular (g/mol)	Dose equivalente a 100 nM em mg/kg
5-OCH ₃	396,9	3,97
6-Br	429,8	4,30
10-OCH ₃	380,9	3,81
Celecoxibe	381,4	3,81

Após 48 horas do início do experimento, os animais foram eutanasiados por meio de punção cardíaca.

Após a coleta do sangue foi feita a separação do plasma para posterior análise de citocinas por meio de Ensaio Imunoenzimático (EIA). O sangue foi colocado em tubos de ensaios pequenos e centrifugado a 1500 rpm durante 10 minutos. Então, o plasma foi coletado e armazenado em tubo eppendorf de 1 mL em freezer à - 20°C.

Também foram coletados os órgãos (rins, fígado e pata esquerda) de cada grupo, lavados em PBS 1X e conservados em formol a 10% tamponado.

Esses materiais foram processados e incluídos em blocos de parafina para que fossem obtidos cortes histológicos para o preparo de lâminas e posteriores análises histopatológica e imuno-histoquímica.

2.3.1.2. EXPERIMENTO I

O Experimento I foi realizado com 41 camundongos Swiss, fêmeos, com 4 semanas, os quais foram adquiridos do Biotério Central da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar, São Carlos). A separação dos grupos foi feita como apresentado na Tabela 2.3.

As espessuras (mm) das patas posteriores foram medidas com um paquímetro antes, imediatamente, de hora em hora por 4 horas e 24 horas após a administração da Carragenina e do Zymosan. Os resultados foram expressos pela diferença entre as medidas da pata antes e após os tratamentos.

A temperatura retal (°C) foi determinada por um termômetro clínico digital, inserido delicadamente no reto dos animais com auxílio de lubrificante em gel. As medidas foram efetuadas antes da aplicação da Carragenina e do Zymosan e após 24 horas. A análise da temperatura também foi feita pela diferença entre as medidas antes e após os tratamentos.

2.3.1.3. EXPERIMENTO II

Para o Experimento II, foram utilizados 41 camundongos machos Balb/C, diferentes daqueles utilizados no Experimento I, com 4 semanas, adquiridos do Biotério II

(Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto) da Universidade de São Paulo (USP, Ribeirão Preto). A separação dos grupos foi feita como apresentado na Tabela 2.1.

A medida da espessura (mm) das patas foi efetuada com um paquímetro e foi estabelecido o mesmo intervalo de tempo que para a medida de temperatura.

Nesse experimento, foi medida a temperatura da pata esquerda, a qual foi aplicada o agente inflamatório, de cada animal de cada grupo. Para isso foi utilizada uma câmera termográfica Fluke Ti400. A temperatura foi medida antes da aplicação dos agentes inflamatórios, de hora em hora por 3 horas, de duas em duas horas por 3 horas e após 11 horas.

Os resultados da temperatura e da espessura da pata foram expressos pela diferença entre as medidas antes e após os tratamentos.

CAPÍTULO 3

Resultados e Discussão

Este capítulo apresenta os resultados obtidos para os experimentos *in silico*, *in vitro* e *in vivo*, bem como relações entre os mesmos.

3.1. EXPERIMENTOS *IN SILICO*

3.1.1. ALINHAMENTO E HOMOLOGIA DA ESTRUTURA TRIDIMENSIONAL DO RECEPTOR

O alinhamento da sequência da COX-1 (ovina) com as sequências das COX-1 humana e de camundongo, permitiu observar que o sítio ativo dessas enzimas é conservado, não tendo modificações significativas entre as sequências de espécies diferentes. No entanto, o alinhamento da sequência da COX-2 (camundongo) com as sequências da COX-2 humana e ovina, mostrou que o aminoácido Arg513 presente nas estruturas ovina e de camundongo, é uma Ala513 na estrutura humana.

Na Tabela 3.1 está apresentada uma parte do alinhamento sequencial da COX-1 humana e ovina e na Tabela 3.2 o alinhamento sequencial da COX-2 humana e de camundongo. As tabelas apresentam o alinhamento na região do sítio ativo. Os aminoácidos presentes no sítio ativo estão destacados. Observa-se que para COX-1 há

100% de identidade no caso dos resíduos de aminoácido do sítio ativo, enquanto que para COX-2 há 99% de identidade para os resíduos de aminoácidos desse mesmo sítio. Os aminoácidos do sítio ativo estão destacados em amarelo, nas Tabelas 3.1 e 3.2.

Tabela 3.1. Alinhamento das sequências das enzimas COX-1 humana, de camundongo e de ovelha (código pdb 3KK6),

Estrutura	Alinhamento dos aminoácidos da região do sítio ativo
Humana	61 rtgysgpnctipglwtwlrnslrpspsftHfllthgrwfwefvnatfiremlmrlvltRr
Camundongo	61 rtgysgpnctipeiwtwlrnslrpspsftHfllthgywlwefvnatfirevmlrlvltRq
Ovelha	61 rtgysgpnctipeiwtwlrtrtlrpspsfiHfllthgrwldwfvnatfirdtllmrlvltRr
	181 lllrrefipapOgtnilfaffaqhfthqffktsqkmgpgftkalghgvdlghiygdnlr
	181 fllrrkfipdpOgtnlmfaffaqhfthqffktsqkmgpgftkalghgvdlghiygdnlr
	181 fllrrkfipdpOstnlmfaffaqhfthqffktsqkmgpgftkalghgvdlghiygdnlr
	301 yatlwlrhnrvcdllkaehptwgdeqlfqtrrliligetikivieeyVqqLSgyflqLk
	301 fstiwlrehnrvcdllkeehptwddeqlfqtrrliligetikivieeyVqhlSgyflqLk
	301 yatiwlrehnrvcdllkaehptwgdeqlfqtarliligetikivieeyVqqLSgyflqLk
	361 fdPELLfgvqfqyrnriameFnhLYhWhplmpdsfkvgsqeysyeqflfntsmldvygve
	361 fdPELLfraqfqyrnriameFnhLYhWhplmpnsfqvgsqeysyeqflfntsmldvygve
	361 fdPELLfgaqqyrnriameFnqLYhWhplmpdsfrvgpqqdysyeqflfntsmldvygve
	481 ltgekemaaeeelygdidalefypglllekcpnsiFgesmIemgapfSLkglgnpic
	481 lvgekemaaeeelygdidalefypglllekchpnsiFgesmIeigapfSLkglgnpic
	481 ltgekemaaeeelygdidalefypglllekchpnsiFgesmIemgapfSLkglgnpic

Tabela 3.2. Alinhamento das sequências das enzimas COX-2 humana, de camundongo (código pdb 1CX2) e de ovelha

Estrutura	Alinhamento dos aminoácidos da região do sítio ativo
Humana	61 trikflkptpntvhyilthfkgfvvnnipflrnaimsyvltsRshlidspptynad
Camundongo	61 triklllkptpntvhyilthfkgvwnivnnipflrslimkyvltsRsyldispptynvh
Ovelha	61 triklllkptpdtvhyilthfkgvwnivnkisflrnmmimryvltsRshliespptynvh
	181 nmmfaffaQhfthqffktdhkrgpafnglghgvdlnhiygetlarqrklrlfkdgkmy
	181 nmmfaffaQhfthqffktdhkrgpgftrglghgvdlnhiygetldrqhklrlfkdgklky
	181 nlmfaffaQhfthqffktdiergpafkgnhgvdlnshvygeslerqhnrrlfkdgkmy
	301 vlkqehpewgdeqlfqtsrliligetikiviedyVqhLSgYhfkLkfdpellfnkqfqyq
	301 ilkqehpewgdeqlfqtsrliligetikiviedyVqhLSgYhfkLkfdpellfnqqfqyq
	301 vlkqehpewgdeqlfqtsrliligetikiviedyVqhLSgYhfkLkfdpellfnqqfqyq
	361 nriaaefntlyHWHpLLpdtfqihdqkynyqqfiynnsillehgitqfvesftrqiagr
	361 nriasefntlyHWHpLLpdtfniedqeysfkqflynnsillehglqfvesftrqiagr
	361 nriaaefntlyHWHpLLpdvfqidgqeynyqqfiynnsvlllehgvqtqfvesftrqiagr
	481 ygdidavelypallvekpRpdAIFgetmVevGApfsLkglmgnvicspaywkpstfggev
	481 ysdidvmelypallvekpRpdAIFgetmVelGApfsLkglmgnpicspwywkpstfggev
	481 ygdidamelypallvekpRpdAIFgetmVeaGApfsLkglmgnpicspeywkpstfggev

Além disso, a modelagem das estruturas por homologia também mostrou que não há diferenças significativas quanto à estrutura secundária das enzimas das espécies diferentes. Na Figura 3.1 está apresentado o resultado do alinhamento no sítio ativo

dessas enzimas, no qual as simulações de docking foram realizadas. No **Apêndice 3.1** está apresentado o alinhamento da estrutura secundária.

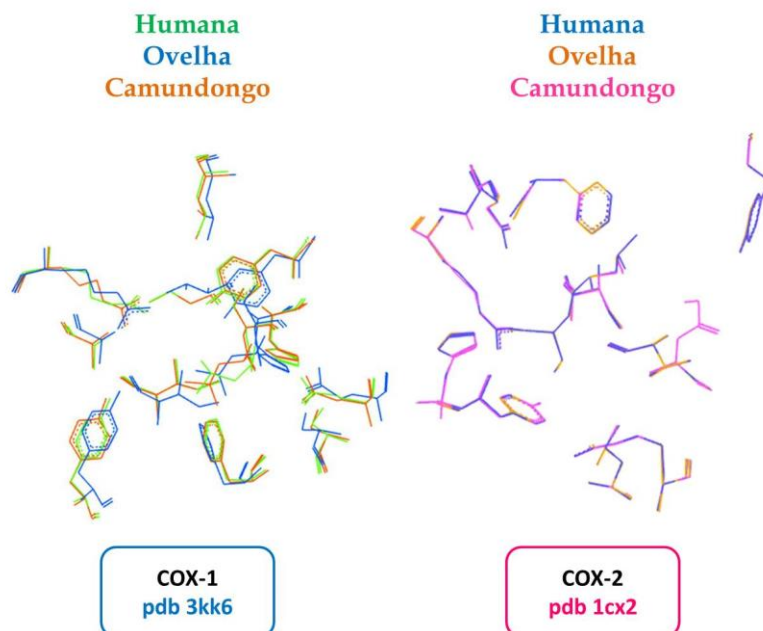


Figura 3.1. **a.** Sobreposição da COX-1 humana e da COX-1 de camundongo com os resíduos de aminoácidos presentes no sítio ativo da enzima COX-1: 3KK6. **b.** Sobreposição da COX-2 humana e da COX-2 de ovelha com os resíduos de aminoácidos presentes no sítio ativo da enzima COX-2: 1CX2.

Uma vez que o sítio ativo das estruturas comparadas se mostrou equivalente, o estudo de docking foi realizado com as estruturas cristalográficas já depositadas no PDB e PDBsum, 3kk6 para a COX-1 e 1cx2 para a COX-2.

3.1.2. MODELAGEM MOLECULAR DOS COMPOSTOS DA FAMÍLIA DOS ORGANOCALCOGÊNIOS DA FAMÍLIA PRO

Os compostos estudados neste trabalho foram modelados, visto que suas estruturas tridimensionais não estão disponíveis em bancos de dados.

As estruturas tridimensionais dos compostos, resultantes da modelagem molecular são apresentadas na Figura 3.2.

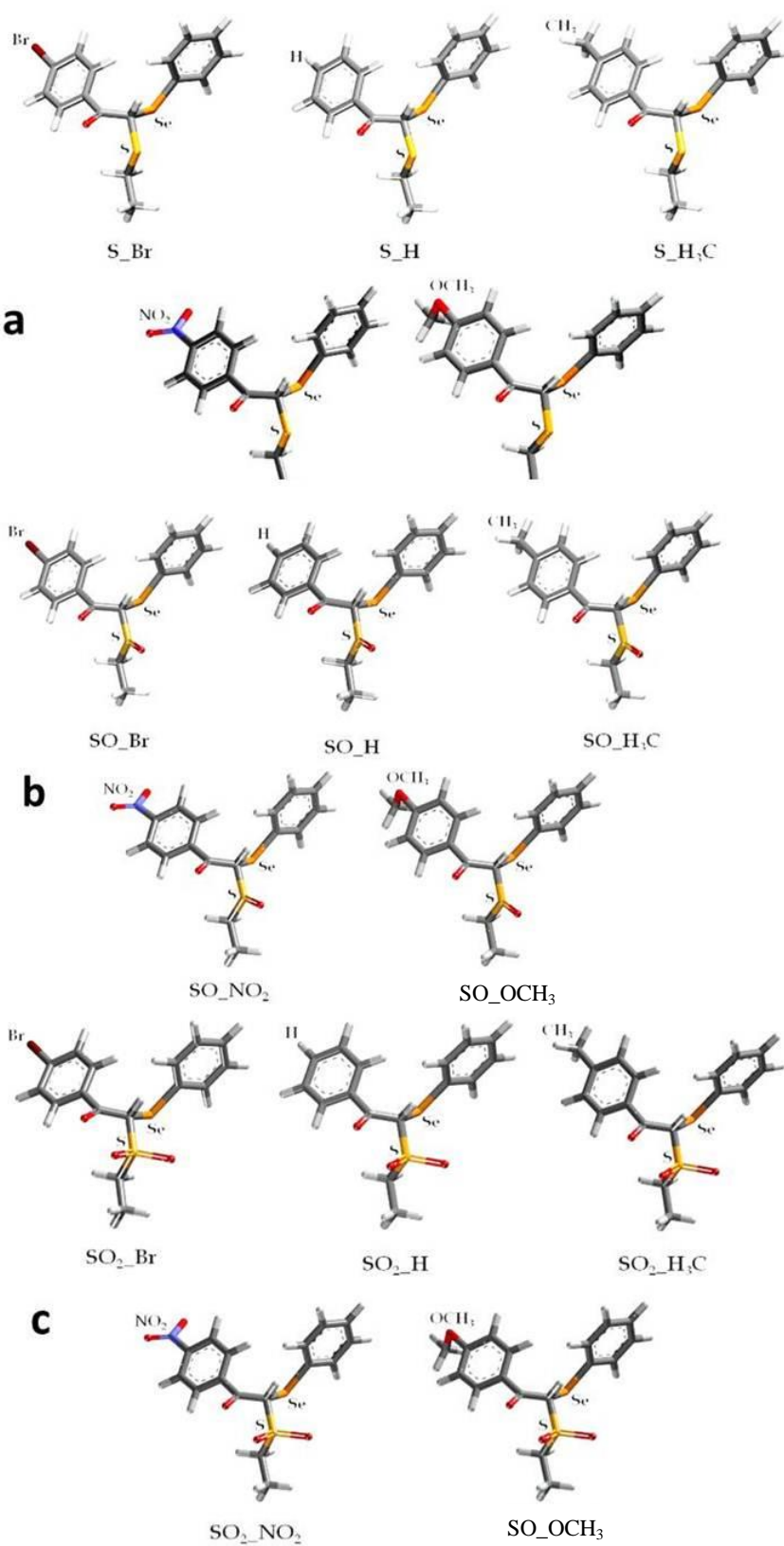
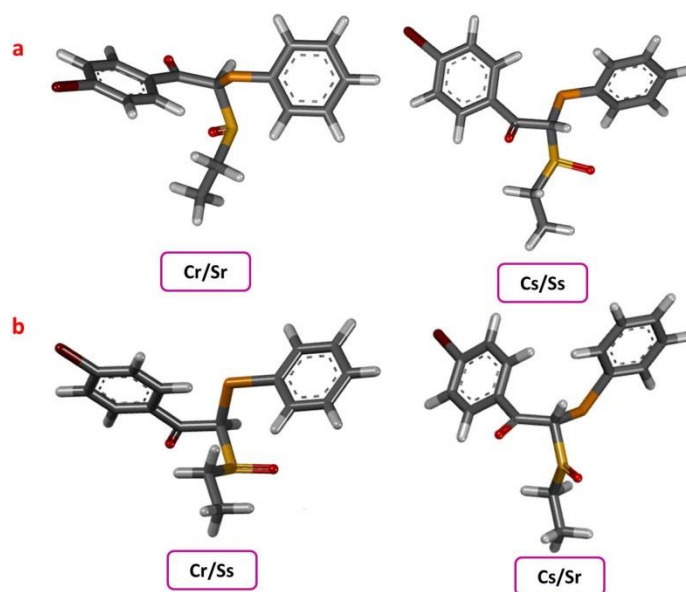


Figura 3.2. Representação tridimensional de apenas um dos enantiômeros dos compostos modelados a partir da estrutura de código CSD URAREL. **a.** Compostos do grupo 1, apenas com Enxofre (S). **b.** Compostos do grupo 2, com substituição do Enxofre pelo grupo Sulfóxido (SO). **c.** Compostos do grupo 3, com substituição do Enxofre pelo grupo Sulfona (SO₂).

3.1.2.1. COMPOSTOS DA FAMÍLIA PRO COM GRUPO X = SO

As estruturas tridimensionais dos diastoisômeros dos compostos com grupo X = SO, resultantes da modelagem molecular são apresentadas na Figura 3.3.

Figura 3.3. grupo 2 (X = SO), centros de mesma relativa (Cr/Sr e configuração Cs/Sr).



3.2. REDOCKING

O redocking foi descrito no Capítulo 2. O objetivo é o de validar os cálculos com a série de compostos desconhecidos a partir da reconstrução do complexo cristalográfico.

O escore obtido para o complexo cristalográfico será utilizado para comparação com os obtidos com os compostos PRO.

3.2.1. Enzima COX-2

Na Figura 3.4 é apresentada a pose obtida no redocking e comparada com o ligante do complexo cristalográfico COX-2.

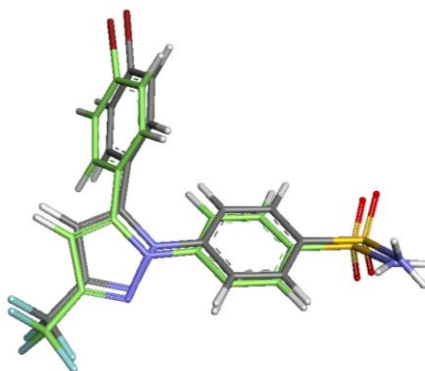


Figura 3.4. Redocking realizado com o complexo COX-2 de código pdb 1cx2. A molécula que tem os átomos de carbono em cinza é o ligante cristalográfico e a que tem os átomos de carbono em verde (escore 78,5 kcal/mol) é a pose obtida no processo de redocking.

3.2.2. Enzima COX-1

Na Figura 3.5 é apresentada a pose obtida no redocking e comparada com o ligante do complexo cristalográfico COX-1.

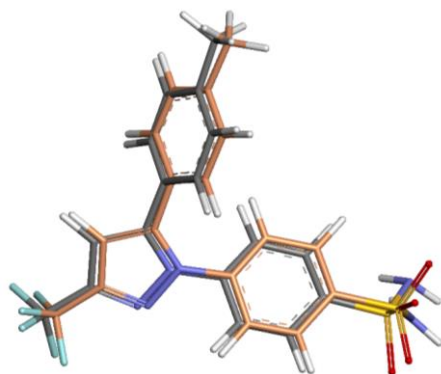


Figura 3.5. Redocking realizado com o complexo COX-1 de código pdb 3kk6. A molécula que tem os átomos de carbono em cinza é o ligante cristalográfico e a que tem os átomos de em rosa carbono (escore 78,3 kcal/mol) é a pose obtida no processo de redocking.

3.3. ANÁLISE DAS INTERAÇÕES INTERMOLECULARES DOS COMPLEXOS CRISTALOGRÁFICOS

Os complexos cristalográficos das enzimas COX-1 e COX-2 de códigos pdb 3kk6 e 1cx2, respectivamente, foram analisados e as tabelas de interações, bem como as figuras que mostram algumas das interações entre os ligantes e os receptores são apresentadas no **Apêndice 3.2**.

Além de caracterizar as interações também é importante poder diferenciar o que pode permitir seletividade a certa classe de compostos como o celecoxibe que é o ligante da estrutura 3kk6 (COX-1-celecoxibe). Esta não tem sido uma tarefa simples, visto que foram realizados estudos de docking para formar o complexo COX-2-celecoxibe, e depois foram superpostos os complexos COX-1 e COX-2 e o celecoxibe ficou superposto, conforme pode ser observado na Figura 3.6.

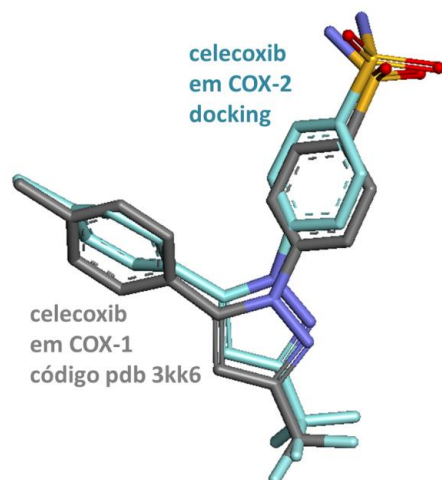


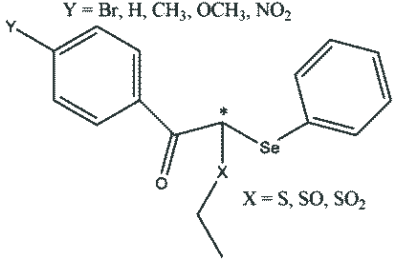
Figura 3.6. Em cinza está o celecoxibe cristalográfico em sua posição dentro sítio ativo de COX-1 (3kk6). Em azul está a pose do ligante celecoxibe no sítio de COX-2. Os dois complexos foram superpostos e são apresentados os ligantes, após a superposição. Observa-se que adotaram comportamento similar nas duas isoformas.

3.4. ESTUDOS DE DOCKING DE COMPOSTOS DA FAMÍLIA PRO

3.4.1. ESTUDOS DE DOCKING NA ENZIMA COX-2

Após ter sido selecionada a melhor solução para cada ligante no sítio ciclooxigenase é possível fazer uma comparação entre estas soluções, verificando similaridades e diferenças entre a família estudada. Na Tabela 3.3 são apresentados os escores de cada pose para cada ligante. Uma descrição mais completa com as tabelas de interações, bem como as figuras que mostram algumas das interações entre os ligantes e os receptores são apresentadas no **Apêndice 3.2**.

Tabela 3.3. Escores dos complexos calculados formados entre os ligantes PRO* e a enzima COX-2

ligante X = SO₂	escore (kcal/mol)			escore (kcal/mol)	
	R	S			R
1_SO ₂ _Br	67.3	64.3			
2_SO ₂ _CH ₃	66.1	65.6			
3_SO ₂ _H	62.4	63.6			
4_SO ₂ _NO ₂	63.9	66.0			
5_SO ₂ _OCH ₃	74.5	74.1			
ligante X = SO	escore (kcal/mol)		ligante X = S	escore (kcal/mol)	
	R	S		R	S
6_SO_Br	67.6	64.8	11_S_Br	60.9	65.4
7_SO_CH ₃	66.3	65.3	12_S_CH ₃	66.2	64.2
8_SO_H	63.8	64.7	13_S_H	62.6	61.7
9_SO_NO ₂	63.8	63.7	14_S_NO ₂	62.9	65.3
10_SO_OCH ₃	70.9	71.6	15_S_OCH ₃	68.3	70.5

*Os escores em destaque são maiores que os demais nas suas em relação ao substituinte X (S, SO, SO₂) e Y = OCH₃.

Os melhores escores (Tabela 3.3) foram obtidos para os compostos em que $Y = \text{OCH}_3$, com valores bem maiores que para os demais, e o do grupo $X = \text{SO}_2$ ($5_SO_2_OCH_3$) tem escore da ordem do escore cristalográfico (Figura 3.7).

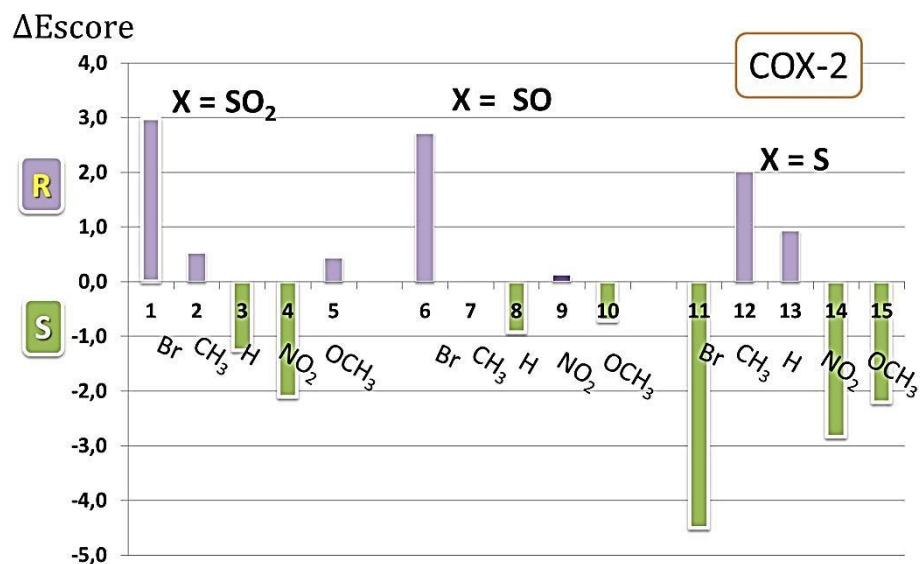


Figura 3.7. Para poder avaliar melhor a diferença R-S, o gráfico apresenta os $\Delta\text{Escore} = \text{escore R} - \text{escore S}$, obtidos por cálculos de docking das poses selecionadas por visualização molecular. Acima do eixo x estão os resultados preferenciais para o enantiômero R e abaixo com o S, com um

Δ Escore máximo = 4,5 kcal/mol.

Para a COX-2, foi verificado um comportamento similar para os enantiômeros S, principalmente com os substituintes $X = S$ e SO_2 conforme pode ser observado na Figura 3.8 que mostra a orientação relativa dos ligantes. Observa-se que os enantiômeros S apresentam mais similaridade em relação à pose dentro do sítio que os R, principalmente os com substituintes $Y = OCH_3$ e com a seguinte ordem para X , $S < SO < SO_2$, conforme apresentado na Tabela 3.3 (destacados em amarelo).

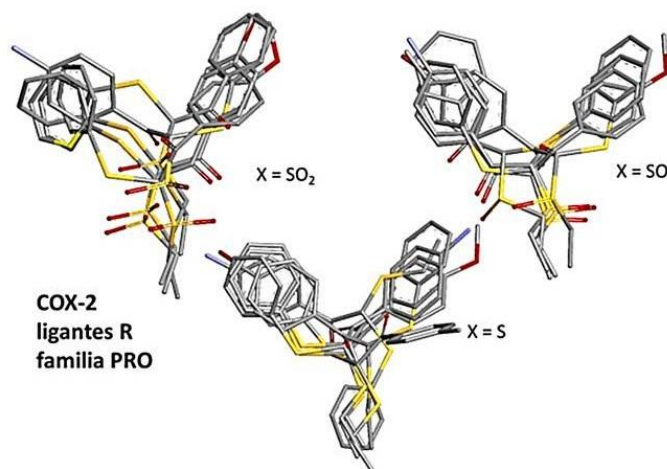
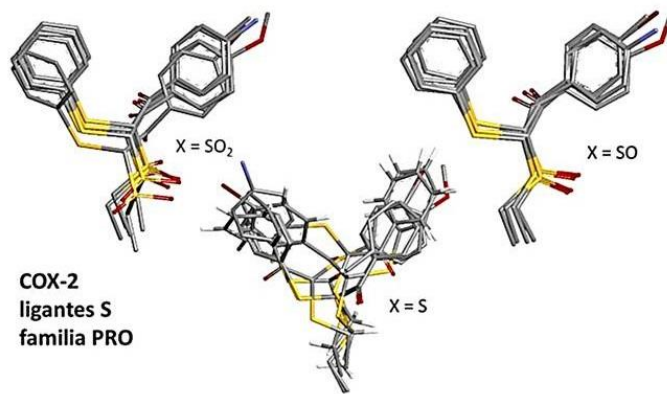
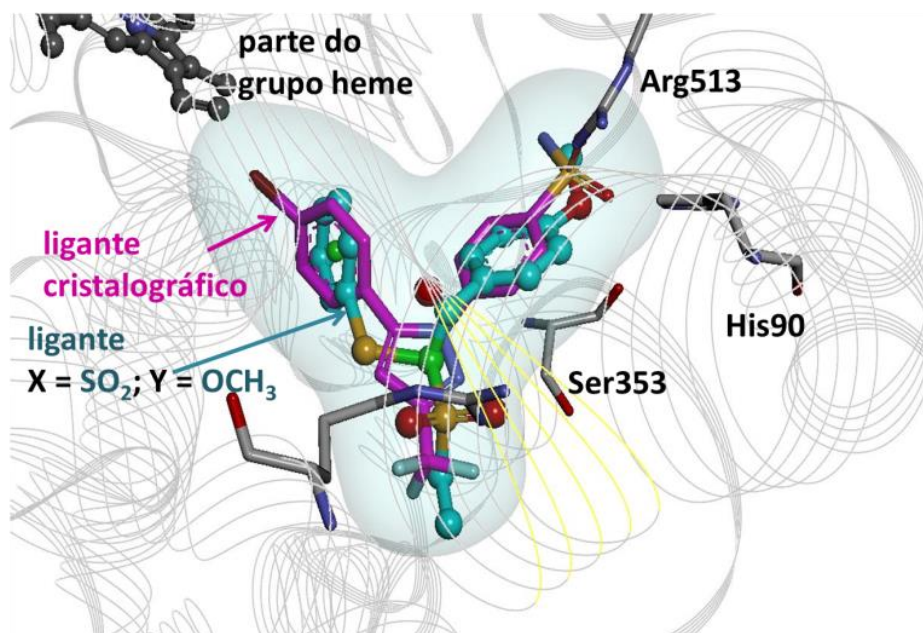


Figura 3.8. Ligantes da família PRO no sítio ativo da COX-2. Os ligantes são apresentados nos grupos relativos ao substituinte X (SO_2 , SO, S). Também podem ser observados enantiômeros S em cima e os R na parte de baixo. Os hidrogênios estão ocultos para facilitar a comparação.

Na Figura 3.9, é possível ver uma parte do grupo heme, cofator desta enzima, próximo ao sítio ativo de COX-2, os aminoácidos que interagem com o ligante cristalográfico, apresentados com os átomos de C em magenta, e o melhor ligante da série PRO com os átomos de C em azul. A superfície de van der Waals relativa ao ligante cristalográfico, em azul claro, é adequada também para o ligante calcogênio.

Os valores de escore das poses selecionadas apresentam sistematicamente um valor um pouco maior para o substituinte $Y = OCH_3$. O ligante cristalográfico de 1cx2 e as moléculas estudadas apresentam motivos similares: as duas têm anéis fenila, e na posição onde o ligante cristalográfico apresenta o anel triazol, os ligantes apresentam o carbono assimétrico (Figura 3.9). Assim, pode-se concluir que esta série de compostos apresenta potencial para inibir a COX-2.



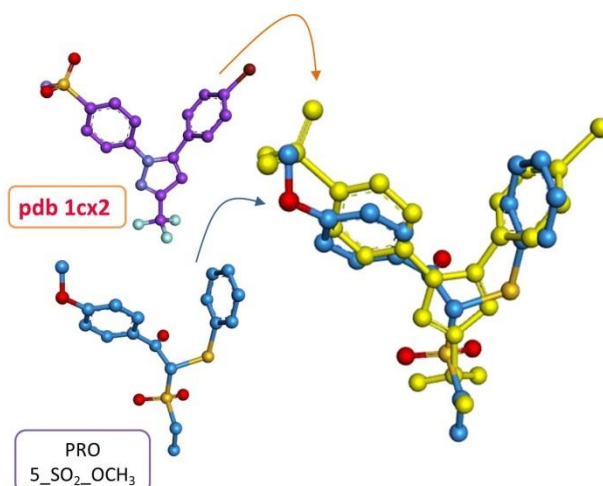


Figura 3.9. Em cima: O sítio ativo da enzima COX-2 é apresentado e é possível observar os aminoácidos que interagem com o ligante cristalográfico, apresentados com os átomos de C em magenta, e o melhor ligante da série estudada, 5_SO₂_OCH₃, com os átomos de C em azul, superpostos. A superfície de van der Waals foi calculada para o ligante cristalográfico, mas também é adequada para envolver o ligante selecionado. **Embaixo: Os ligantes cristalográficos e o melhor composto da família PRO, sendo que** na posição onde o ligante cristalográfico apresenta o anel triazol, os ligantes apresentam o carbono assimétrico.

3.4.1.1. COMPOSTOS DA FAMÍLIA PRO COM GRUPO X = SO

Os compostos com grupo X= SO apresentaram pose (Figura 3.10) e escores (Tabela 3.4) semelhante aos demais no sítio ativo da COX-2. Apenas o composto 10_SO_OCH₃ apresentou escore próximo de 70 não havendo, portanto, resultados diferentes para esses compostos em relação à família de compostos estudada.

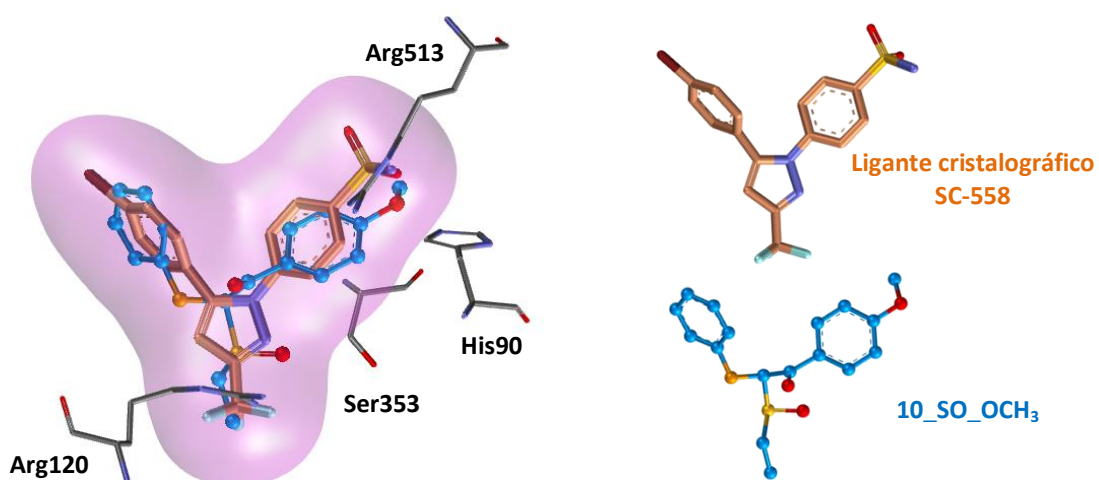
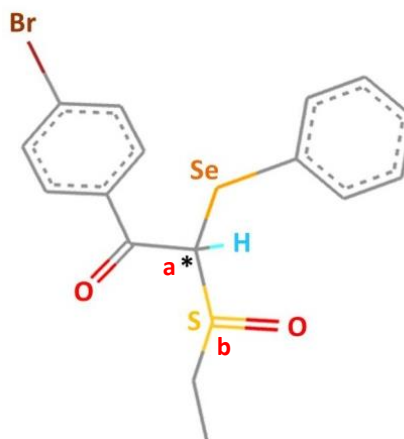


Figura 3.10. Pose dos compostos com X = SO no sítio ativo da enzima COX-2. É possível observar os aminoácidos que interagem com o ligante cristalográfico, apresentados com os átomos de C em laranja, e o ligante 10_SO_OCH₃, com os átomos de C em azul, superpostos.

Tabela 3.4. Escores dos complexos formados entre os ligantes PRO* com X = SO e a enzima COX-2

ligante	escore (kcal/mol)	
	Cr/Sr	Cs/Ss
6_SO_Br	62.4	66.6
7_SO_CH ₃	62.9	66.3
8_SO_H	60.3	61.3
9_SO_NO ₂	64.5	68.1
10_SO_OCH ₃	68.4	69.1
ligante	escore ** (kcal/mol)	
	Cr/Ss	Cs/Sr
6_SO_Br	67.6	64.8
7_SO_CH ₃	66.3	65.3
8_SO_H	63.8	64.7
9_SO_NO ₂	63.8	63.7
10_SO_OCH ₃	70.9	71.6



*Os ligantes estão apresentados de acordo com a configuração dos centros estereogênicos do carbono e do enxofre.

** Esses escores são os mesmo já apresentados na Tabela 3.3, uma vez que foram estudados anteriormente aos estudos de todos os diastereoisômeros.

Como os resultados para os compostos Cr/Sr e Cs/Ss não apresentaram diferença relevante para os estudos posteriores e, na mistura racêmica utilizada para os estudos *in vivo*, prevalecem os compostos de configuração Cr/Ss e Cs/Sr, os compostos de mesma configuração relativa não são apresentados nos resultados a seguir. Apenas são apresentadas algumas das interações, nos **Apêndices 3.2** e **3.3**, e a posição dos ligantes nos subsítios, no **Apêndice 3.4**.

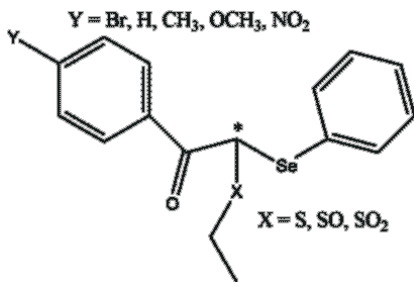
3.4.2. ESTUDOS DE DOCKING NA ENZIMA COX-1

Uma descrição mais completa com as tabelas de interações, bem como as figuras que mostram algumas das interações entre os ligantes e os receptores são apresentadas no **Apêndice 3.2**.

Na Tabela 3.5 são apresentados os escores de cada pose para cada ligante. Os resultados dos estudos de docking para os compostos PRO em COX-1, não foram tão

claros e óbvios no sentido de identificar os melhores compostos, uma vez que os escores foram mais próximos e não houve um destaque como no caso de COX-2.

Tabela 3.5. Escores dos complexos calculados formados entre os ligantes PRO e a enzima COX-1

ligante $X = SO_2$	escore (kcal/mol)			escore (kcal/mol)	
	R	S			R
1_SO2_Br	75.3	74.4			
2_SO2_CH3	75.5	74.8			
3_SO2_H	72.9	68.6			
4_SO2_NO2	74.5	66.0			
5_SO2_OCH3	76.0	73.8			
ligante $X = SO$	escore (kcal/mol)		ligante $X = S$	escore (kcal/mol)	
	R	S		R	S
6_SO_Br	73.8	74.1	11_S_Br	71.3	74.5
7_SO_CH3	72.3	73.3	12_S_CH3	73.1	71.2
8_SO_H	71.8	67.0	13_S_H	68.0	70.4
9_SO_NO2	74.3	69.4	14_S_NO2	69.4	73.6
10_SO_OCH3	74.5	72.4	15_S_OCH3	71.9	74.1

A Figura 3.11 mostra a orientação relativa dos ligantes considerando os substituintes e os enantiômeros.

Uma comparação entre os escores das poses selecionadas para os enantiômeros R e S em COX-1 permitiu construir o gráfico apresentado na Figura 3.12. No caso de COX-2, a orientação dos compostos (Figura 3.8) mostra padrões de orientação mais definidos no caso dos enantiômeros S e X = SO₂ X = SO; para COX-1 (Figura 3.11), o padrão de orientação mais definido é apenas para X = SO₂ no caso do enantiômero S.

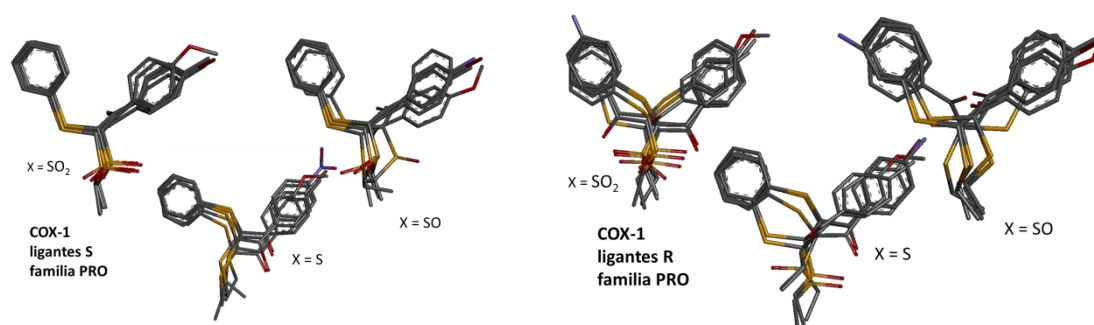


Figura 3.11. Ligantes da família PRO no sítio ativo da COX-1. Os ligantes são apresentados nos grupos relativos ao substituinte X (SO₂, SO, S). À esquerda podem ser observados os enantiômeros S e à direita os R. O grupo que apresenta poses mais similares é o do substituinte X = SO₂. Os hidrogênios estão

ocultos para facilitar a comparação.

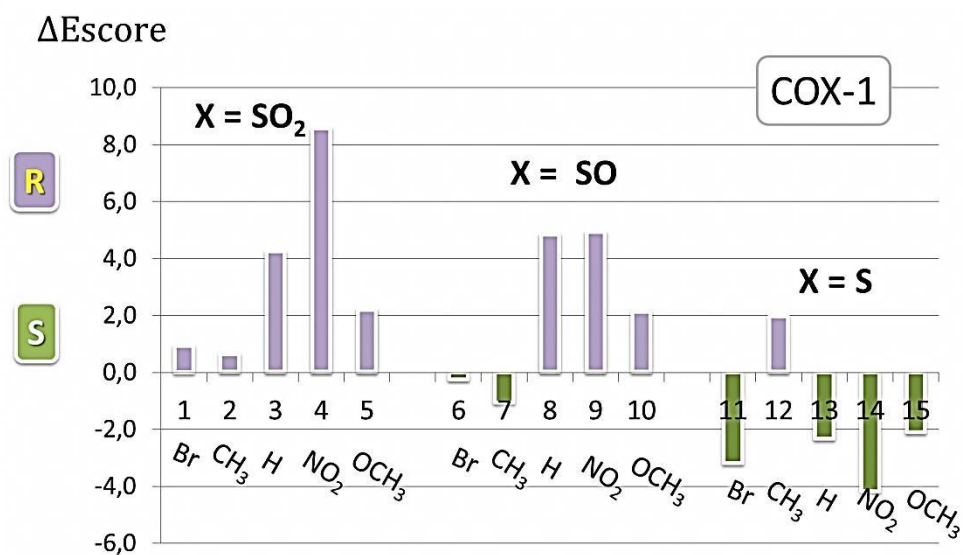


Figura 3.12. Para poder avaliar melhor a diferença R-S, o gráfico apresenta os $\Delta\text{Escore} = \text{escore R} - \text{escore S}$, obtidos por cálculos de docking das poses selecionadas por visualização molecular. Acima do eixo x estão os resultados que preferenciais para o enantiômero R e abaixo com o S, com um ΔEscore máximo = 8,6 kcal/mol.

3.4.3. ANÁLISE DOS SUBSÍTIOS E DAS INTERAÇÕES π

Uma vez que os compostos estão posicionados no sítio selecionado para ligação, fica ainda a pergunta, o que é determinante para a formação do complexo receptor-ligante. Inicia-se então a busca por verificar pontos que são essenciais para que o composto seja um inibidor. Nesta etapa, então, foi necessário observar vários resultados simultaneamente:

- (a) resultados dos cálculos de docking, com o escore e a pose;
- (b) as interações entre os átomos dos ligantes e os das proteínas, sendo que nesta etapa foi dada especial atenção às interações π ;
- (c) a ocupação dos subsítios.

A parte (a) foi detalhada anteriormente. Para completar a análise das interações que é feita por visualização molecular, foi feita uma análise das interações π utilizando um programa baseado em mapeamento vetorial, desenvolvido por Sacco (2013), de forma a caracterizar esse tipo de interações, com a possibilidade de medir ângulos e distâncias das interações π . Em alguns casos, este tipo de interações fracas pode ser

essencial e até mesmo um dos principais fatores responsáveis pela inibição (STEFANI et al., 2012). As interações estão detalhadas no **Apêndice 3.3**.

O estudo sobre a ocupação dos subsítios foi feita para cada um dos ligantes a está apresentado em detalhes no **Apêndice 3.4**.

Um resumo desta análise é apresentado a seguir em forma de tabelas, as Tabelas 3.5 e 3.6. As tabelas estão organizadas de forma que nas colunas estão todos os aminoácidos que fazem parte do sítio utilizado para cálculos, agrupados de acordo com o subsítio do qual fazem parte (S1, S2, S3 e S4). Nas duas primeiras linhas estão o ligante cristalográfico de 1kk6 (celecoxibe) e na segunda o ligante cristalográfico de 1cx2 (SC-558, um modelo para o celecoxibe). As interações e o escore foram obtidos por cálculos de docking. Nas outras linhas estão os compostos PRO (R e S) obtidos também por cálculos de docking.

Nas Tabelas 3.6 e 3.7 há vários aminoácidos marcados em amarelo, o que indica que estão envolvidos em interações π . Não foi possível verificar alguma correlação entre

atividade biológica e este tipo de interação. Parece que este tipo de interação é responsável apenas pela fixação do ligante no sítio.

Observar que nas Tabelas 3.6 e 3.7, o Celecoxibe e o SC-558 (1cx2) foram colocados para fins de comparação, uma vez que as estruturas tridimensionais dos complexos cristalográficos com COX-1 e COX-2 são conhecidas e a inibição *in vitro* também: o composto SC-558 possui IC_{50} igual a 0,0093 μM para COX-2, e de 17,7 μM para COX-1 (KURUMBAIL, STEVENS e GIERSE, 1996); o celecoxibe possui IC_{50} de 0,87 μM para COX-2 e 6,7 μM para COX-1 (MARDINI e FITZGERALD, 2001).

Os resultados para COX-2 (Tabela 3.6) mostram que a interação com o aminoácido H90 ocorre para todos os compostos que obtiveram maior score. Há também várias interações π , mas ocorrem com grande parte dos compostos e os resíduos de aminoácido V523, A527, L352, S353. Estas interações parecem servir para a fixação dos compostos no sítio, como já observado por Stefani, Botteselle et al., 2012. No caso de COX-1, não foi possível relacionar diretamente algum aminoácido com a atividade de inibição Tabela 3.5.

Tabela 3.6. Interações dos ligantes celecoxibe, SC-558, R-PRO e S-PRO com os resíduos de aminoácido de COX-1^a

Ligantes	Subsítio 1					Subsítio 2				Subsítio 3				Subsítio 4			Outros						Score ^e (kcal/mol)	Inibição (%)	
	H90	Q192	H513	S516	F518	Y348	Y385	W387	M522	V116	R120	Y355	L359	I345	L351	L534	I523	S353	L352	A527	V349	G526			
celecoxibe ^a	X			X				X				X	X				X	X	X	X	X			-78,3	
SC-558 ^d	X				X					X							X	X	X	X	X			-79,3	
1R_SO ₂ _Br												X					X		X	X				-75,3	12,6
1S_SO ₂ _Br					X												X	X	X					-74,4	12,6
2R_SO ₂ _H											X						X	X	X	X		X		-72,9	32,7
2S_SO ₂ _H																	X	X	X					-68,6	32,7
3R_SO ₂ _CH ₃											X								X	X		X		-74,4	10,2
3S_SO ₂ _CH ₃																	X	X	X					-74,8	10,2
4R_SO ₂ _NO ₂				X	X						X						X	X	X	X		X		-74,5	14,4
4S_SO ₂ _NO ₂																	X	X	X	X				-69,5	14,4
5R_SO ₂ _OCH	X							X			X						X	X	X	X				-76,0	10,8
5S_SO ₂ _OCH								X									X	X	X					-74,1	10,8
6R_SO_Br											X						X	X	X	X				-73,8	5,7
6S_SO_Br				X													X	X	X					-67,0	5,7
7R_SO_H											X						X	X	X	X		X		-71,8	20,3
7S_SO_H											X						X	X	X					-73,3	20,3

8R_SO_CH ₃	X														X	X	X	X	X	-72,3	3,5
8S_SO_CH ₃									X						X	X	X			-67,0	3,5
9R_SO_NO ₂					X				X						X	X	X	X	X	-74,3	60,2
9S_SO_NO ₂															X	X	X			-69,4	60,2
10R_SO_OC									X						X	X	X	X	X	-74,5	50,8
10S_SO_OC															X	X	X	X		-72,3	50,8
11R_S_Br															X	X	X	X	X	-71,3	4,8
11S_S_Br									X						X	X	X	X		-74,5	4,8
12R_SO_H						X									X	X	X	X	X	-68,0	n.d. ^b
12S_SO_H															X	X	X	X	X	-70,4	n.d. ^b
13R_S_CH ₃		X			X	X		X							X	X	X	X	X	-73,1	n.d. ^b
13S_S_CH ₃															X	X	X	X	X	-71,1	n.d. ^b
14R_S_NO ₂	X		X						X						X	X	X	X	X	-69,4	16,2
14S_S_NO ₂															X	X	X	X	X	-73,6	16,2
15R_S_OCH ₃															X	X	X	X	X	-71,9	n.d. ^b
15S_S_OCH ₃						X									X	X	X	X	X	-74,0	n.d. ^b

^a dados obtidos por análise da estrutura tridimensional de código pdb 3KK6 (RIMON et al, 2010), complexo COX-1-celecoxibe.

^b não foram determinados porque precipitaram conforme explicado na Seção A.

^c os que estão assinalados em amarelo indicam que há interações π .

^d ligante cristalográfico do complexo 1CX2

^e escores marcados em roxo < -70 kcal/mol

Tabela 3.7. Interações dos ligantes celecoxibe^a, SC-558, R-PRO e S-PRO com os resíduos de aminoácido de COX-2^a

Ligantes	Subsítio 1					Subsítio 2				Subsítio 3				Subsítio 4			Outros						Escore ^e (kcal/mol)	Inibição (%)	
	H90	Q192	R513	A516	F518	Y348	Y385	W387	M522	V116	R120	Y355	L359	I345	L351	L534	V523	S353	L352	A527	V349	G526			
celecoxibe ^a	X		X	X	X							X	X				X	X	X	X	X			-79,3	
SC-558 ^d	X			X	X		X	X			X	X					X	X		X	X			-80,3	
1R_SO ₂ _Br				X			X				X	X					X	X	X					-67,3	7,4
1S_SO ₂ _Br	X		X								X	X					X	X		X		X		-64,3	7,4
2R_SO ₂ _H							X	X				X					X	X		X				-62,4	32,9
2S_SO ₂ _H											X	X					X	X		X				-63,6	32,9
3R_SO ₂ _CH ₃							X				X	X					X	X	X					-66,1	24,7
3S_SO ₂ _CH ₃											X	X					X	X		X				-65,6	24,7
4R_SO ₂ _NO ₂							X				X	X					X	X	X	X				-63,9	23,6
4S_SO ₂ _NO ₂	X		X		X							X					X	X		X				-65,9	23,6
5R_SO ₂ _OCH ₃	X						X				X	X					X	X	X					-74,5	50,0
5S_SO ₂ _OCH ₃	X										X	X					X	X		X				-74,1	50,0
6R_SO_Br							X					X					X	X	X	X				-67,6	38,5
6S_SO_Br			X	X							X	X					X	X		X				-64,8	38,5
7R_SO_H							X	X									X	X		X				-63,8	7,0
7S_SO_H											X						X	X		X				-64,7	7,0

8R_SO_CH ₃								X							X				X	X		X	X	-66,3	15,2
8S_SO_CH ₃															X				X	X		X		-65,3	15,2
9R_SO_NO ₂								X							X				X	X	X			-63,1	17,9
9S_SO_NO ₂			X												X				X	X	X	X		-63,7	17,9
10R_SO_OCH ₃	X							X							X				X	X				-70,9	42,5
10S_SO_OCH ₃	X														X				X	X			X	-71,6	42,5
11R_S_Br															X				X	X	X	X		-60,9	2,8
11S_S_Br			X												X				X	X	X		X	-65,3	2,8
12R_SO_H															X				X	X		X		-62,6	n.d.**
12S_SO_H															X				X	X		X		-61,7	n.d.**
13R_S_CH ₃														X	X				X		X			-66,2	n.d.**
13S_S_CH ₃															X				X	X	X	X	X	-64,2	n.d.**
14R_S_NO ₂			X												X				X	X	X	X		-62,9	5,2
14S_S_NO ₂															X				X	X		X		-65,3	5,2
15R_S_OCH ₃	X	X						X							X				X	X			X	-68,3	n.d.**
15S_S_OCH ₃	X	X													X				X	X		X	X	-70,5	n.d.**

^a dados obtidos por análise da estrutura tridimensional de código pdb 3LN1 (WANG et al, 2010), complexo COX-2-celecoxibe.

^b não foram determinados porque precipitaram conforme explicado na Seção A.

^c os que estão assinalados em amarelo indicam que há interações π .

^d ligante cristalográfico do complexo 1CX2

^e escores marcados em roxo < -70 kcal/mol

Os aminoácidos apresentados nas Tabelas 3.6 e 3.1 seguem a numeração da estrutura cristalográfica de código PDB 1CX2. A estrutura tridimensional de código PDB 3LN1 (COX-2 complexada com o celecoxibe), segue numeração diferente desses aminoácidos e está indicada na Tabela 3.8. Nas Tabelas 3.6 e 3.7, para a análise da interação de celecoxibe com COX-2, seguiu-se a numeração de 1cx2 para fins de comparação.

Tabela 3.8. Equivalência entre aminoácidos das estruturas de código pdb 1CX2 e 3LN1

PDB	Subsítio 1					Subsítio 2				Subsítio 3				Subsítio 4			Outros					
1CX2	H90	Q192	R513	A516	F518	Y348	Y385	W387	M522	V116	R120	Y355	L359	I345	L351	L534	V523	S353	L352	A527	V349	G526
3LN1	H75	Q178	R499	A502	F504	Y334	Y371	T373	M508	V102	R106	Y341	L345	I331	L517	L520	V509	S339	L338	A513	V335	G512

A partir da análise dos resultados, onde foram levados em conta a pose, o padrão de orientação dentro do grupo, as interações, o escore, e o escore relativo (comparação

com o redocking), é possível sugerir o composto 5_OCH3 como promissor para inibir seletivamente a COX-2.

3.5. EXPERIMENTO *IN VITRO*

Os experimentos *in vitro* são de extrema importância neste caso, pois como são realizados testes nas enzimas, é possível utilizá-los para comparar com os resultados *in silico* que também são realizados nas enzimas COX-1 e COX-2. Outro ponto importante, é que os estudos de docking foram realizados com os enantiômeros separadamente, enquanto que os testes de atividade foram feitos com a mistura racêmica.

3.5.1 RESULTADOS DOS EXPERIMENTOS *IN VITRO*

Dos 15 compostos iniciais, 3 precipitaram (12, 13 e 15) quando foram acrescentados os outros reagentes antes da incubação na placa, não sendo possível testá-los com o Ensaio Imunoenzimático (EIA) (conforme indicado no Capítulo 2 seção 2.3.1)

A seguir são apresentados os resultados obtidos segundo os procedimentos do protocolo estabelecido para o kit COX Inhibitor Assay Co. 560101 (Cayman Chemical Company, Ann Arbor, MI, USA), conforme descrito no Capítulo 2, Seção 2.2.1.

3.5.1.1 MICROPLACA

A Figura 3.13 a seguir mostra a microplaca após a incubação no *shaker* por 18 horas. A coloração amarelada para alguns poços indica que a reação não ocorreu, e que esses compostos não obtiveram inibição relevante para as enzimas COX-1 e COX-2.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	BLK	S1	S1	BC1	BC2	2H-100 COX-1	2H-150 COX-	6Br-100 COX-1	6Br-150 COX-1	10OCH ₃ -100 COX-1	11Br-150 COX-1	
B	BLK	S2	S2	BC1	BC2	2H-100 COX-2	2H-150 COX-2	6Br-100 COX-2	6Br-150 COX-2	10OCH ₃ -10 COX-2	11Br-150 COX-2	
C	NSB	S3	S3	IA2 COX-1	IA2 COX-2	3CH ₃ -100 COX-1	3CH ₃ -150 COX-1	7H-100 COX-1	7H-150 COX-1	11Br-100 COX-1	14NO ₂ -150 COX-1	
D	NSB	S4	S4	IA2 COX-1	IA2 COX-2	3CH ₃ -100 COX-2	3CH ₃ -150 COX-2	7H-100 COX-2	7H-150 COX-2	11Br-100 COX-2	14NO ₂ -150 COX-2	
E	B0	S5	S5	IA3 COX-1	IA3 COX-2	4NO ₂ -100 COX-1	4NO ₂ -150 COX-1	8CH ₃ -100 COX-1	8CH ₃ -150 COX-1	14NO ₂ -100 COX-1		
F	B0	S6	S6	IA3 COX-1	IA3 COX-2	4NO ₂ -100 COX-2	4NO ₂ -150 COX-2	8CH ₃ -100 COX-2	8CH ₃ -150 COX-2	14NO ₂ -100 COX-2		
G	B0	S7	S7	1Br-100 COX-1	1Br-150 COX-1	5OCH ₃ -100 COX-1	5OCH ₃ -100 COX-2	9NO ₂ -100 COX-1	9NO ₂ -150 COX-1	10OCH ₃ -150 COX-1		
H	TA	S8	S8	1Br-100 COX-2	1Br-150 COX-2	5OCH ₃ -100 COX-2	5OCH ₃ -150 COX-2	9NO ₂ -100 COX-2	9NO ₂ -150 COX-2	10OCH ₃ -150 COX-2		

Figura 3.13. Representação da microplaca após incubação. Os poços com coloração amarelada durante o experimento (destacados com tracejado rosa), indicam que a inibição não ocorreu.

3.5.1.2. CURVA PADRÃO DE PROSTAGLANDINA

Seguindo o protocolo do kit COX Inhibitor Assay Co. 560101 (Cayman Chemical Company, Ann Arbor, MI, USA), conforme descrito no Capítulo 2, Seção 2.2.1, a partir dos dados obtidos, foi construída a curva-padrão de prostaglandina. A curva-padrão corresponde à relação gráfica entre os valores de absorbância (A) e os de concentração. Na Figura 3.14, os valores de absorbância foram calculados, por meio de cálculos segundo protocolo do kit, e a concentração de PG é dada em pg/mL.

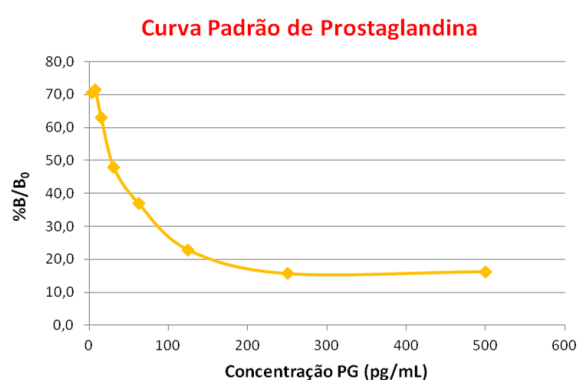


Figura 3.14. Curva Padrão de Prostaglandina obtida. No eixo y encontram-se os valores de $\%B/B_0$ calculados utilizando os valores de absorbância dos poços NSB , de B_0 e das amostras $S1$ à $S8$. No eixo x encontram-se os valores da concentração de prostaglandina em pg/mL.

Por meio de gráfico onde foram considerados os resultados dos experimentos, foi possível determinar a concentração de prostaglandina presente nas amostras dos compostos PRO para COX-1 e para COX-2 após reação na microplaca.

Na Figura 3.15 são apresentadas as curvas obtidas para as enzimas COX-1 e COX-2 para a concentração de 100 nM, em comparação com a Curva Padrão Obtida de Prostaglandina.

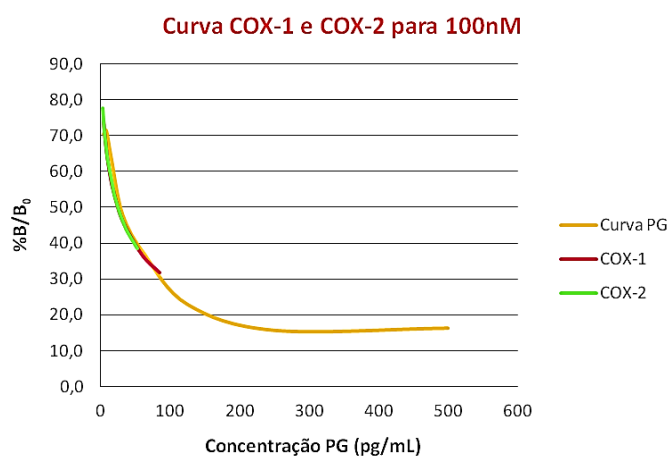


Figura 3.15. Valores de concentração de prostaglandina (eixo x) com as amostras dos compostos da família PRO, em concentração de 100 nM, para COX-1(em rosa) e COX-2 (em verde) e valores de %B/B₀ (eixo y), comparados com a Curva Padrão Obtida de PG (em amarelo).

Foi possível validar o experimento por meio desses valores para a Curva Padrão Obtida de Prostaglandina, uma vez que a curva estabelecida para as enzimas COX-1 e COX-2 com as amostras dos compostos da família PRO foi próxima a essa Curva Padrão obtida.

A partir desses resultados, foi possível continuar a análise e determinar a porcentagem de inibição de cada amostra dos compostos em estudo para as enzimas COX-1 e COX-2.

3.5.1.3. RESULTADOS DE INIBIÇÃO PARA COX-2

Na Figura 3.16 são apresentados os valores de inibição dos compostos PRO frente à enzima COX-2.

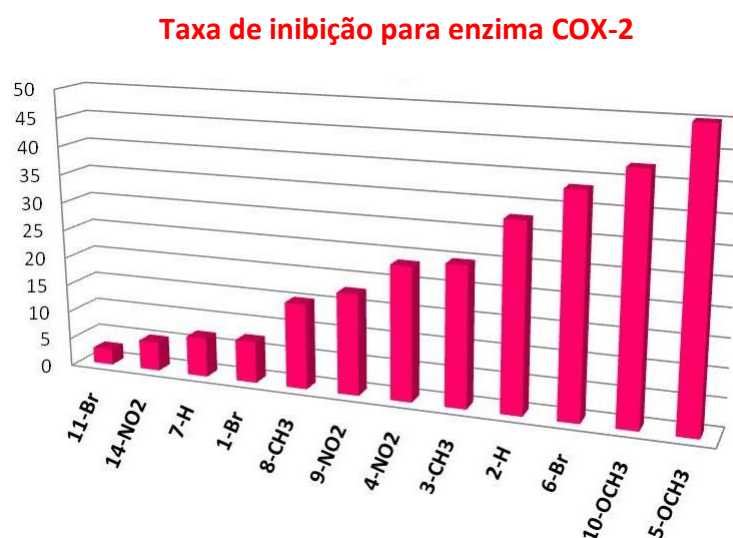


Figura 3.16. Valores de inibição para COX-2 na concentração de 100 nM. O composto 5_ OCH₃ apresentou melhor taxa de inibição para essa enzima.

Os resultados de inibição da COX-2 mostraram que o composto 5_OCH₃ obteve maior taxa de inibição para essa enzima, seguido de 6_Br e 10_OCH₃, enquanto o composto 11_Br apresentou menor taxa de inibição.

3.5.1.4. RESULTADOS DE INIBIÇÃO PARA COX-1

Na Figura 3.17 é apresentado o gráfico com os valores de inibição dos compostos PRO frente à enzima COX-1.



Figura 3.17. Valores de inibição para COX-1 na concentração de 100 nM. O composto 9_NO₂ apresentou melhor taxa de inibição para essa enzima.

Os resultados do EIA para COX-1 mostraram que o composto 9_NO₂ obteve maior taxa de inibição, seguido por 10_OCH₃, para essa enzima na concentração de 100 nM e o composto 8_CH₃ apresentou menor valor de inibição.

3.5.1.5. COMPARAÇÃO DAS ATIVIDADES BIOLÓGICAS DOS COMPOSTOS PRO COM AS ENZIMAS COX-1 E COX-2

Foi possível observar que aqueles compostos com maior taxa de inibição para a COX-2 obtiveram pequena taxa de inibição para a COX-1, à concentração de 100 nM (Figura 3.16).

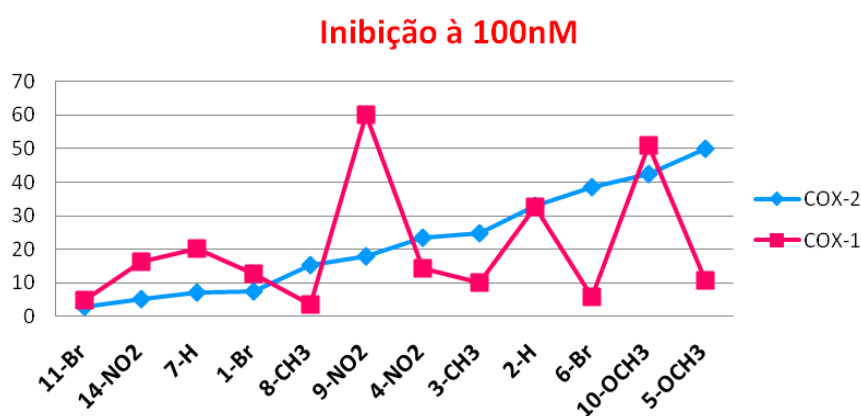


Figura 3.18. Valores de inibição dos compostos à 100 nM para COX-2 (linha em azul) e para COX-1 (linha em rosa). O composto 5-OCH₃ obteve maior taxa de inibição para COX-2 (50%) e pequena taxa de inibição para COX-1 (próximo de 10%). O composto 6-Br foi o segundo melhor.

Com estes testes foi possível determinar que os compostos mais promissores para inibir a enzima COX-2 foram 5_SO₂_OCH₃, 6_SO_Br, 10_SO_OCH₃ e, como se pretende uma baixa inibição de COX-1, os que apresentaram menor capacidade de inibir COX-1 foram 5_SO₂_OCH₃ e 6_SO_Br. Considerando que o composto mais favorável deve atender à uma baixa relação COX-2/COX-1 e que isto implica em ser o agente relativamente seletivo para COX-2, esses compostos foram selecionados para realização

do experimento *in vivo*. Apesar do composto 10_SO_OCH3 ter apresentado taxas de inibição semelhantes para COX-2 e COX-1, também foi selecionado para realização dos experimentos *in vivo* a fim de comparar sua ação com os demais.

3.5.2. COMPARAÇÃO ENTRE RESULTADOS OBTIDOS *IN VITRO* E *IN SILICO*

Um ponto importante que não foi ainda discutido, é que os experimentos *in silico* consideraram as moléculas em sua configuração R e S separadamente. No caso dos experimentos de atividade biológica *in vitro*, os mesmos foram conduzidos com a mistura racêmica e isto será levado em conta na discussão que segue.

A escolha do melhor inibidor obtido nos experimentos *in silico*, levou em conta o escore, as orientações relativas e o padrão de orientação no sítio. Também foi feita uma análise das interações, com indicativo da importância da interação com o aminoácido H90 no caso da COX-2, e nenhuma característica foi percebida para COX-1.

Para a COX-2, no caso dos compostos 1, 2, 3, 5, 10, 12, 13, 15 (Grupo I) o substituinte Y nos enantiômeros R e S ocupa o subsítio S1; nos demais casos (Grupo II),

ocupa S1 e S2, conforme apresentado na Tabela 3.9 e Figura 3.19. Fazem parte do subsítio S1 os seguintes resíduos de aminoácidos: His90, Gln192, Arg513, Ala516 e Phe518. Para todos os compostos foi observado que o substituinte X se encontrava próximo aos subsítios S3 e S4, fazendo interações com a Tyr355.

Tabela 3.9. Ocupação dos subsítios pelo substituinte Y em COX-2*

	Grupo I				Grupo II					
	Ligantes	Subsítio 1	Subsítio 2	Inibição (%)	Escore (kcal/mol)	Ligantes	Subsítio 1	Subsítio 2	Inibição (%)	Escore (kcal/mol)
celecoxibe	X				-79,3	4R_SO ₂ _NO ₂		R	23,6	-63,9
SC-558	X				-80,3	4S_SO ₂ _NO ₂	S		23,6	-65,9
1R_SO ₂ _Br	R		7,4		-67,3	6R_SO_Br		R	38,5	-67,6
1S_SO ₂ _Br	S		7,4		-64,3	6S_SO_Br	S		38,5	-64,8
2R_SO ₂ _H	R		32,9		-62,4	7R_SO_H		R	7,0	-63,8
2S_SO ₂ _H	S		32,9		-63,6	7S_SO_H	S		7,0	-64,7
3R_SO ₂ _CH ₃	R		24,7		-66,1	8R_SO_CH ₃		R	15,2	-66,3
3S_SO ₂ _CH ₃	S		24,7		-65,6	8S_SO_CH ₃	S		15,2	-65,3
5R_SO ₂ _OCH ₃	R		50,0		-74,5	9R_SO_NO ₂		R	17,9	-63,1
5S_SO ₂ _OCH ₃	S		50,0		-74,1	9S_SO_NO ₂	S		17,9	-63,7
10R_SO_OCH ₃	R		42,5		-70,9	11R_S_Br		R	2,8	-60,9
10S_SO_OCH ₃	S		42,5		-71,6	11S_S_Br	S		2,8	-65,3
12R_SO_H	R		n.d.		-62,6	14R_S_NO ₂	R		5,2	-62,9
12S_SO_H	S		n.d.		-61,7	14S_S_NO ₂		S	5,2	-65,3
13R_S_CH ₃	R		n.d.		-66,2					
13S_S_CH ₃	S		n.d.		-64,2					
15R_S_OCH ₃	R		n.d.		-68,3					

15S_S_OCH ₃	S	n.d.	-70,5					
------------------------	---	------	-------	--	--	--	--	--

*dados obtidos por análise da estrutura tridimensional de código pdb 3LN1 (WANG et al, 2010), complexo COX-2-celecoxibe. O composto celecoxibe não apresenta centro quiral.

Na Figura 3.19, observa-se a pose dos ligantes obtida por experimentos *in silico* e o posicionamento do substituinte Y em relação aos subsítios S1 e S2.

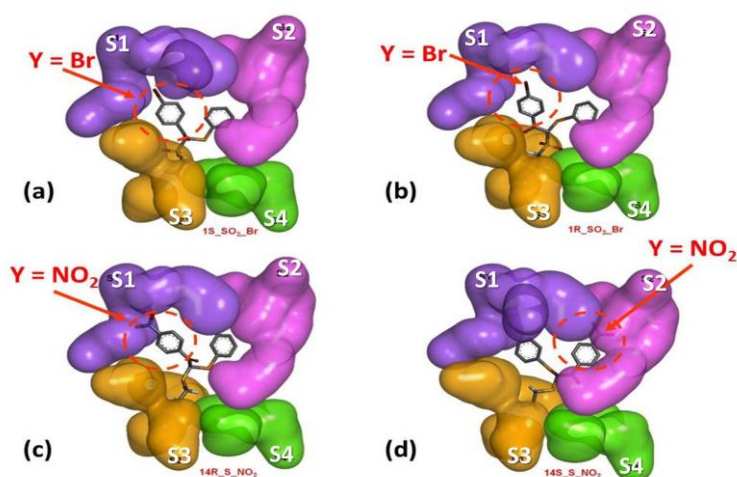


Figura 3.19. Ocupação dos subsítios obtida por experimentos *in silico* para COX-2 para dois compostos e seus enantiômeros. (a) e (b) Observa-se que o substituinte Y ocupa o subsítio S1 tanto no caso do

enantiômero R quanto do S. **(c)** e **(d)** O substituinte **Y** ocupa o subsítio **S1** (c) e **S2** (d), mostrando comportamento diferente para os enantiômeros.

No Grupo 1¹, encontram-se compostos que apresentaram maior taxa de inibição, com exceção do composto 1 e dos que não foi possível fazer a determinação (12 e 13). Outro aspecto a ser avaliado é que dentre os compostos do Grupo 1, apenas 5 (R e S), 10 (R e S) e 15 (R e S) interagem com o resíduo His90, que parece merecer atenção especial. Entre estes, a relação entre os escores de docking é:

$$5 (R e S) < 10 (R e S) < 15 (S); Y = OCH_3$$

Na Figura 3.20, observa-se a pose dos ligantes obtida por experimentos *in silico* e o posicionamento do substituinte Y em relação aos subsítios S1 e S2.

Os três compostos apresentam o substituinte Y = OCH₃ (Figura 3.20). As maiores taxas de inibição, considerando o substituinte X foram em ordem decrescente,

¹ Definição dos grupos conforme descrição do Capítulo 2, Seção 2.1.2.1.

$X = \text{SO}_2$ (composto 5) > $X = \text{SO}$ (composto 10) > $X = \text{S}$ (composto 15)

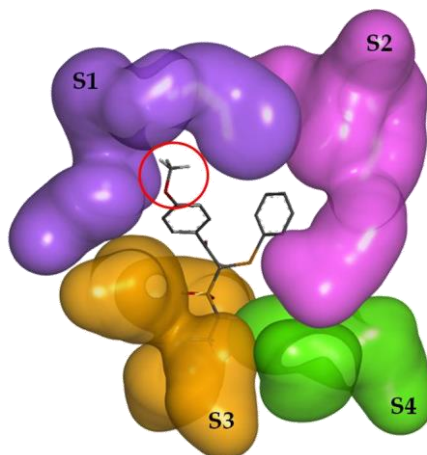


Figura 3.20. Representação do substituinte $Y = \text{OCH}_3$ (em destaque pelo círculo vermelho) no subsítio S1 (em roxo) da enzima COX-2.

No caso do Grupo 2, encontram-se compostos que apresentaram menor taxa de inibição, exceto os compostos 4 e 6. Mas entre os compostos deste grupo, somente 4R (e

não 4S) interagem com o resíduo His90 e todos apresentam escore de docking para a pose selecionada maiores que -70 kcal/mol.

Estes resultados levam a concluir, para a COX-2, que deve ocorrer a interação com o aminoácido H90, conforme observado (Tabela 3.6) e discutido anteriormente, porque ele está no sítio S1, como mostraram os resultados combinados da atividade *in silico* e *in vitro*.

No **Apêndice 3.4**, encontram-se a pose dos ligantes obtida por experimentos *in silico* e o posicionamento do substituinte Y em relação aos subsítios S1 e S2, utilizados para construir a Tabela 3.9 e a Figura 3.19.

Para a enzima COX-1, os parâmetros analisados foram os mesmos, porém aspectos que foram importantes para COX-2 não apareceram da mesma forma para COX-1. Ao contrário de COX-2, em que a interação com resíduo His90 foi relacionada com compostos de alta taxa de inibição (Tabela 3.7), em COX-1, aqueles que realizaram este tipo de interação foram os que tiveram a menor taxa de inibição (5, 8 e 14), embora não seja essencial, pois outros compostos com baixa taxa de inibição não interagiram com o

resíduo His90 (6, 11 e 13). Na maioria dos casos o substituinte Y ocupou o subsítio S2. Não foi possível relacionar as interações, o escore e a ocupação dos subsítios com a taxa de inibição em COX-1. Pode ser observado que mesmo nos casos conhecidos de celecoxibe e SC-558 que tem piores taxas de inibição em COX-1 que em COX-2, apresentam escores obtidos por docking similares aos de COX-2. Mesmo entre o celecoxibe e SC-558 que tem apenas um grupo substituinte diferente, as interações não são totalmente similares. A enzima COX-1 merece mais estudo para um melhor entendimento, o que está em andamento no BioMat.

Apesar de ser deficiente o entendimento *in silico* da COX-1, os dados de inibição *in vitro* dessa enzima mostram que os melhores inibidores são os compostos 9 e 10. A busca no que diz respeito à COX-1 tem como alvo compostos com taxas mais baixas de inibição. Dado que para COX-2 também foi encontrado que o composto 10 mostra boa atividade inibitória, isto não o torna um bom candidato a fármaco, pois inibe bem as duas enzimas. O composto 9 inibe bem apenas a enzima COX-1, o que o torna ainda mais

desfavorável. Já o composto 5, bom inibidor de COX-2 e capacidade baixa para inibir COX-1, parece ser um bom candidato para ser testado *in vivo*.

Tabela 3.10. Ocupação dos subsítios pelo substituinte Y em **COX-1***

Ligantes	Subsítio 1	Subsítio 2	Inibição (%)	Escore (kcal/mol)
celecoxibe	X			-78,3
SC-558	X			-79,3
1R_SO ₂ _Br		R	12,6	-75,3
1S_SO ₂ _Br		S	12,6	-74,4
2R_SO ₂ _H	R		32,7	-72,9
2S_SO ₂ _H		S	32,7	-68,6
3R_SO ₂ _CH ₃		R	10,2	-74,4
3S_SO ₂ _CH ₃		S	10,2	-74,8
4R_SO ₂ _NO ₂	R		14,4	-74,5
4S_SO ₂ _NO ₂		S	14,4	-69,5
5R_SO ₂ _OCH ₃		R	10,8	-76,0
5S_SO ₂ _OCH ₃		S	10,8	-74,1
6R_SO_Br		R	5,7	-73,8
6S_SO_Br		S	5,7	-67,0
7R_SO_H		R	20,3	-71,8

7S_SO_H		S	20,3	-73,3
8R_SO_CH ₃		R	3,5	-72,3
8S_SO_CH ₃		S	3,5	-67,0
9R_SO_NO ₂		R	60,2	-74,3
9S_SO_NO ₂		S	60,2	-69,4
10R_SO_OCH ₃		R	50,8	-74,5
10S_SO_OCH ₃		S	50,8	-72,3
11R_S_Br		R	4,8	-71,3
11S_S_Br		S	4,8	-74,5
12R_SO_H		R	n.d.	-68,0
12S_SO_H		S	n.d.	-70,4
13R_S_CH ₃		R	n.d.	-73,1
13S_S_CH ₃		S	n.d.	-71,1
14R_S_NO ₂	R		16,2	-69,4
14S_S_NO ₂		S	16,2	-73,6
15R_S_OCH ₃		R	n.d.	-71,9
15S_S_OCH ₃		S	n.d.	-74,0

* dados obtidos por análise da estrutura tridimensional de código pdb 3KK6 (RIMON et al, 2010), complexo COX-1-celecoxibe. O composto Celecoxib não apresenta centro quiral.

3.6. EXPERIMENTOS *IN VIVO*

3.6.1. RESULTADOS DOS EXPERIMENTOS *IN VIVO*

O intuito do trabalho é o de verificar se os compostos PRO, ou algum deles, podem atuar como fármaco e até o momento os estudos tiveram como foco as enzimas COX, relacionadas com processos anti-inflamatórios. O experimento *in silico* levou a selecionar o composto 5_SO₂_OCH₃, como o melhor seguido de 6_SO_Br e 10_SO_OCH₃. O experimento *in vivo* juntamente com o experimento *in silico* levou a selecionar, além do composto 5_SO₂_OCH₃, os compostos 6_SO_Br e 10_SO_OCH₃. O próximo passo é o de avaliar sua atividade anti-inflamatória. Para este propósito foram realizados dois experimentos, o teste de edema de pata, onde a inflamação foi induzida por carragenina ou zymosan, e a inibição do edema tratado com os compostos PRO 5_SO₂_OCH₃, 6_SO_Br, 10_SO_OCH₃ e celecoxibe, e foi mantido o grupo controle-PBS e o grupo apenas com o agente irritante.

No experimento I, foram avaliadas a espessura das patas e a temperatura retal, e no experimento II, foram avaliadas a espessura das patas e a temperatura por termografia, o que constituiu uma inovação que resulta menos desconforto para os animais e imprecisão nas medidas de temperatura.

Tabela 3.11. Desenho do experimento I e do experimento II

Ação 1: Medida da espessura 1h; 2h; 3h; 4h; 24h após aplicação do agente indutor

Ação 2: Medida da temperatura retal

Ação 3: Medida da temperatura utilizando câmera termográfica

Agentes	Inibidor	Inibidor	Inibidor	Inibidor
controle PBS				
Controle carragenina				
Controle Zymosan				
carragenina	celecoxibe	5_OCH ₃	6Br	10_OCH ₃
zymosan	celecoxibe	5_OCH ₃	6Br	10_OCH ₃

3.6.1.1. EXPERIMENTO I

O desenho do experimento está apresentado na Tabela 3.10 e inclui as ações 1 e 2; foi realizada com 4 animais para cada inibidor e 3 animais para os grupos controle.

3.6.1.1.1. ESPESSURA DA PATA**A. GRUPOS COM CARRAGENINA**

A Tabela 3.12 apresenta a média da variação da espessura da pata em que foi aplicado o agente inflamatório, imediatamente após aplicação. O valor da variação é resultado da diferença da medida da pata no momento após a aplicação da carragenina e no momento anterior. Foi possível observar que a espessura aumentou, em média, de 0,5 mm a 1,0 mm.

Tabela 3.12. Média da variação da espessura (mm) imediatamente após a aplicação da carragenina para todos os grupos

Grupo	Imediatamente após
PBS	0,53
Carragenina	0,60
5-OCH ₃ -Carragenina	0,88
Celecoxibe-Carragenina	0,95
6Br-Carragenina	1,00
10-OCH ₃ -Carragenina	1,00

O aumento das medidas era esperado uma vez que foi injetado líquido na pata. No entanto, foi um indicativo de que o agente foi aplicado corretamente e que, dessa forma, haveria o processo inflamatório no local.

Os experimentos e as figuras apresentando a espessura da pata para cada animal por grupo estão apresentados no **Apêndice 3.5**.

B. GRUPOS COM ZYMOSAN

A Tabela 3.13 também apresenta a média da variação da espessura da pata em que foi aplicado o agente inflamatório, imediatamente após aplicação. O valor da variação é resultado da diferença da medida da pata no momento após a aplicação do zymosan e no momento anterior. Foi possível observar que a espessura aumentou, em média, de 0,5 mm a 1,0 mm.

Tabela 3.13. Média da variação da espessura (mm) imediatamente após a aplicação do Zymosan para todos os grupos

Grupo	Imediatamente após
PBS	0,53
Carragenina	0,97
5-OCH ₃ -Carragenina	0,75
Celecoxibe-Carragenina	1,03
6Br-Carragenina	1,00
10-OCH ₃ -Carragenina	1,00

O aumento das medidas era esperado uma vez que foi injetado líquido na pata. No entanto, foi um indicativo de que o agente foi aplicado corretamente e que, dessa forma, haveria o processo inflamatório no local.

Os experimentos e as figuras apresentando a espessura da pata para cada animal por grupo estão apresentados no **Apêndice 3.5**.

C. COMPARAÇÃO ENTRE OS GRUPOS

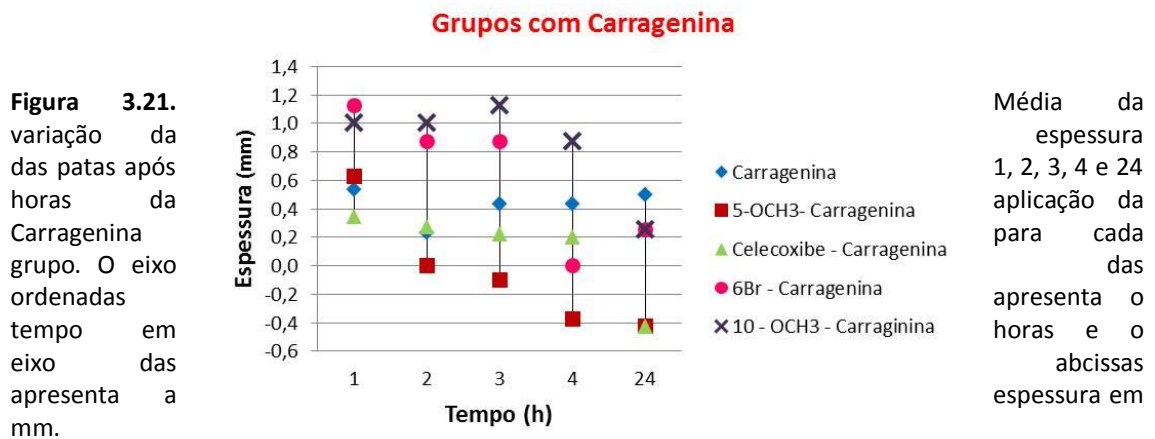
Foi possível observar que, de uma maneira geral, o celecoxibe e os compostos com possível atividade anti-inflamatória tiveram melhor desempenho quanto à diminuição do edema da pata nos grupos nos quais foram aplicados a carragenina como agente inflamatório.

Sabe-se que o zymosan ativa as células Th1 e Th17, as quais estão presentes em doenças inflamatórias crônicas, como a artrite reumatoide (ZARPELON, 2011; WEI et al., 2001). Dessa forma, os compostos testados não são sugeridos para o tratamento da

inflamação crônica, uma vez que apresentaram melhor redução do edema no modelo induzido pela carragenina e não pelo zymosan.

Além disso, o composto 5-OCH₃ demonstrou ter melhor desempenho que os demais em relação à diminuição do edema de pata. Esse composto também apresentou melhor atividade *in vitro* quanto à inibição para COX-2, apresentando menor inibição para COX-1, conforme apresentado anteriormente.

A Figura 3.21 apresenta a variação da média da espessura das patas de todos os grupos após 1, 2, 3, 4 e 24 horas da aplicação da carragenina.



Na Figura 3.21 é possível observar que os animais que foram tratados com o composto 5-SO₂OCH₃ e celecoxibe apresentaram comportamento semelhante em relação à diminuição da espessura da pata. Após 1 hora da aplicação desses compostos, todos os animais apresentaram diminuição do edema, mantendo a diminuição durante os períodos em que foi medido o edema.

A Figura 3.22 apresenta a espessura das patas de todos os grupos após 1, 2, 3, 4 e 24 horas da aplicação do zymosan.

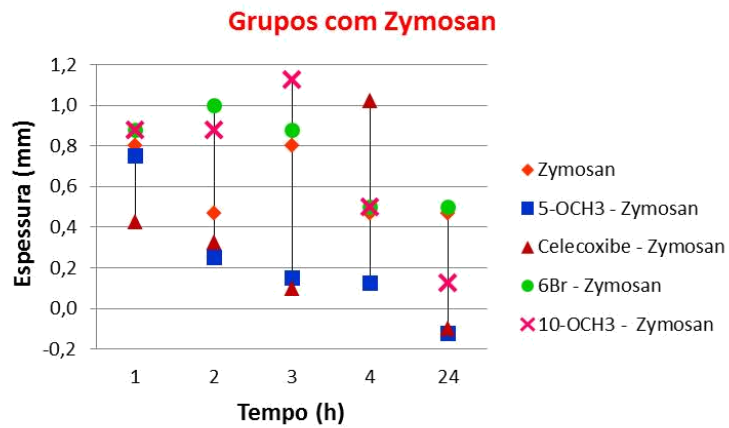


Figura 3.22. Média da variação da espessura das patas após 1, 2, 3, 4 e 24 horas da aplicação do Zymosan para cada grupo. O eixo das ordenadas apresenta o tempo em horas e o eixo das abscissas apresenta a espessura em mm.

Na Figura 3.22 é possível observar os compostos testados diminuíram a espessura da pata em um tempo maior daquele observado quando o agente inflamatório foi a carragenina, sendo que essa diminuição não foi mantida ao longo dos períodos observados. Também não houve semelhança de comportamento entre os compostos para esse caso. Esses resultados sugerem que os compostos testados não atuaram de forma eficiente quando o agente inflamatório é o zymosan. Sendo este envolvido com inflamação crônica (ZARPELON, 2011; WEI et al., 2001), pode-se sugerir que esses inibidores não são apropriados para esse tipo de tratamento.

3.6.1.1.2. TEMPERATURA

Os resultados estão apresentados na Tabela 3.14, contendo variação da temperatura (°C) retal para cada animal. É apresentada a diferença entre os valores de antes e após 24 horas da aplicação do PBS e dos agentes inflamatórios.

Os valores negativos indicam que a temperatura diminuiu em relação à temperatura antes da aplicação dos agentes inflamatórios.

Foi possível observar que os grupos nos quais foi aplicado o zymosan como agente inflamatório apresentaram melhor atividade quanto à diminuição da temperatura em relação aos grupos nos quais foram aplicados a carragenina.

Para os grupos com zymosan, foi observado que o grupo Celecoxib-Zymosan (em destaque na Tabela 3.14) apresentou melhor resultado quanto à diminuição da temperatura retal após 24 horas da aplicação do zymosan, quando comparado aos outros grupos e ao grupo controle.

Já para os grupos com carragenina, notou-se que o grupo 5-OCH3-Carragenina (em destaque na Tabela 3.14) apresentou melhor resultado quanto à diminuição da temperatura retal após 24 horas da aplicação da carragenina quando comparado aos outros grupos e ao grupo controle.

Tabela 3.14. Comparação da variação da temperatura retal dos grupos com zymosan e com carragenina

Grupos com Carragenina	Após 24 horas	Grupos com Zymosan	Após 24 horas
CARRAGENINA A	0,7	ZYMOSAN A	-0,4
CARRAGENINA B	1	ZYMOSAN B	-0,5

CARRAGENINA C	0,1	ZYMOSAN C	1,7
5-OCH3 CAR. A	-0,8	5-OCH3 ZYM. A	1,3
5-OCH3 CAR. B	-1,4	5-OCH3 ZYM. B	0,7
5-OCH3 CAR. C	-0,4	5-OCH3 ZYM. C	0,3
5-OCH3 CAR. D	-0,9	5-OCH3 ZYM. D	0,7
CELECOXIB CAR. A	2,5	CELECOXIB ZYM. A	0,9
CELECOXIB CAR. B	1,1	CELECOXIB ZYM. B	-1,1
CELECOXIB CAR. C	0	CELECOXIB ZYM. C	0,5
CELECOXIB CAR. D	1,1	CELECOXIB ZYM. D	-1,1
6Br CAR. A	1,1	6Br ZYM. A	-0,1
6Br CAR. B	1,5	6Br ZYM. B	-0,2
6Br CAR. C	0,3	6Br ZYM. C	0,3
6Br CAR. D	1,8	6Br ZYM. D	-0,1
10-OCH3 CAR. A	0	10-OCH3 ZYM. A	-0,3
10-OCH3 CAR. B	1	10-OCH3 ZYM. B	-0,1
10-OCH3 CAR. C	0,4	10-OCH3 ZYM. C	-0,8
10-OCH3 CAR. D	0,4	10-OCH3 ZYM. D	1,5

Os resultados apresentados na Tabela 3.14 sugerem que os compostos testados atuaram melhor para diminuição da temperatura no modelo animal utilizando

carragenina como agente inflamatório. Dos compostos testados, vale destacar que o composto 5_SO₂_OCH₃ apresentou melhores resultados, uma vez que foi observado que para todos os animais houve diminuição da temperatura antes e depois da aplicação do agente irritante.

3.6.1.1.3. COMPARAÇÃO ENTRE TEMPERATURA E ESPESSURA

Não foi possível estabelecer uma comparação entre a temperatura média e a espessura média da pata dos camundongos, visto que a temperatura média só foi observada nos instantes de tempo inicial e final.

3.6.1.2 EXPERIMENTO II

O desenho do experimento está apresentado na Tabela 3.11 e inclui as ações 1 e 3; foi realizada com 4 animais para cada inibidor e 3 animais para os grupos controle.

No experimento II, houve mudança, em relação ao experimento I na forma de medir a temperatura. No Experimento I houve dificuldades para medir a temperatura

utilizando um termômetro via retal, uma vez que causava desconforto aos animais e, assim, dificultando medir a temperatura com exatidão. Dessa forma, o experimento foi repetido utilizando metodologia que não agredisse e incomodasse os animais e que permitisse obter medidas mais exatas. Para isso foi utilizada uma câmera termográfica, a qual permite medir a temperatura local das patas. Além de obter medidas mais exatas, foi possível detectar mudanças de temperaturas na pata onde foi aplicado o agente inflamatório e comparar com a pata em que não recebeu esse agente.

3.6.1.2.1. ESPESSURA DAS PATAS

A. GRUPOS COM CARRAGENINA

Foi observado para todos os grupos que houve aumento, em média, na espessura da pata quando medida imediatamente após a aplicação dos agentes irritantes de 1,0 a 1,2 mm (Tabela 3.15). Os valores de todas as medidas para todos os animais estão apresentados no **Apêndice 3.5**. A tabela a seguir mostra a média da variação, obtida pela

média da diferença dos valores antes da aplicação e imediatamente após a aplicação da carragenina.

Tabela 3.15. Média da variação da espessura (mm) imediatamente após a aplicação do Carragenina para todos os grupos

Grupo	Imediatamente após
PBS	1,00
Carragenina	1,20
5-OCH ₃ -Carragenina	1,10
Celecoxibe-Carragenina	1,00
6Br-Carragenina	1,00
10-OCH ₃ -Carragenina	1,10

O aumento das medidas era esperado uma vez que foi injetado líquido na pata. No entanto, foi um indicativo de que o agente foi aplicado corretamente e que, dessa forma, haveria o processo inflamatório no local.

Os experimentos e as figuras apresentando a espessura da pata para cada animal por grupo estão apresentados no **Apêndice 3.5**.

B. GRUPOS COM ZYMOBAN

Foi observado para todos os grupos que houve aumento na espessura pata quando medida imediatamente após a aplicação dos agentes irritantes de, em média, 0,8 a 1,0 mm (Tabela 3.16). Os valores de todas as medidas para todos os animais estão apresentados no **Apêndice 3.5**. A tabela a seguir mostra a média da variação, obtida pela média da diferença dos valores antes da aplicação e imediatamente após a aplicação do zymosan.

Tabela 3.16. Média da variação da espessura (mm) imediatamente após a aplicação do Zymosan para todos os grupos

Grupo	Imediatamente após
PBS	1,00
Carragenina	1,00
5-OCH ₃ -Carragenina	0,80
Celecoxibe-Carragenina	1,00
6Br-Carragenina	1,00
10-OCH ₃ -Carragenina	1,00

C. COMPARAÇÃO ENTRE OS GRUPOS

Foi possível observar também que, de uma maneira geral, o celecoxibe e os compostos com possível atividade anti-inflamatória tiveram melhor desempenho quanto à diminuição do edema da pata nos grupos nos quais foram aplicados a carragenina como agente inflamatório.

Uma vez que o zymosan ativa as células Th1 e Th17, as quais estão presentes em doenças inflamatórias crônicas, como a artrite reumatoide (ZARPELON, 2011; WEI et al., 2001), pode-se sugerir que os compostos testados não são indicados para o tratamento da inflamação crônica, visto que apresentaram melhor redução do edema no modelo induzido pela carragenina e não pelo zymosan.

Também para o experimento II, o composto 5-OCH₃ demonstrou ter melhor desempenho que os demais em relação à diminuição do edema de pata. No entanto, ainda é necessário aprofundar os conhecimentos sobre a ação desses compostos *in vivo* e, também para isso, as análises estatísticas, bem como as análises imunohistoquímicas e patológicas estão em andamento.

A Figura 3.23 apresenta a espessura das patas de todos os grupos após 1, 2, 3, 4 e 24 horas da aplicação da carragenina.

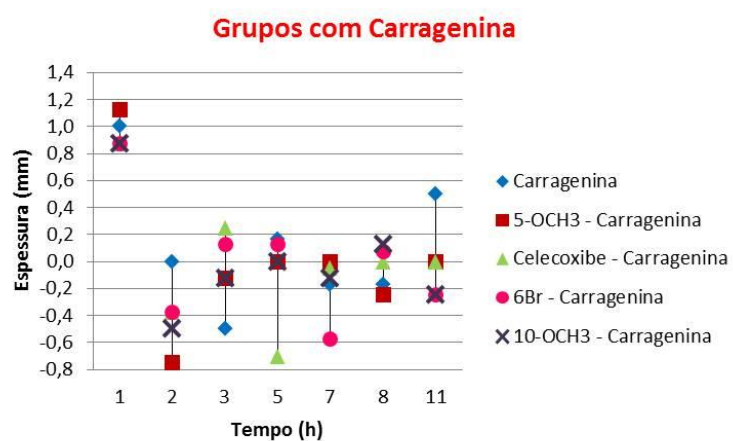


Figura 3.23. Média da variação da espessura das patas após 1, 2, 3, 4 e 24 horas da aplicação da Carragenina, para cada grupo. O eixo das ordenadas apresenta o tempo em horas e o eixo das abcissas apresenta a espessura em mm.

Na Figura 3.23 é possível observar também que os animais que foram tratados com o composto 5- $\text{SO}_2\text{-OCH}_3$ e celecoxibe apresentaram comportamento semelhante

em relação à diminuição da espessura da pata. Após 1 hora da aplicação desses compostos, os animais apresentaram diminuição do edema, mantendo a diminuição durante os períodos em que foi medido o edema, exceto para o animal B, no qual foi aplicado o composto 5_OCH₃.

A Figura 3.24 apresenta a espessura das patas de todos os grupos após 1, 2, 3, 4 e 24 horas da aplicação do zymosan.

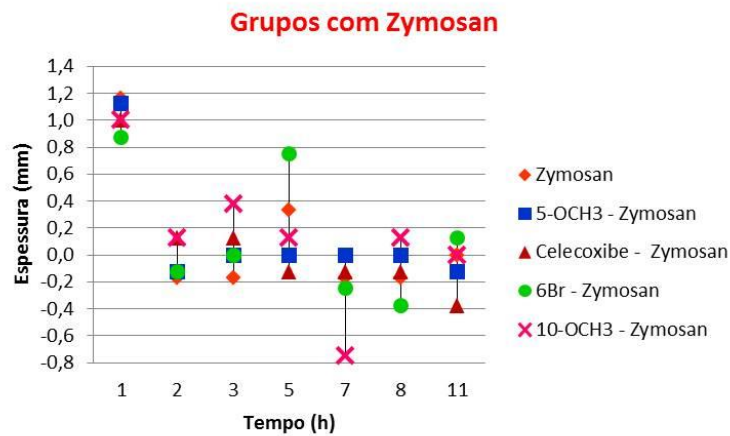


Figura 3.24. Média da variação da espessura das patas após 1, 2, 3, 4 e 24 horas da aplicação do Zymosan, para cada grupo. O eixo das ordenadas apresenta o tempo em horas e o eixo das abcissas apresenta a espessura em mm.

Na Figura 3.24 é possível observar os compostos testados também levaram um tempo maior para diminuição do edema daquele observado quando o agente inflamatório foi a carragenina, sendo que essa diminuição não foi mantida ao longo dos períodos observados. Esses resultados sugerem que os compostos testados não atuaram de forma eficiente quando o agente inflamatório é o zymosan. Uma vez que esse agente inflamatório está envolvido com inflamação crônica (ZARPELON, 2011; WEI et al., 2001), pode-se sugerir que esses inibidores não são apropriados para esse tipo de tratamento.

Da mesma forma que para o Experimento I, foi observado que o composto 5_SO₂_OCH₃ obteve melhores resultados em relação aos outros compostos, tendo comportamento semelhante ao celecoxibe, anti-inflamatório comercializado. Sendo assim, como resultado parcial, pode-se sugerir esse composto como um promissor candidato à anti-inflamatório, seletivo à COX-2.

As figuras apresentando a espessura da pata para cada animal por grupo estão apresentadas no **Apêndice 3.2**.

3.6.1.2.2. TEMPERATURA

Durante as medidas, houve o cuidado de evitar qualquer ação que interferisse na medida da temperatura. Dessa forma, para que a temperatura do ambiente e a das mãos que manusearam os animais não interferissem nas temperaturas obtidas, os animais foram apoiados pela cauda no momento da obtenção da imagem com a câmera termográfica. A Figura 3.25 mostra as temperaturas obtidas e a escala utilizada. As temperaturas mais quentes são apresentadas por coloração vermelha, enquanto que as temperaturas mais frias são apresentadas por coloração azul.

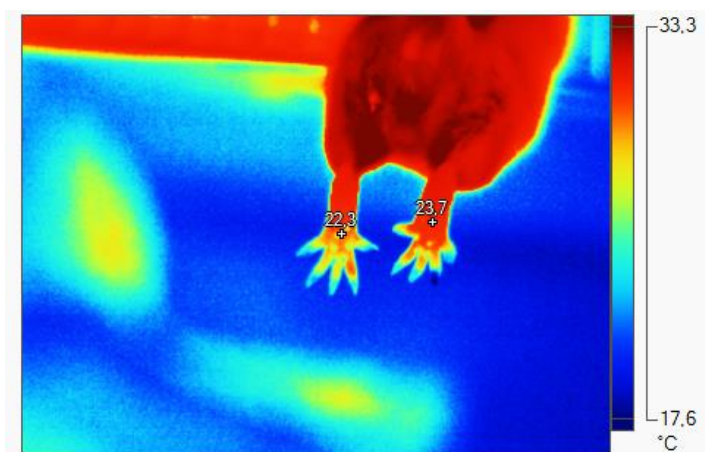


Figura 3.25. Temperaturas obtidas pela câmera termográfica para o animal do grupo 5_OCH₃ - Carragenina. A temperatura varia de 17,6°C (coloração azul) até 33,3°C (coloração vermelha). Pode ser observado que a pata esquerda, a qual recebeu o agente inflamatório, possui maior temperatura e coloração mais avermelhada que a pata direita, que não recebeu o agente. A imagem foi analisada com o programa SmartView® 3.5 (Fluke, EUA).

As imagens e tabelas para cada grupo apresentando as temperaturas para cada pata de cada animal por grupo estão apresentadas no **Apêndice 3.6**.

A. GRUPOS COM CARRAGENINA

A Figura 3.26 apresenta a média das temperaturas da pata esquerda para cada grupo. Foi possível observar que o composto 5_OCH₃ apresentou temperaturas mais baixas em relação aos outros grupos de inibidores para todos os tempos observados.

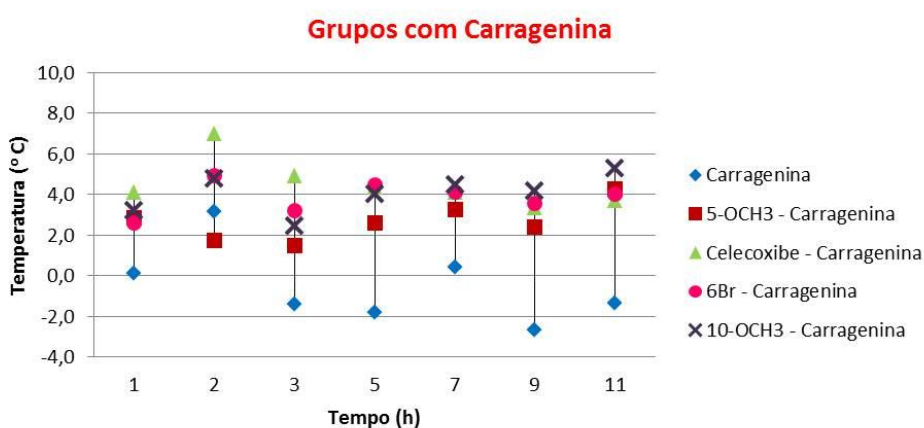


Figura 3.26. Média da variação das temperaturas da pata esquerda para cada grupo com Carragenina. O eixo das ordenadas apresenta o tempo em horas e o eixo das abcissas apresenta a temperatura em °C.

Analisando os resultados apresentados na Figura 3.26, foi possível observar que o composto 5-OCH₃ atuou de forma semelhante ao celecoxibe quanto à diminuição da

temperatura, uma vez que a média das temperaturas observadas para os grupos tratados com esses compostos foi próxima. A partir de 3 horas da aplicação dos inibidores testados, a temperatura da pata começou a diminuir, sendo possível sugerir que esses compostos estão atuando contra inflamação no local.

B. GRUPOS COM ZYMOSAN

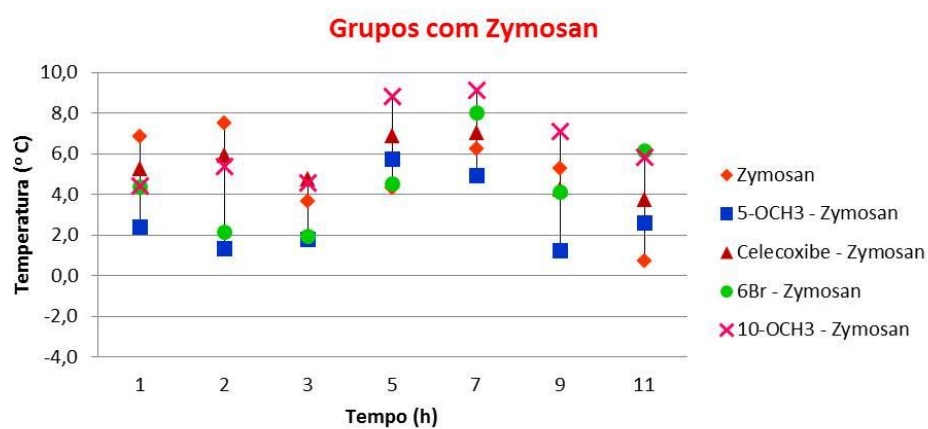


Figura 3.27. Média da variação das temperaturas da pata esquerda para cada grupo com zymosan. O eixo das ordenadas apresenta o tempo em horas e o eixo das abcissas apresenta a temperatura em °C.

Como apresentado na Figura 3.27, os compostos testados parecem não ser eficazes para o modelo animal quando o agente irritante foi o zymosan. A média das temperaturas parece não diminuir ao longo dos períodos observados em relação aos grupos em que o agente aplicado foi a carragenina. Esses resultados também foram observados para o Experimento I. Dessa forma, pode-se sugerir que esses compostos não são eficientes no tratamento contra inflamação crônica, uma vez que o zymosan está envolvido com a indução desse tipo de inflamação (ZARPELON, 2011; WEI et al., 2001).

C. COMPARAÇÃO ENTRE OS GRUPOS

Os resultados apresentados na Tabela 3.17 mostram os valores da média das temperaturas para cada grupo nos períodos observados.

Para a variação da temperatura foi possível observar, da mesma forma que para a variação da espessura da pata, que os grupos celecoxibe-carragenina, 5OCH₃-carragenina,

6Br-carragenina e 10-OCH₃-carragenina apresentaram melhor atividade quanto à diminuição da temperatura em relação aos grupos nos quais foram aplicados o zymosan. E, entre os grupos com carragenina, o 5-OCH₃ (em destaque na Tabela 3.17) apresentou temperaturas mais baixas em todos os tempos analisados, observando a diminuição da temperatura após 1 hora da aplicação do inibidor, comparando aos outros grupos, inclusive o grupo não tratado.

Tabela 3.17. Média das temperaturas para os grupos com carragenina

Grupo	Antes	1h	2h	3h	5h	7h	9h	11h
Carragenina	26,7	26,8	29,8	25,3	26,8	27,1	26,0	27,3
5-OCH ₃ CAR	22,2	25,1	25,9	25,2	26,2	26,7	25,8	26,4
CEL CAR	22,7	26,8	29,7	27,7	27,1	26,8	26,1	26,4
6BR CAR	22,4	25,3	27,3	25,6	26,8	26,5	25,9	26,4
10-OCH ₃ CAR	22,4	25,6	27,2	24,8	26,4	26,8	26,6	27,7

Como também observado no Experimento I, os resultados apresentados para o grupo tratado com o composto 5-OCH₃ foram melhores em relação aos outros grupos, tanto para diminuição da espessura quanto para diminuição da temperatura da pata. Também foi possível observar que esse composto tem ação semelhante ao celecoxibe,

fármaco já comercializado. Sendo assim, levando em conta os resultados do experimento I e II, o composto 5-SO₂-OCH₃ parece ser promissor para o tratamento contra a inflamação e doenças relacionadas.

3.6.1.2.3. COMPARAÇÃO ENTRE TEMPERATURA E ESPESSURA

Comparando a temperatura e a espessura média das patas dos camundongos, foi possível observar que houve o aumento dessas duas medidas no intervalo de tempo antes da aplicação e depois de uma hora da aplicação para os grupos que receberam o agente inflamatório e algum tipo de tratamento, sendo o agente inflamatório CARRAGENINA ou ZYMOSAN. Para os demais tempos não foi observado qualquer outra coincidência entre os valores analisados. E isso significa que não é possível estabelecer uma relação entre temperatura e espessura da pata, ou seja, não é possível dizer que ao diminuir a temperatura, conseqüentemente também diminuiu a espessura da pata.

CAPÍTULO 4

Visão Geral & Conclusões

VISÃO GLOBAL E CONCLUSÕES

O primeiro passo para realizar os estudos de atividade anti-inflamatória *in silico*, utilizando simulação por docking molecular, foi selecionar as enzimas ciclooxigenase (COX) disponíveis no banco de dados de estruturas tridimensionais de proteínas, o PDB. Como as proteínas encontradas não tem origem humana: COX-1 é de origem ovina e COX-2 é de camundongo, foi feito o alinhamento para verificar a similaridade das mesmas com as sequências das correspondentes humanas. Para os resíduos do sítio ativo foi encontrando 100% de similaridade entre as enzimas humana e ovina, no caso de COX-1 e enzimas humana e de camundongo de COX-2. Mais ainda, foi feita a sobreposição estrutural, que também mostrou alta similaridade nos dois casos. Assim, foram utilizadas, para estes estudos, as enzimas ovina e de camundongo para COX-1 e COX-2, respectivamente. A etapa seguinte foi modelar os compostos e para isso foi utilizada uma estrutura cristalográfica como ponto de partida. Como os compostos, 2-(fenilseleno)-2-(etil-X)acetofenonas-4'Y-substituídas, com X = SO₂, SO, S e Y = H, Br, CH₃, OCH₃, NO₂, possuem um centro quiral foram, em cada caso, modelados os dois enantiômeros o que resultou em 30 ligantes. Foram considerados também os diastereoisômeros referentes ao grupo X = SO, onde os resultados não mostraram um comportamento melhor que os compostos com grupo X = SO₂. Os compostos assim obtidos foram testados nas enzimas COX-1 e COX-2. A análise dos resultados do padrão de orientações, da avaliação das interações e dos escores permitiu, no caso da COX-2, selecionar os compostos com maior potencial inibidor que foram os com Y = OCH₃ para todos os X, sendo o mais destacado aquele com X = SO₂. O estudo similar de docking em COX-1 não foi capaz de discriminar um composto com melhor potencial inibidor.

Os estudos de atividade biológica *in vitro*, com as enzimas COX-1 e COX-2, foram realizados com a mistura racêmica de 12 compostos, já que três deles não se dissolveram nos reagentes do kit de testes da COX. Os resultados destes experimentos mostraram que alguns compostos apresentam atividade em COX-1 (9_SO_NO₂ e 10_SO_OCH₃), outros em COX-2 (5_SO₂_OCH₃, 10_SO_OCH₃ e 15_S _OCH₃), é interessante notar que o composto 10_SO_OCH₃ apresentou atividade inibitória em ambas as enzimas.

Para correlacionar os dados de simulação com os de atividade *in vitro*, foi necessário estudar detalhadamente a ocupação pelos ligantes dos subsítios S1, S2, S3 e S4 das enzimas. No caso da enzima COX-2, os melhores resultados foram obtidos quando o substituinte Y ocupa o subsítio S1 e faz interações com a His90 desse subsítio. Mais ainda, como os compostos se apresentam como misturas racêmicas é de se esperar que para se ter uma boa atividade a ocupação do subsítio S1 seja similar para os dois enantiômeros. O composto mais promissor foi aquele com Y = OCH₃. No caso do grupo X observou-se que a posição mais favorável é aquela em que este se encontrava próximo aos subsítios S3 e S4, fazendo interações com a Tyr355. Neste caso, o composto mais promissor foi aquele com X = SO₂. A mesma análise foi feita com COX-1 nos subsítios equivalentes, mas os resultados não permitiram prever a potencialidade dos compostos como inibidores.

A análise das interações do tipo π realizadas pelos compostos com as enzimas (apresentadas detalhadamente no Apêndice 2) não permitiu encontrar uma relação com os dados de inibição. Pareceria que estas interações são importantes para fixar os ligantes dentro do sítio de ligação.

Estes resultados permitem postular que os melhores compostos para inibir COX-2 são o 5_SO₂_OCH₃ e 10_SO_OCH₃. Mas, o fato que 10_SO_OCH₃ também pode inibir COX-1, não o torna um bom candidato a fármaco, uma vez que não produzirá atividade inibitória seletiva. Os resultados *in vitro* mostraram que o composto 5_SO₂_OCH₃ apresenta uma taxa de inibição de cerca de 50% para COX-2 e 10% para COX-1.

Com base nos resultados obtidos, foram iniciados os testes de atividade *in vivo* em ratos. A atividade foi avaliada em modelo de edema de pata induzido por carragenina e zymosan, como agentes irritantes, e foram medidas a espessura e a temperatura da pata para avaliar o potencial anti-inflamatório do composto. A aplicação do composto 5_SO₂_OCH₃ levou a uma diminuição significativa da espessura das patas após duas horas e diminuição da temperatura após uma hora da aplicação do agente inflamatório. Também foi possível sugerir com esse experimento que o composto 5-OCH₃ atua melhor contra a inflamação aguda, uma vez que apresentou melhores resultados para o modelo do edema de pata com a carragenina do que com o zymosan.

No caso das medidas de temperatura, deve ser destacada a utilização de uma prática inovadora para avaliar este tipo de teste de edema de pata: o uso de uma câmera termográfica. Assim, conseguiu-se medir a temperatura local das patas, sem agredir ou incomodar os animais. Isto permitiu obter medidas mais exatas, bem como detectar mudanças de temperaturas na pata onde foi aplicado o agente inflamatório e ainda comparar com a pata em que não recebeu esse agente.

Dessa forma, vale destacar que o presente trabalho alcançou os objetivos, e obteve resultados satisfatórios, permitindo sugerir o composto 5_OCH₃ como promissor para atuar contra os processos inflamatórios. Além disso, um método foi utilizado pela primeira vez para medir a temperatura dos edemas de patas, permitindo resultados mais exatos, de forma menos incomoda aos animais.

PERSPECTIVAS

1. Há necessidade de aprofundar os conhecimentos sobre a ação desses compostos *in vivo* e, para isso, estão em andamento as análises imuno-histoquímica, histopatológica, a fim de avaliar estrutura das células do fígado, do rim e das patas, bem como a presença de exsudato inflamatório, e ensaio imunoenzimático para detecção de citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias. Os resultados dessas análises estarão presentes no artigo a ser submetido.

2. A maioria dos trabalhos sobre anti-inflamatórios descreve bem a atividade dos compostos em COX-2, relacionando-a com o sítio ativo da enzima, mas há as mais variadas teorias quanto à atividade em COX-1, e na maioria das vezes não explicam a relação estrutura-atividade. De forma a tentar preencher esta lacuna estudos baseados em simulação por dinâmica molecular estão sendo desenvolvidos no BioMat.

3. Também estão sendo desenvolvidos, no BioMat, estudos para a obtenção de um sistema de liberação controlada de anti-inflamatórios para a região do cólon utilizando-se como matriz polimérica a quitosana, utilizando o melhor composto encontrado neste trabalho.

Referências

- ABRAHAO, A. C. Participação da prostaglandina E2 e seus receptores na proliferação celular do carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço. Tese. 87 p. São Paulo: Universidade de São Paulo; Faculdade de Odontologia; 2009.
- Accelrys Discovery Studio Visualizer™ - Accelrys Software Inc. Discovery Studio Visualizer 3.0
- ARMELIN, P.R.G. Modelagem molecular de derivados pirimidínicos e estudos de docking nas enzimas ciclooxigenase 1 e ciclooxigenase 2. São Carlos, SP: UFSCar, 2010. 124 p. Mestrado (Biotecnologia), orientador: Prof.Dr. Julio Zukerman Schpector, orientador: Profa.Dra. Ignez Caracelli.
- BAZAN, N. G. COX-2 as a multifunctional neuronal modulator. *Nat. Med.*, 7, 414-415, 2001.
- BLOBAUM, A.L.; MARNETT, L.J. Molecular Determinants for the Selective Inhibition of Cyclooxygenase-2 by Lumiracoxib. *J Biol Chem*, 282, 22, 16379-16390, 2007.
- BOTTING, R.; AYOUB, S.S. COX-3 and the mechanism of action of paracetamol/acetaminophen. *Prostag Leukotr Ess*, 72, 85-87, 2005.
- BOUAZIZ-TERRACHET, S.; TOUMI-MAOUCHE, A.; MAOUCHE, B.; TAÏRI-KELLOU, S. Modeling the binding modes of stilbene analogs to cyclooxygenase-2: a molecular docking study. *J Mol Model*, 16, 1919-1929, 2010.
- CARACELLI, I.; ZUKERMAN-SCHPECTOR, J.; EDWARD R.T. TIEKINK. Supramolecular aggregation patterns based on the bio-inspired Se(lone pair)··· π (aryl) synthon. *Coord Chem Rev*, 256, 412-438, 2012.
- CARACELLI, IGNEZ ; VEGA-TEIJIDO, MAURICIO ; ZUKERMAN-SCHPECTOR, JULIO ; CEZARI, MARIA H.S. ; LOPES, JOSÉ G.S. ; JULIANO, LUIZ ; SANTOS, PAULO S. ; COMASSETO, JOÃO V. ; CUNHA, RODRIGO L.O.R. ; TIEKINK, EDWARD R.T. . A tellurium-based cathepsin B inhibitor: Molecular structure, modelling, molecular docking and biological evaluation. *J. Mol Struct*, 1013, 11-18, 2012.
- CASTILHO, L.N.P. Docking molecular aplicado ao estudo da formação de complexos entre análogos de resveratrol e derivados de 1,2,3-triazol e a enzima COX-2. São Carlos: UFSCar, 2011. 143 p. Mestrado (Biotecnologia), orientador: Prof.Dr. Julio Zukerman Schpector, orientador: Profa.Dra. Ignez Caracelli.
- CATIZONE, C. Unraveling the Cox-2 Debacle. Disponível em <www.nextgenmd.org/archives/196,2011>. Acesso em Mai. 2012.
- Cayman Chemical Company, Ann Arbor, MI, USA.
- CERQUEIRA Jr., C. R. Análise Conformacional e estudo das interações eletrônicas de algumas (α -fenilseleno- α -etil)-, (α -fenilseleno- α -etilsulfinil) e (α -fenilseleno- α -etilsulfonil)-acetofenonas-*para*-substituídas. 2012. 206 p. Tese (Doutorado) – Programa de Pós Graduação em Química. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.
- ChemAxon (2009). MarvinSketch. URL: www.chemaxon.com.

- CLARK, M., R. D. CRAMER, AND N. VANOPDENBOSCH. "Validation of the General-Purpose Tripos 5.2 Force-Field." *J. Comput. Chem.* 10, 8, 982-1012, 1989.
- ClustalW2: *Multiple Sequence Alignment* <http://www.clustal.org/>
- CORBEIL, C. R., E. THERRIEN, AND N. MOITESSIER. "Modeling Reality for Optimal Docking of Small Molecules to Biological Targets." *Curr. Comput. Aided Drug. Des.*, 5, 4, 241-63, 2009.
- COSTA, K. A. Alodínia mecânica e edema de pata induzidos por um ativador da roteína quinase c, pdd: caracterização e comparação com as respostas induzidas pela carragenina. 2004. Dissertação de mestrado em Ciências Farmacêuticas - Universidade Federal de Minas Gerais.
- CSD - Cambridge Structural Database – <http://www.ccdc.cam.ac.uk/products/csd/>
- CUNHA, A. S. Papel da prostaglandina E2 e seus receptores na proliferação e apoptose em glioma humano, e da expressão das enzimas COX-1 e COX-2, mPGES-1, mPGES-2, cPGES. [dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Tecidual)]. 70 p. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, 2012.
- DAMAS, J.; LIÉGEOIS, J. The inflammatory reaction induced by formalin in the rat paw. *Naunyn Schmiedeberg's Arch. Pharmacol*, 359, 3, 220-227, 1999.
- DS Visualizer 3.0. Discovery Studio Visualizer 3.0, *Accelrys Inc., San Diego*, 2011. Disponível em: <<http://accelrys.com>>.
- GOLD, Version 5.0.1; Cambridge Crystallographic Data Centre: Cambridge, U.K.; http://www.ccdc.cam.ac.uk/products/life_sciences/gold/.
- FITZGERALD G.A.; PATRONO C. N. The coxibs, selective inhibitors of cyclooxygenase-2. *Engl. J. Med.v.* 345, 6, 433-442, 2001.
- FRANÇA, D.S.; SOUZA, A.L.S.; ALMEIDA, K.R.; DOLABELLA, S.S.; MARTINELLI, C.; COELHO, M.M. B vitamins induce an antinociceptive effect in the acetic acid and formaldehyde models of nociception in mice. *Eur. J. Pharmacol.*, 421, 3, 157-164, 2001.
- HILARIO, M.O.E.; TERRERI, M.T.; LEN, C.A. Antiinflamatórios não-hormonais: inibidores da ciclooxigenase 2. *J Pediatr*, 82, 206-212, 2006.
- JAIN, N. K.; ISHIKAWA, T.; SPIGELMAN, I.; HERSCHMAN, H. R. COX-2 expression and function in the hyperalgesic response to paw inflammation in mice. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids*, 79, 6, 183-190, 2008
- JONES, G.; WILLETT, P.; GLEN, R. C. Molecular recognition of receptor sites using a genetic algorithm with a description of desolvation. *J. Mol. Biol.*, 245, 43-53, 1995.
- JONES, G. WILLETT, P.; GLEN, R. C.; LEACH, A. R.; TAYLOR, R. Development and validation of a genetic algorithm for flexible docking. *J. Mol. Biol.*, 267, 727-748, 1997.
- KIEFER, J.R.; PAWLITZ, J.L.; MORELAND, K.T.; STEGEMAN, R.A.; HOOD, W.F.; GIERSE, J.K.; STEVENS,

- A.M.; GOODWIN, D.C.; ROWLINSON, S.W.; MARNETT, L.J.; STALLINGS, W.C.; KURUMBAIL, R.G. Structural insights into the stereochemistry of the cyclooxygenase reaction. *Nature*, 405, 97-101, 2000.
- KIRCHMAIR, J., S. DISTINTO, D. SCHUSTER, G. SPITZER, T. LANGER, AND G. WOLBER. "Enhancing Drug Discovery through in Silico Screening: Strategies to Increase True Positives Retrieval Rates." *Curr. Med. Chem.* 15, 20, 2040-2053, 2008.
- KLEBE, G. "Virtual Ligand Screening: Strategies, Perspectives and Limitations." *Drug Discovery Today* 11, 13-14, 580-94, 2006.
- KUMMER, C.L.; COELHO, T.C.R.B.: Antiinflamatórios Não Esteróides Inibidores da Ciclooxigenase-2 (COX-2): Aspectos Atuais. *Rev. Bras. Anesthesiol.*, 52, 4, .498-512, 2002.
- KURUMBAIL R.G.; STEVENS A.M.; GIERSE J.K.; STEGEMAN, R.A.M.; PAK, J.Y.; GILDEHAUS, D.; MIYASHIRO, J.M.; PENNING, T.D., PETER C. K.S.; STALLINGS, I.; STALLINGS, W.C. Structural basis for selective inhibition of cyclooxygenase-2 by anti-inflammatory agents. *Nature*, 384, 644, 1996.
- LE BARS, D.; GOZARIU, M.; CADDEN, S.W. Animal models of nociception. *Pharmacol. Rev.*, 53, 4, 597-652, 2001.
- LEVY, L. Carrageenan paw edema in the mouse. *Life Sci.*, 8, 11, 601-606, 1969.
- MARDINI, I.A.; FITZGERALD, G.A. Selective Inhibitors of Cyclooxygenase-2: A Growing Class of Anti-Inflammatory Drugs. *Mol. Interventions.*, 1, 1, 30-38, 2001.
- MELGAÇO, S. S. C.; SARAIVA, M. I. R.; LIMA, T. T. C.; JÚNIOR, G. B. DA SILVA; DAHER, E. DE FRANCESCO. Nefrotoxicidade dos xicidade dos anti-inf anti-inf anti-inflamatórios não ester tórios não esteroidais. *Med.*, 43, 4, 382-390, 2010.
- MOUSTAKAS, D. T., P. T. LANG, S. PEGG, E. PETERSEN, I. D. KUNTZ, N. BROOIJMANS, AND R. C. RIZZO. "Development and Validation of a Modular, Extensible Docking Program: Dock 5." *J. Comput. Aided Mol.* 20, 10-11, 601-619, 2006.
- NCBI – National Center for Biotechnology Information: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/>
- NOGUEIRA, C.W.; QUINHONES, E.B.; JUNG, E.A.C.G.; ZENI, G.; ROCHA, J.B.T. Anti-inflammatory and antinociceptive activity of diphenyl diselenide. *Inflamm. Res.*, 52, 2, 56–63, 2003.
- PDB - Protein Data Bank: <http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>
- PDBSum: <http://www.ebi.ac.uk/thornton-srv/databases/pdbsum/>
- PEROLA, E., W. P. WALTERS, P. S. CHARIFSON. A Detailed Comparison of Current Docking and Scoring Methods on Systems of Pharmaceutical Relevance. *Proteins-Structure Function and Bioinformatics* 56, 235-249, 2004.
- PILLEMER L, BLUM L, PENSKY J, LEPOW IH. The requirement for magnesium ions in the inactivation of the third component of human complement (C'3) by insoluble residues of yeast cells

- (zymosan). *J Immunol.* 71, 5, 331–338, 1953.
- R CORE TEAM (2014). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <http://www.R-project.org/>.
- RESTER, U. "DOCK AROUND THE CLOCK - Current Status of Small Molecule Docking and Scoring." *QSAR Comb. Sci.*, 25, 7, 605-15, 2006.
- RIMON, G; SIDHU, R. S.; LAUVER, A.; LEE, J. Y.; SHARMA, N. P.; YUAN, C.; FRIELER, R.A.; TRIEVEL, R.C.; LUCCHESI, B.R.; SMITH, W. L. Coxibs interfere with the action of aspirin by binding tightly to one monomer of cyclooxygenase-1. *PNAS*, 107, 1, 28-33, 2010.
- RODRIGUES, C.R.; VELOSO, M.P.; VERLI, H.; FRAGA, C.A.M.; MIRANDA, A.L.P.; BARREIRO, E.J. Selective pghs-2 inhibitors: a rational approach for treatment of the inflammation. *Curr Med Chem*, 8, 1867-1885, 2002.
- SACCO, A. C. S. Mapeamento vetorial de interações eletrostáticas para biomoléculas. 2013. Dissertação de Mestrado em Biotecnologia - Universidade Federal de São Carlos. Prof.Dr. Julio Zukerman Schpector, orientador: Profa.Dra. Iñez Caracelli.
- SANTOS, J.L.; BLAU, L.; MENEGON, R.F.; OLIVEIRA, H.P.; BUELONI, R.H.; BOFFO, E.; MACHADO, R.G.P.; LONGO, M.C.; CHUNG, M.C. *Rev. Cienc. Farm. Básica Apl.*, 28, 2,235-240, 2007.
- SCHOLZ, M.; ULBRICH, H. K.; DANNHARDT, G.; Investigations Concerning the COX/5-LOX Inhibiting and Hydroxyl Radical Scavenging Potencies of Novel 4,5-Diaryl Isoselenazoles. *Eur. J. Med. Chem.*, 43, 6, 1152-1159, 2008.
- SHELLACK, N. *SA Pharm. J.* 79, 4, 2012. Disponível em <<http://www.sapj.co.za/index.php/SAPJ/article/view/1261>>
- SILVA, P.J., FERNANDES, P.A.; RAMOS, M.J. A theoretical study of radical-only and combined radical/carbocationic mechanisms of arachidonic acid cyclooxygenation by prostaglandin H synthase. *Theor Chem Acc*, 110, 345-351, 2003.
- SMITH, W.L.; GARAVITO, R.M.; DEWITT, D.L. Prostaglandin Endoperoxide H Synthases (Cyclooxygenases)-1and -2. *J. Biol. Chem.*, 271, 52, 33157-33160, 1996.
- STEFANI, H. A., BOTTESELLE, G. V., ZUKERMAN-SCHPECTOR, J., CARACELLI, I, CORRÊA, D.S., FARSKY, S. H.P., MACHADO, I. D., SANTIN, J. R., HEBEDA, C.B. Synthesis, anti-inflammatory activity and molecular docking studies of 2,5-diarylfuran amino acid derivatives. *Eur. J. Med. Chem.* , 47, 52 - 58, 2012a.
- STEFANI, H. A.; GUEOGJAN, K.; MANARIN, F.; FARSKY, S.H.P.; ZUKERMAN-SCHPECTOR, J.; CARACELLI, I. ; PIZANO RODRIGUES, S. R.; MUSCARÁ, M. N. ; TEIXEIRA, S. A. ; SANTIN, J. R.; MACHADO, I. D.; BOLONHEIS, S. M.; CURI, R.; VINOLO, M. A. Synthesis, biological evaluation and molecular docking studies of 3-(triazolyl)-coumarin derivatives: Effect on inducible nitric oxide synthase. *Europ. J. Med. Chem.*, 58, 117-127, 2012b.
- SÜLEYMAN, H.; DEMIRCAN, B.; KARAGÖZ, Y. Anti-inflammatory and side effects of cyclooxygenase inhibitors. *Pharmacol. Reports.*, 59, 247-258, 2007.

SWISS-MODEL - <http://swissmodel.expasy.org>

TJØLSEN, A.; BERGE, O.G.; HUNSKAAR, S.; ROSLAND, J.H.; HOLE, K. The formalin test: an evaluation of the method. *Pain*, 51, 1, 5-17, 1992.

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

VERDONK, M. L.; COLE, J. C.; HARTSHORN, M. J.; MURRAY, C. W.; TAYLOR, R. D. Improved protein-ligand docking using GOLD. *Proteins*, 52, 609-623, 2003.

VIZIOLI, E. O. Ensaios pré-clínicos de híbridos ftalimídicos e pró-fármacos taurínicos derivados de anti-inflamatórios não esteróides. 2009. Dissertação de mestrado em Ciências Farmacêuticas – Universidade Estadual de São Paulo.

WANG, J. L.; LIMBURG, D.; GRANETO M. J.; SPRINGER, J.; HAMPER, J. R.; LIAO, S. PAWLITZ, J. L. KURUMBAIL, R.G.; MAZIASZ, T.; TALLEY, J. J.; KIEFER, J. R.; CARTER, J. The novel benzopyran class of selective cyclooxygenase-2 inhibitors. Part 2: the second clinical candidate having a shorter and favorable human half-life. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 20, 7159-7163, 2010.

WEN-CHI, W.; YI-HSUAN, S.; SWEY-SHEN, C.; JYH-HORNG, S.; NING-SUN, Y. GM-CSF plays a key role in zymosan-stimulated human dendritic cells for activation of Th1 and Th17 cells. *Cytokine*, 55, 1, 78-89, 2011.

WHEELER-ACETO, H.; PORRECA, F.; COWAN, A. The rat paw formalin test: comparison of noxious agents. *Pain*, 40, 2, 229-238, 1999.

WINTER, C.A.; RISLEY, E.A.; NUSS, G.W. Carrageenin-induced edema in hind paw of the rat as an assay for antiinflammatory drugs. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 111, 544-547, 1962.

YOO, E.J.; AHLQUIST, M.; KIM, S.H.; BAE, I.; FOKIN, V.V.; SHARPLESS, K.B.; CHANG, S. Copper-Catalyzed Synthesis of N-Sulfonyl-1,2,3-triazoles: Controlling Selectivity. *Angew. Chem*, 46, 1730 – 1733, 2007.

ZARPELON, A. C. Avaliação do efeito terapêutico e mecanismo de ação da budleína A em modelos de artrite em camundongos. 2011. Dissertação de mestrado em Patologia Experimental – Universidade Estadual de Londrina.

ZUKERMAN-SCHPECTOR, J.; DE SIMONE, C.A.; OLIVATO, P.R.; CERQUEIRA JUNIOR, C.R.; TIEKINK, E.R.T. 1-(4-Bromophenyl)-2-ethylsulfinyl-2-(phenylselanyl)ethanone monohydrate. *Acta Cryst*, 67, 1099–1100, 2011.

Anexo

APÊNDICE 2.1

Nesta seção está apresentado o documento de aprovação do Comitê de Ética da UFSCar protocolo Nº 057/13.

2.1.1 COMITÊ DE ÉTICA DA UFSCAR PROTOCOLO Nº 057/13

2.1.1 COMITÊ DE ÉTICA DA UFSCAR PROTOCOLO Nº 057/13



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA
Comissão de Ética no Uso de Animais
Via Washington Luís, km. 235 - Caixa Postal 676
Fones: (016) 3351.8025 / 3351.9679
Fax: (016) 3351.8025
CEP 13560-970 - São Carlos - SP - Brasil
ceua@ufscar.br - www.propq.ufscar.br

Parecer da Comissão de Ética no Uso de Animais nº 057/13

Protocolo nº. 057/13

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de São Carlos - CEUA/UFSCar **APROVOU** o projeto de pesquisa intitulado "*Docking Molecular Aplicado ao Estudo da Formação de Complexos entre Compostos Calcogênicos e Ciclooxigenases*", submetido pelo pesquisador Natalia Baptistini.

São Carlos, 25 de Novembro de 2013.

Prof. Dra. Azair Liane Matos do Canto de Souza

Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais

Apêndices

APÊNDICE 3.1

Nesta seção são apresentados os resultados do alinhamento e homologia da estrutura tridimensional do receptor.

3.1.1 OCUPAÇÃO DOS SUBSÍTIOS DA ENZIMA COX-2

3.1.2 OCUPAÇÃO DOS SUBSÍTIOS DA ENZIMA COX-1

3.1.1. ALINHAMENTO DA ESTRUTURA DA ENZIMA COX-1

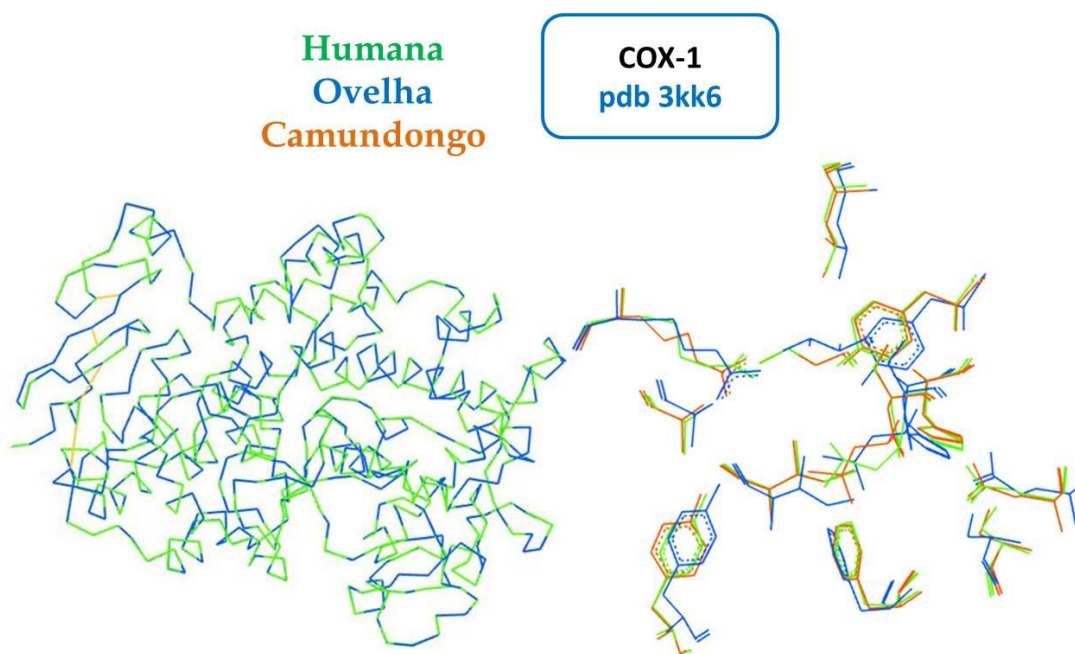


Figura 3.1. a. Sobreposição do C_{α} da estrutura da COX-1: 3kk6, depositada em banco de dados, em azul, e modelos humano e de camundongo, obtidos por homologia, em verde e laranja, respectivamente. **b.** Sobreposição dos resíduos de aminoácidos presentes no sítio ativo.

3.1.2. ALINHAMENTO DA ESTRUTURA DA ENZIMA COX-2

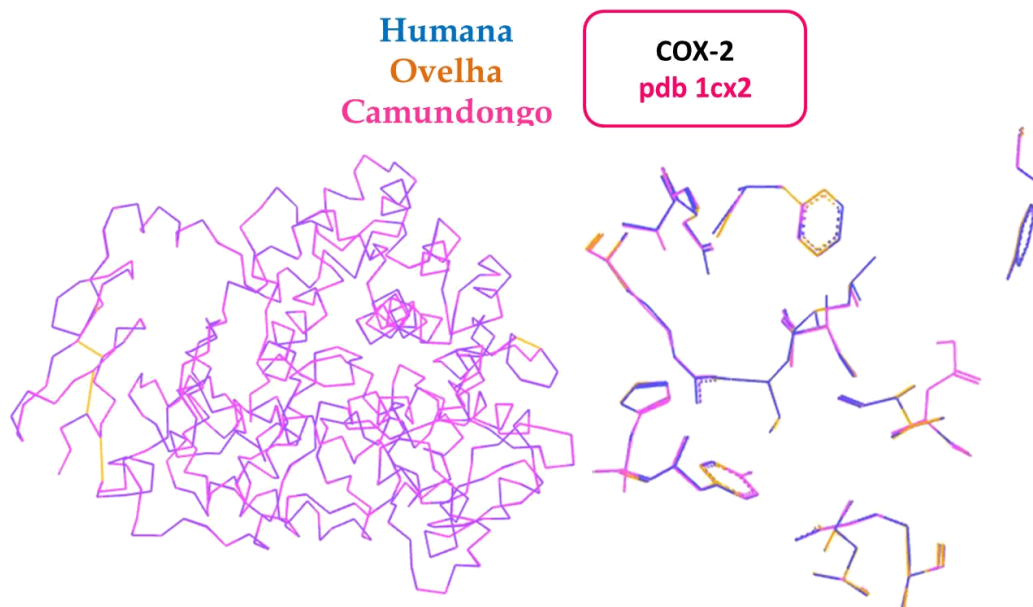


Figura 3.2. a. Sobreposição do C_{α} da estrutura da COX-2: 1cx2, depositada em banco de dados, em rosa, e modelos humano e de ovelha, obtidos por homologia, em azul e laranja, respectivamente. **b.** Sobreposição dos resíduos de aminoácidos presentes no sítio ativo.

APÊNDICE 3.2

Nesta seção são apresentadas figuras e tabelas contendo algumas interações entre ligantes e receptores estudados após a formação dos complexos, os quais foram obtidos por cálculos de docking.

3.2.1 ESTUDOS DE INTERAÇÕES DOS COMPLEXOS CRISTALOGRAFICOS

- 3.2.1.1 ESTUDOS DE DOCKING DO COMPLEXO CRISTALOGRAFICO COX-2 (1cx2)
- 3.2.1.2 ESTUDOS DE DOCKING DO COMPLEXO CRISTALOGRAFICO COX-1 (3kk6)

3.2.2 ESTUDOS DE DOCKING DOS COMPLEXOS DA FAMÍLIA PRO E A ENZIMA COX-2

- 3.2.2.1 COMPOSTO 1s_SO₂_Br DA FAMÍLIA PRO
- 3.2.2.2 COMPOSTO 2s_SO₂_CH₃ DA FAMÍLIA PRO
- 3.2.2.3 COMPOSTO 3r_SO₂_H DA FAMÍLIA PRO
- 3.2.2.4 COMPOSTO 4r_SO₂_NO₂ DA FAMÍLIA PRO
- 3.2.2.5 COMPOSTO 5r_SO₂_OCH₃ DA FAMÍLIA PRO
- 3.2.2.6 COMPOSTO 5s_SO₂_OCH₃ DA FAMÍLIA PRO
- 3.2.2.7 COMPOSTO 6r_SO_Br DA FAMÍLIA PRO
- 3.2.2.8 COMPOSTO 7r_SO_CH₃ DA FAMÍLIA PRO
- 3.2.2.9 COMPOSTO 8r_SO_H DA FAMÍLIA PRO
- 3.2.2.10 COMPOSTO 9r_SO_NO₂ DA FAMÍLIA PRO
- 3.2.2.11 COMPOSTO 9s_SO_NO₂ DA FAMÍLIA PRO
- 3.2.2.12 COMPOSTO 10r_SO_OCH₃ DA FAMÍLIA PRO
- 3.2.2.13 COMPOSTO 10s_SO_OCH₃ DA FAMÍLIA PRO
- 3.2.2.14 COMPOSTO 12r_S_CH₃ DA FAMÍLIA PRO
- 3.2.2.15 COMPOSTO 12s_S_CH₃ DA FAMÍLIA PRO
- 3.2.2.16 COMPOSTO 13s_S_H DA FAMÍLIA PRO
- 3.2.2.17 COMPOSTO 14r_S_NO₂ DA FAMÍLIA PRO
- 3.2.2.18 COMPOSTO 14s_S_NO₂ DA FAMÍLIA PRO
- 3.2.2.19 COMPOSTO 15r_S_OCH₃ DA FAMÍLIA PRO
- 3.2.2.20 COMPOSTO 15s_S_OCH₃ DA FAMÍLIA PRO

3.2.3 ESTUDOS DE DOCKING DOS COMPLEXOS DA FAMÍLIA PRO E A ENZIMA COX-1

- 3.2.3.1 COMPOSTO 1s_SO₂_Br DA FAMÍLIA PRO
- 3.2.3.2 COMPOSTO 2s_SO₂_CH₃ DA FAMÍLIA PRO
- 3.2.3.3 COMPOSTO 3s_SO₂_H DA FAMÍLIA PRO
- 3.2.3.4 COMPOSTO 4s_SO₂_NO₂ DA FAMÍLIA PRO
- 3.2.3.5 COMPOSTO 6r_SO_Br DA FAMÍLIA PRO
- 3.2.3.6 COMPOSTO 7r_SO_CH₃ DA FAMÍLIA PRO
- 3.2.3.7 COMPOSTO 7s_SO_CH₃ DA FAMÍLIA PRO
- 3.2.3.8 COMPOSTO 8r_SO_NO₂ DA FAMÍLIA PRO
- 3.2.3.9 COMPOSTO 8s_SO_NO₂ DA FAMÍLIA PRO
- 3.2.3.10 COMPOSTO 9r_SO_OCH₃ DA FAMÍLIA PRO
- 3.2.3.11 COMPOSTO 11s_S_Br DA FAMÍLIA PRO
- 3.2.3.12 COMPOSTO 12r_S_CH₃ DA FAMÍLIA PRO
- 3.2.3.13 COMPOSTO 12s_S_CH₃ DA FAMÍLIA PRO
- 3.2.3.14 COMPOSTO 13s_S_H DA FAMÍLIA PRO
- 3.2.3.15 COMPOSTO 14r_S_NO₂ DA FAMÍLIA PRO
- 3.2.3.16 COMPOSTO 14s_S_NO₂ DA FAMÍLIA PRO

3.2.1 ESTUDOS DE INTERAÇÕES DOS COMPLEXOS CRISTALOGRAFICOS

3. 2. 1. 1 ESTUDOS DE DOCKING DO COMPLEXO CRISTALOGRAFICO COX-2 (1cx2)

Tabela 3.2.1 - Interações do ligante cristalográfico com a enzima COX-2 (1cx2)

Interação ligante - enzima COX-2	átomo ligante	átomo enzima	distância (Å)
O1 - ALA516:HB1	O1	HB1	2,44
O1 - PHE518:O	O1	O	3,06
O1 - PHE518:HD1	O1	HD1	2,60
O1 - VAL523:HG21	O1	HG21	2,30
O2 - GLN192:OE1	O2	OE1	3,39
BR1 - TYR385:HE2	BR1	HE2	2,58
BR1 - TRP387:H22	BR1	H22	2,83
BR1 - TRP387:HH2	BR1	HH2	3,40
BR1 - GLY526:HA2	BR1	HA2	3,10
F1 - VAL349:HG11	F1	HG11	2,54
F1 - VAL349:HG13	F1	HG13	3,08
F1 - LEU359:HD11	F1	HD11	2,88
F1 - LEU359:HD12	F1	HD12	2,84
F2 - ARG120:HD1	F2	HD1	2,43
F2 - ARG120:HD2	F2	HD2	3,44
F2 - LEU531:HD11	F2	HD11	2,45
F3 - TYR355:HH	F3	HH	2,58
F3 - TYR355:HE2	F3	HE2	2,11
S1 - HIS90:HE2	S1	HE2	2,97
S1 - ALA516:HB1	S1	HB1	2,97
S1 - VAL523:HG21	S1	HG21	2,60
HN32 - HIS90:NE2	HN32	NE2	2,21
H4 - TYR355:OH	H4	OH	2,23
H5 - HIS90:NE2	H5	NE2	2,64
H11 - VAL523:O	H11	O	2,50
Ligações de hidrogênio	átomo doador	átomo acceptor	distância (Å)
HIS90:HE2 - N3	HE2	N3	2,27
ARG120:HH11 - F2	HH11	F2	2,32
ARG120:HH11 - F3	HH11	F3	2,44
ARG513:HH11 - N3	HH11	N3	2,19
Interações π	distância (Å)		
CH... π : VAL349:HG12 – Ct2	3,19		
CH... π : VAL523: HG12 – Ct2	2,84		

Ct = centroide

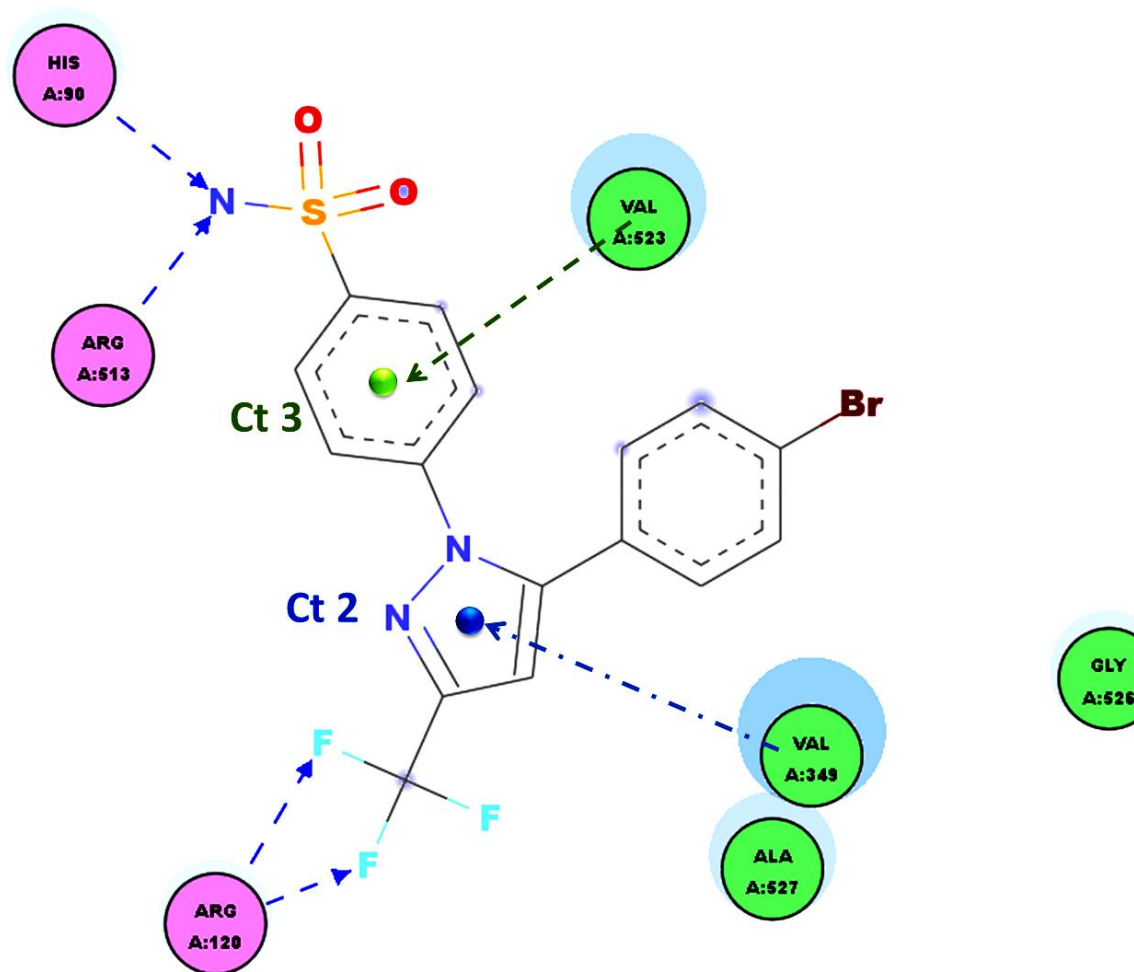


Figura 3.2.1 Esquema bidimensional mostrando algumas das interações entre o ligante cristalográfico da estrutura de código pdb 1cx2 e alguns dos aminoácidos da enzima COX-2. Na figura são mostrados os centroides (Ct) e indicadas as interações do tipo $\text{CH}\cdots\pi$ com os aminoácidos Val523 e Val349 e ligações de hidrogênio com grupo sulfonamida com Arg 513 e do trifluorcarboneto com a Arg120. Figura construída com DS Visualizer 3.0.

3.2 1.2 ESTUDOS DE DOCKING DO COMPLEXO CRISTALOGRAFICO COX-1 (3kk6)

Tabela 3.2.2 - Interações do ligante cristalográfico com a enzima COX-1 (3kk6)

Interação enzima COX-1 - ligante	átomo enzima	átomo ligante	distância (Å)
HIS90:HE1 - CEL701:O1	HE1	O1	2,42
VAL116:HG11 - CEL701:F2	HG11	F2	2,28
VAL116:HG13 - CEL701:F2	HG13	F2	2,84
GLN192:OE1 - CEL701:N3	OE1	N3	2,33
VAL349:HG11 - CEL701:F3	HG11	F3	2,73
LEU352:O - CEL701:S1	O	S1	3,17
LEU352:O - CEL701:N3	O	N3	2,23
LEU352:O - CEL701:H14C	O	H14C	2,03
LEU352:O - CEL701:HN32	O	HN32	2,87
SER353:O - CEL701:O1	O	O1	3,16
TYR355:OH - CEL701:H17C	OH	H17C	2,71
LEU359:HD21 - CEL701:F1	HD21	F1	2,32
SER516:HB3 - CEL701:O2	HB3	O2	2,72
SER516:HB3 - CEL701:O1	HB3	O1	3,37
SER516:HG - CEL701:O1	HG	O1	3,55
ILE517:HG23 - CEL701:N3	HG23	N3	2,09
MET522:O - CEL701:HC7	O	HC7	2,38
ILE523:HG12 - CEL701:O2	HG12	O2	2,84
ILE523:HD12 - CEL701:O2	HD12	O2	2,11
Ligações de hidrogênio	átomo doador	átomo acceptor	distância (Å)
CEL701:HN31 - GLN192:OE1	HN31	OE1	2.39
CEL701:HN31 - LEU352:O	HN31	O	1.27
CEL701:HN32 - GLN192:OE1	HN32	OE1	1.57
Interações π	distância (Å)		
CH... π : ALA527:HA – Ct1	3.20		
CH... π : VAL349:HG13 – Ct2	3.07		
CH... π : SER353:HA – Ct3	2.27		

Ct = centroide

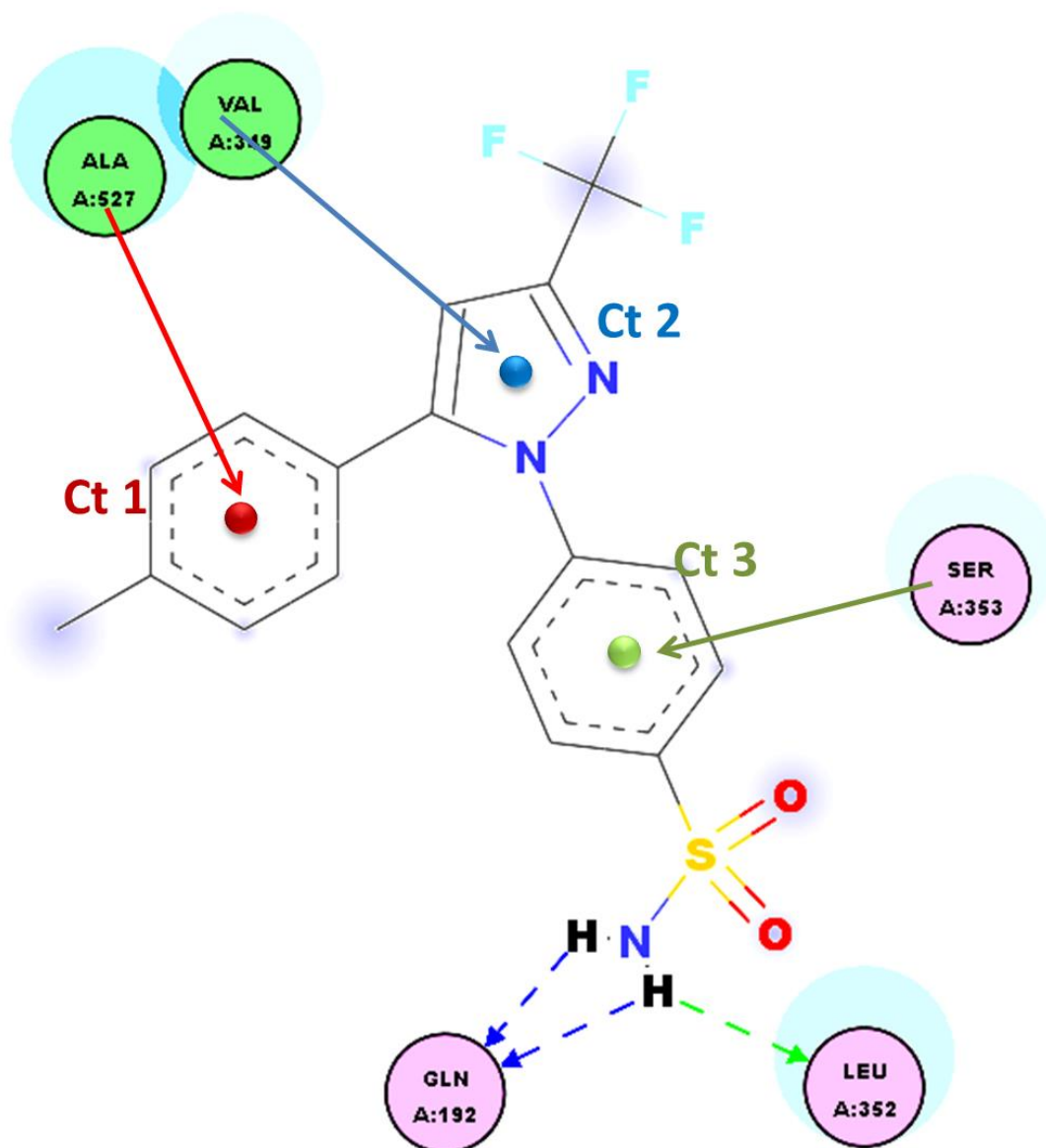


Figura 3.2.2 Esquema bidimensional mostrando algumas das interações entre o ligante cristalográfico da estrutura de código pdb 3kk6 e alguns dos aminoácidos da enzima COX-1. Na figura são mostrados os centros (Ct) e indicadas as interações do tipo $\text{CH}\cdots\pi$ com os aminoácidos Ser353, Ala527 e Val349 e ligações de hidrogênio com grupo sulfonamida com Gln192 e a Leu352. Figura construída com DS Visualizer 3.0.

3.2.2 ESTUDOS DE DOCKING DOS COMPLEXOS DA FAMÍLIA PRO E A ENZIMA COX-2

3.2.2.1 COMPOSTO 1s_SO₂_Br DA FAMÍLIA PRO

Tabela 3.2.3 - Algumas interações do composto 1s_SO₂_Br com a COX-2 (1cx2)

Interação enzima COX-2 - ligante	átomo enzima	átomo ligante	distância (Å)
CH... π : SER353:HA - Ct12	HA	Ct12	2,52 Å
GLN192:HE21 - Br24	HE21	Br24	2,35 Å
ARG120:HH11 - O20	HH11	O20	2,18 Å
TYR355:HH - O20	HH	O20	1,67 Å

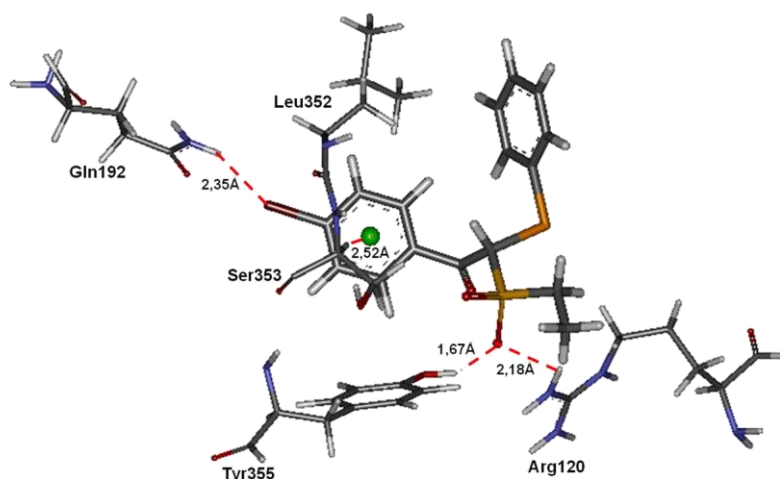


Figura 3.2.3. Algumas interações do composto 1s_SO₂_Br com resíduos de aminoácidos do sítio da COX-2. Na figura é mostrado o centroide (Ct) e indicada a interação do tipo CH... π com o aminoácido Ser353. Figura construída com DS Visualizer 3.0.

3.2.4.2 COMPOSTO 2s_SO₂_CH₃ DA FAMÍLIA PRO

Tabela 3.2.4 - Algumas interações do composto 2s_SO₂_CH₃ com a COX-2

Interação enzima COX-2 - ligante	átomo enzima	átomo ligante	distância (Å)
CH... π : SER353:HA - Ct19	HA	Ct19	2,57
ARG120:HH11 - O20	HH11	O20	2,36
TYR355:HH - O20	HH	O20	1,91

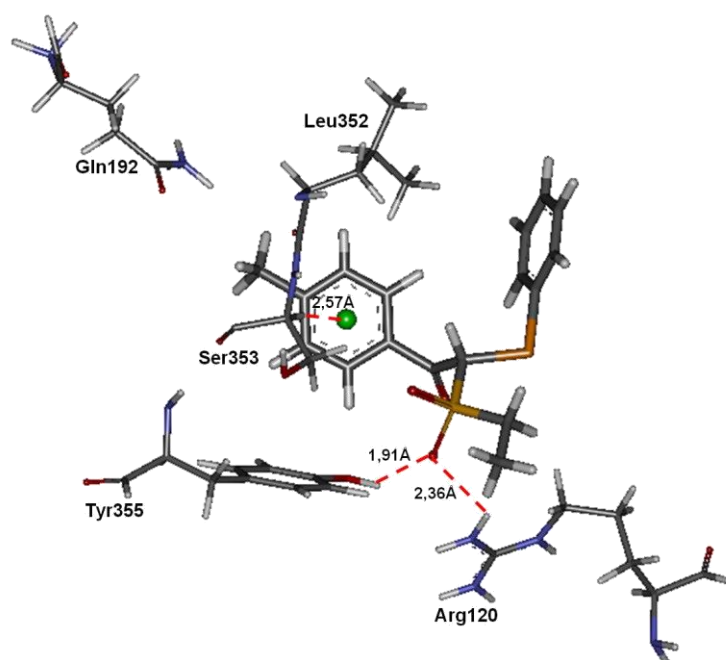


Figura 3.2.4. Algumas interações do composto 2s_SO₂_CH₃ com resíduos de aminoácidos do sítio da COX-2. Na figura é mostrado o centroide (Ct) e indicada a interação do tipo CH... π com o aminoácido Ser353. Figura construída com DS Visualizer 3.0.

3.2.2.3 COMPOSTO 3R_SO₂_H DA FAMÍLIA PRO

Tabela 3.2.5 - Algumas interações do composto 3r_SO₂_H com a COX-2 (1cx2)

Interação enzima COX-2 - ligante	átomo enzima	átomo ligante	distância (Å)
CH... π : SER353:HA - Ct23	HA	Ct23	2,47
TYR355:HH - O20	HH	O20	1,67

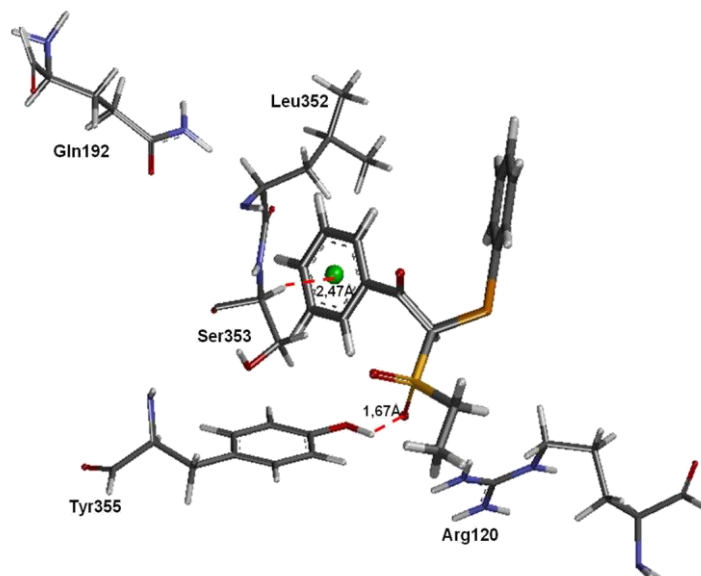


Figura 3.2.5. Algumas interações do composto 3r_SO₂_H com resíduos de aminoácidos do sítio da COX-2. Na figura é mostrado o centroide (Ct) e indicada a interação do tipo CH... π com o aminoácido Ser353. Figura construída com DS Visualizer 3.0.

3.2.2.4 COMPOSTO 4R_SO₂_NO₂ DA FAMÍLIA PRO

Tabela 3.2.6 – Algumas interações do composto 4r_SO₂_NO₂ com a COX-2 (1cx2)

Interação enzima COX-2 - ligante	átomo enzima	átomo ligante	distância (Å)
CH... π : SER353:HA - Ct40	HA	Ct40	2,83
CH... π : TRP387:HH2 - Ct41	HH2	Ct41	3,88
ARG120:HH11 - O19	HH11	O19	2,29
TYR355:HH - O1	HH	O1	2,38
HIS90:HE2 - O3	HE2	O3	1,92

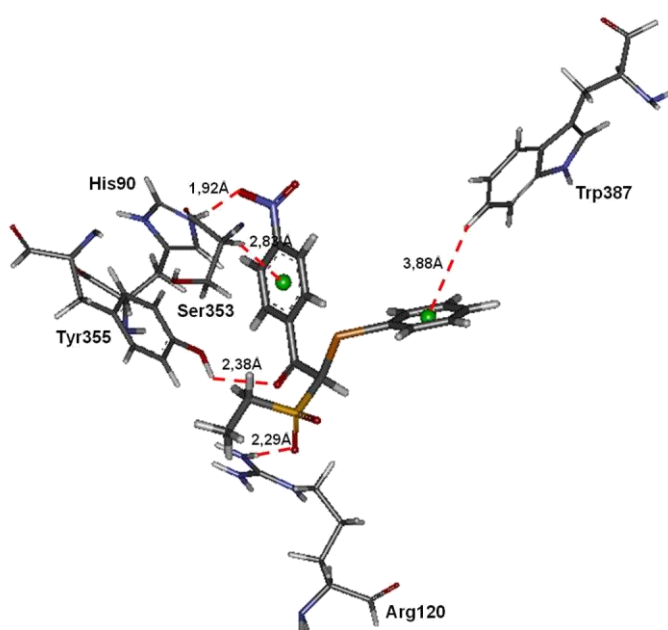


Figura 3.2.6. Algumas interações do composto 4r_SO₂_NO₂ com resíduos de aminoácidos do sítio da COX-2. Na figura são mostrados os centroides (Ct) e indicadas a interações do tipo CH... π com os aminoácidos Ser353 e Trp387. Figura construída com DS Visualizer 3.0.

3.2.2.5 COMPOSTO 5r_SO₂_OCH₃ DA FAMÍLIA PRO

Tabela 3.2.7 – Algumas interações do composto 5r_SO₂_OCH₃ com a COX-2 (1cx2)

Interação enzima COX-2 - ligante	átomo enzima	átomo ligante	distância (Å)
CH... π : SER353:HA - Ct47	HA	Ct47	2,21 Å
ARG120:HH11 - O20	HH11	O20	1,83 Å
TYR355:HH - O19	HH	O19	1,51 Å
HIS90:HE2 - O24	HE2	O24	1,68 Å

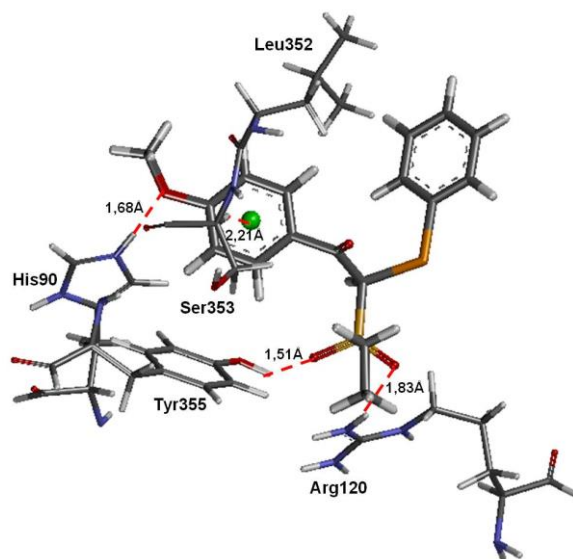


Figura 3.2.7. Algumas interações do composto 5r_SO₂_OCH₃ com a COX-2. Na figura é mostrado o centroide (Ct) e indicada a interação do tipo CH... π com o aminoácido Ser353.

3.2.2.6 COMPOSTO 5s_SO₂_OCH₃ DA FAMÍLIA PRO

Tabela 3.2.8 – Algumas interações do composto 5s_SO₂_OCH₃ com a Cox-2 (1cx2)

Interação enzima COX-2 - ligante	átomo enzima	átomo ligante	distância (Å)
CH... π : SER353:HA - Ct50	HA	Ct50	2,62
ARG120:HH11 - O20	HH11	O20	2,46
TYR355:HH - O20	HH	O20	1,96
HIS90:HE2 - O24	HE2	O24	2,37

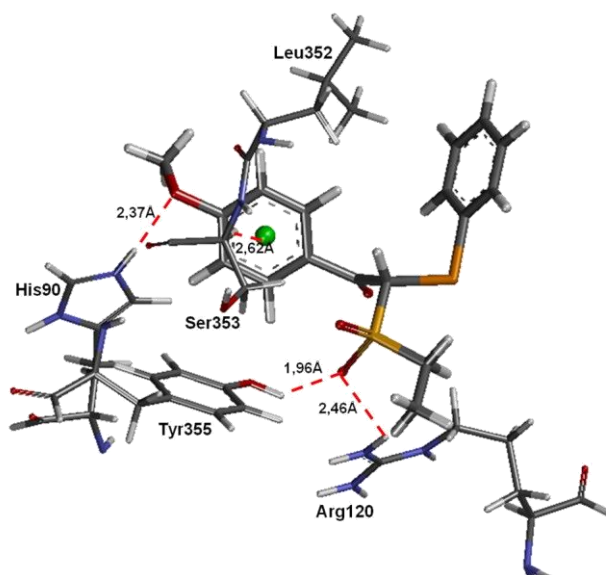


Figura 3.2.8. Algumas interações do composto 5s_SO₂_OCH₃ com resíduos de aminoácidos do sítio da COX-2. Na figura é mostrado o centroide (Ct) e indicada a interação do tipo CH... π com o aminoácido Ser353. Figura construída com DS Visualizer 3.0.

3. 2.2.7 COMPOSTO 6R_SO_BR DA FAMÍLIA PRO

Tabela 3.2.9 – Algumas interações do composto 6r_SO_Br com a COX-2 (1cx2)

Interação enzima COX-2 - ligante	átomo enzima	átomo ligante	distância (Å)
ARG120:HH11 - O19	HH11	O19	2,97 Å
CH... π : ARG513:HH12 - Ct59	HH12	Ct59	1,85 Å

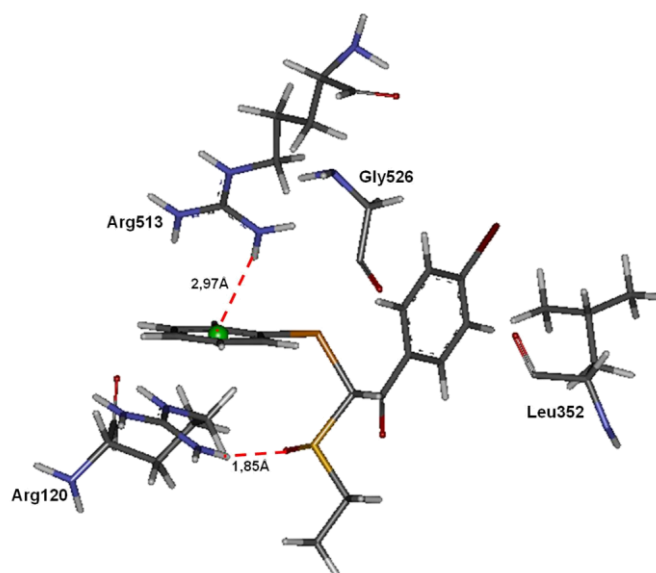


Figura 3.2.9. Algumas interações do composto 6r_SO_Br com resíduos de aminoácidos do sítio da COX-2. Na figura é mostrado o centroide (Ct) e indicada a interação do tipo CH... π com o aminoácido Arg513. Figura construída com DS Visualizer 3.0.

3.2.2.8 COMPOSTO 7R_SO_CH₃ DA FAMÍLIA PRO

Tabela 3.2.10 – Algumas interações do composto 7r_SO_CH₃ com a COX-2 (1cx2)

Interação enzima COX-2 - ligante	átomo enzima	átomo ligante	distância (Å)
ARG120:HH11 - O19	HH11	O19	2,00
CH \cdots π : ARG513:HH12 - Ct62	HH12	Ct62	2,70

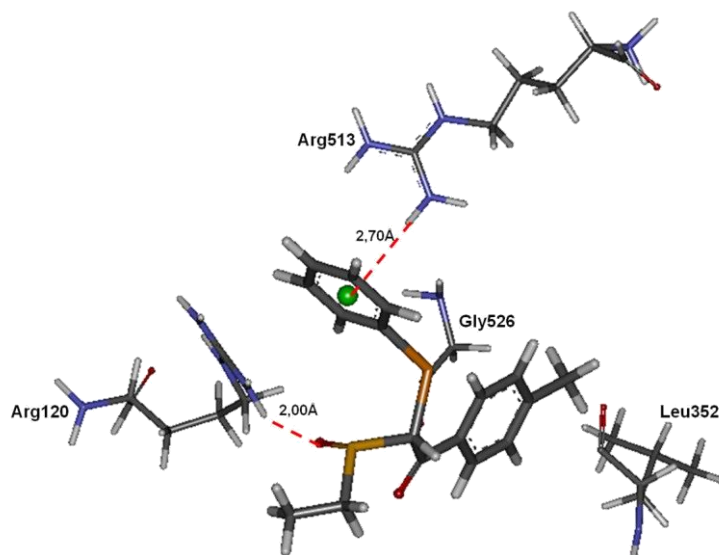


Figura 3.2.10. Algumas interações do composto 7r_SO_CH₃ com resíduos de aminoácidos do sítio da COX-2. Na figura é mostrado o centroide (Ct) e indicada a interação do tipo CH \cdots π com o aminoácido Arg513. Figura construída com DS Visualizer 3.0.

3.2.2.9 COMPOSTO 8R_SO_H₃ DA FAMÍLIA PRO

Tabela 3.2.11 - Algumas interações do composto 8r_SO_H com a COX-2 (1cx2)

Interação enzima COX-2 - ligante	átomo enzima	átomo ligante	distância (Å)
ARG120:HH11 - O19	HH11	O19	2,43
CH \cdots π : ARG513:HH11 - Ct69	HH12	Ct69	3,16

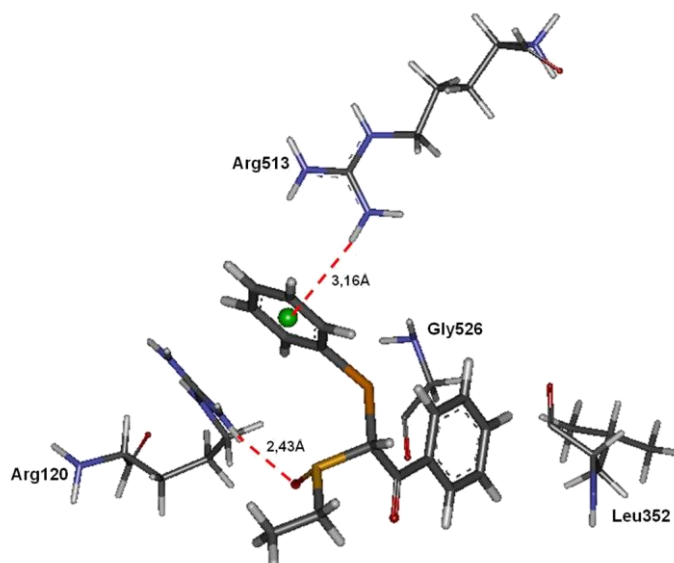


Figura 3.2.11. Algumas interações do composto 8r_SO_H com resíduos de aminoácidos do sítio da COX-2. Na figura é mostrado o centroide (Ct) e indicada a interação do tipo CH... π com o aminoácido Arg513. Figura construída com DS Visualizer 3.0.

3.2.2.10 COMPOSTO 9R_SO_NO₂ DA FAMÍLIA PRO

Tabela 3.2.12 - Algumas interações do composto 9r_SO_NO₂ com a COX-2 (1cx2)

Interação enzima COX-2 - ligante	átomo enzima	átomo ligante	distância (Å)
CH... π : SER353:H - Ct40	HA	Ct40	2,63
ARG513:HH12- O3	HH12	O3	1,99
TYR355:HH - O19	HH	O19	1,85

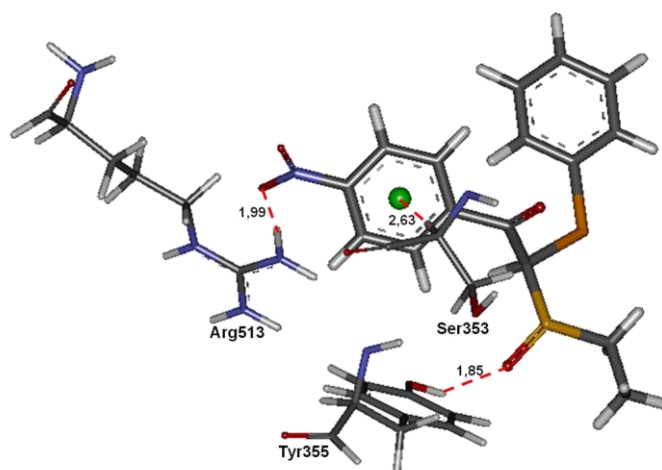


Figura 3.2.12. Algumas interações do composto 9r_SO_NO₂ com resíduos de aminoácidos do sítio da COX-2. Na figura é mostrado o centroide (Ct) e indicada a interação do tipo CH... π com o aminoácido Ser353. Figura construída com DS Visualizer 3.0.

3.2.2.11 COMPOSTO 9s_SO_NO₂ DA FAMÍLIA PRO

Tabela 3.2.13 - Algumas interações do composto 9s_SO_NO₂ com a COX-2 (1cx2)

Interação enzima COX-2 - ligante	átomo enzima	átomo ligante	distância (Å)
CH... π : SER353:HA - Ct41	HA	Ct41	2,89Å
ARG120:HH11 - O19	HH11	O19	2,27 Å
LEU352:O - O3	O	O3	2,51 Å
HIS90:HE2 - O4	HE2	O4	1,78 Å
GLN192:HE21 - O3	HE21	O3	2,46 Å

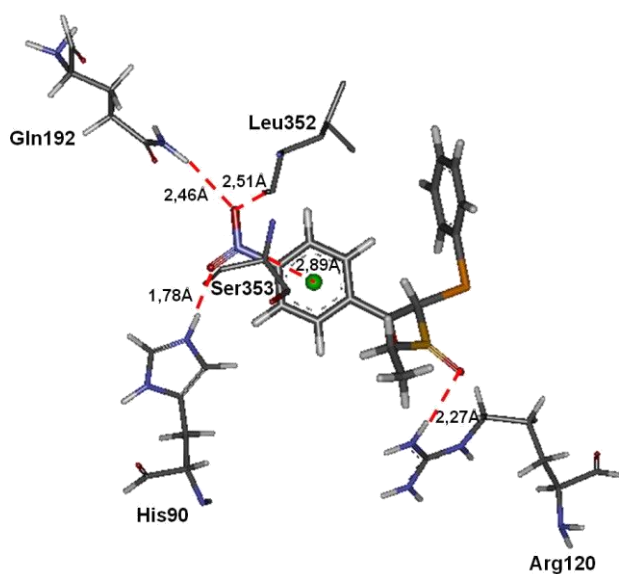


Figura 3.2.13. Algumas interações do composto 9s_SO_NO₂ com resíduos de aminoácidos do sítio da COX-2. Na figura é mostrado o centroide (Ct) e indicada a interação do tipo CH... π com o aminoácido Ser353. Figura construída com DS Visualizer 3.0.

3.2.2.12 COMPOSTO 10R_SO_OCH₃ DA FAMÍLIA PRO

Tabela 3.2.14 - Algumas interações do composto 10r_SO_OCH₃ com a COX-2 (1cx2)

Interação enzima COX-2 - ligante	átomo enzima	átomo ligante	distância (Å)
CH... π : SER353:HA - Ct122	HA	Ct122	2,89
ARG120:HH11 - O19	HH11	O19	2,27
HIS90:HE2 - O24	HE2	O24	2,51

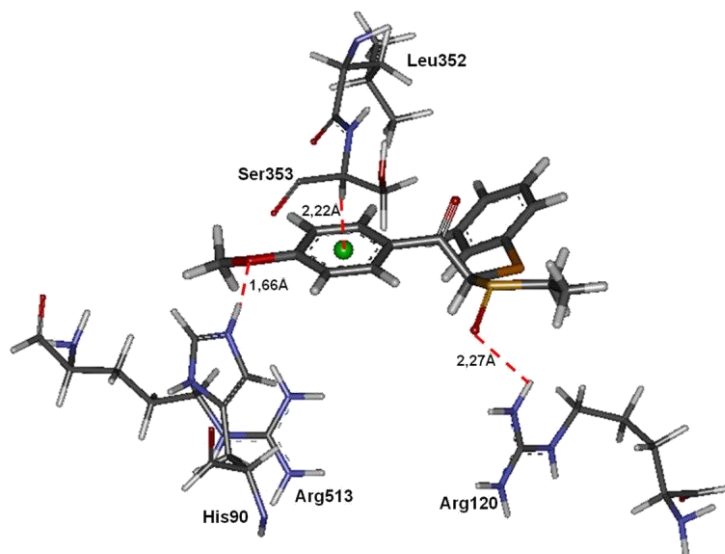


Figura 3.2.14. Algumas interações do composto 10r_SO_OCH₃ com resíduos de aminoácidos do sítio da COX-2. Na figura é mostrado o centroide (Ct) e indicada a interação do tipo CH... π com o aminoácido Ser353. Figura construída com DS Visualizer 3.0.

3.2.2.13 COMPOSTO 10s_SO_OCH₃ DA FAMÍLIA PRO

Tabela 3.2.15 - Algumas interações do composto 10s_SO_OCH₃ com a COX-2 (1cx2)

Interação enzima COX-2 - ligante	átomo enzima	átomo ligante	distância (Å)
CH... π : SER353:H - Ct42	HA	Ct42	2,83
ARG120:HH11 - O19	HH11	O19	2,22
HIS90:HE2 - O24	HE2	O24	2,37
TYR355:HH - O19	HH	O19	1,85

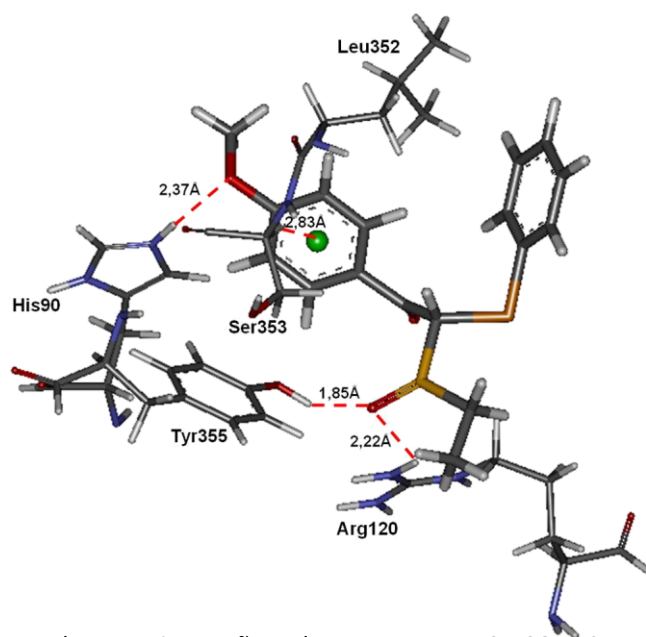


Figura 3.2.15. Algumas interações do composto 10s_SO_OCH₃ com resíduos de aminoácidos do sítio da COX-2. Na figura é mostrado o centroide (Ct) e indicada a interação do tipo CH... π com o aminoácido Ser353. Figura construída com DS Visualizer 3.0.

3.2.2.14 COMPOSTO 12R_S_CH₃ DA FAMÍLIA PRO

Tabela 3.2.16 - Algumas interações do composto 12r_S_CH₃ com a COX-2 (1cx2)

Interação enzima COX-2 - ligante	átomo enzima	átomo ligante	distância (Å)
CH... π : SER353:HA - Ct96	HA	Ct96	2,79
TYR355:HH - O1	HH	O1	2,15

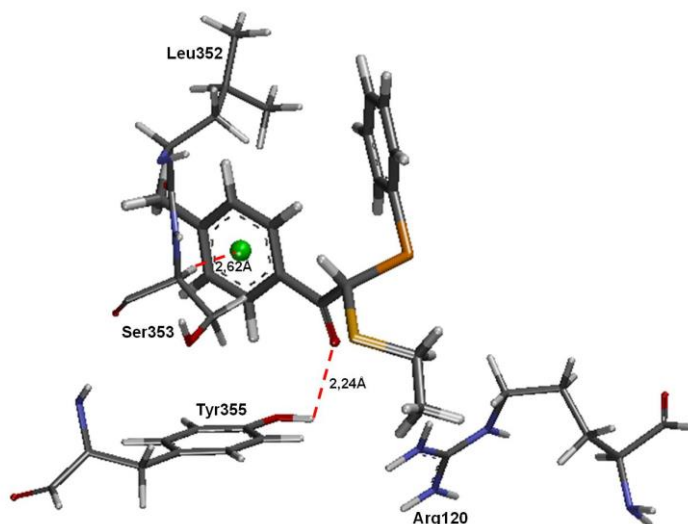


Figura 3.2.16. Algumas interações do composto 12r_S_CH₃ com resíduos de aminoácidos do sítio da COX-2. Na figura é mostrado o centroide (Ct) e indicada a interação do tipo CH... π com o aminoácido Ser353. Figura construída com DS Visualizer 3.0.

3.2.2.15 COMPOSTO 12s_S_CH₃ DA FAMÍLIA PRO

Tabela 3.2.17 - Algumas interações do composto 12s_S_CH₃ com a COX-2 (1cx2)

Interação enzima COX-2 - ligante	átomo enzima	átomo ligante	distância (Å)
CH... π : Ser353:HA - Ct100	HA	Ct100	2,62
Tyr355:HH - O1	HH	O1	2,24

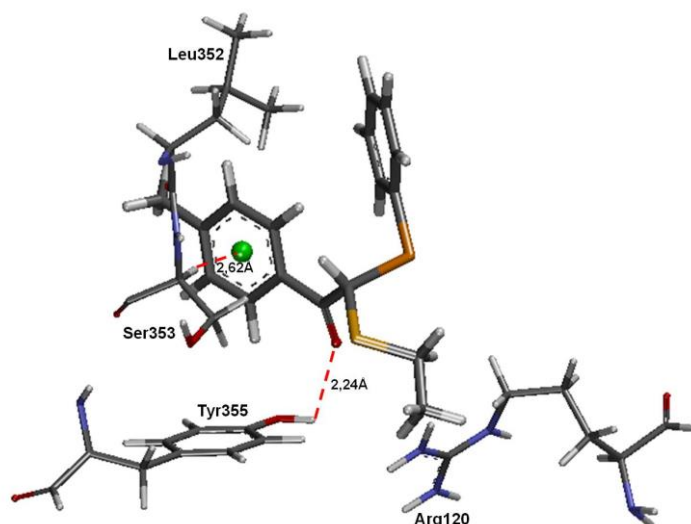


Figura 3.2.17. Algumas interações do composto 12S_S_CH₃ com resíduos de aminoácidos do sítio da COX-2. Na figura é mostrado o centroide (Ct) e indicada a interação do tipo CH... π com o aminoácido Ser353. Figura construída com DS Visualizer 3.0.

3.2.2.16 COMPOSTO 13s_S_H DA FAMÍLIA PRO

Tabela 3.2.18 - Algumas interações 13s_S_H com a COX-2 (1cx2)

Interação enzima COX-2 - ligante	átomo enzima	átomo ligante	distância (Å)
CH... π : SER353:HA - Ct104	HA	Ct104	2,54

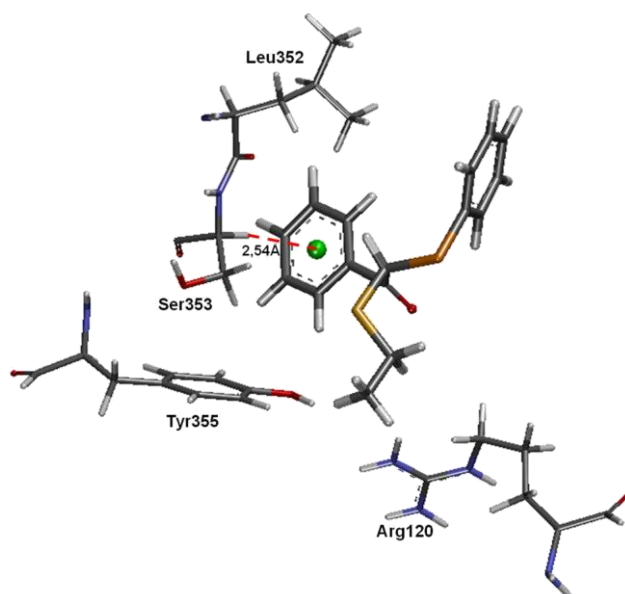


Figura 3.2.18. Algumas interações do composto 13s_S_H com resíduos de aminoácidos do sítio da COX-2. Na figura é mostrado o centroide (Ct) e indicada a interação do tipo CH... π com o aminoácido Ser353. Figura construída com DS Visualizer 3.0.

3.2.2.17 COMPOSTO 14r_S_NO₂ DA FAMÍLIA PRO

Tabela 3.2.19- Algumas interações do composto 14r_S_NO₂ com a COX-2 (1cx2)

Interação enzima COX-2 - ligante	átomo enzima	átomo ligante	distância (Å)
CH... π : SER353:HA - Ct117	HA	Ct117	2,32
TYR355:HH - O1	HH	O1	2,43
HIS90:HE2 - O24	HE2	O24	2,66

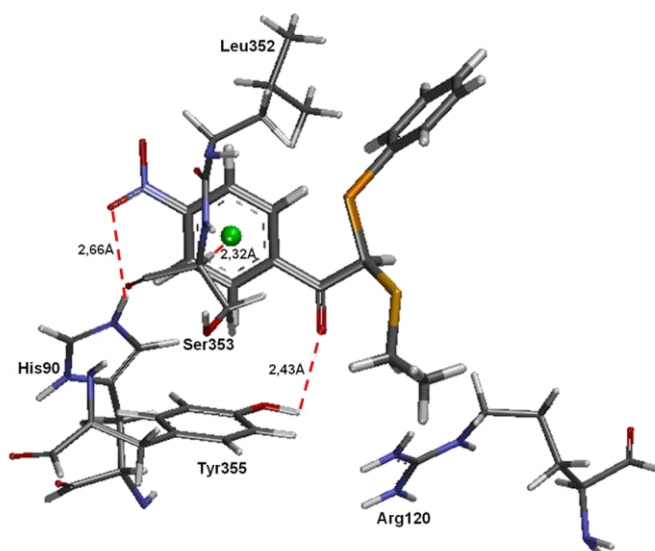


Figura 3.2.19. Algumas interações do composto 14r_S_NO₂ com resíduos de aminoácidos do sítio da COX-2. Na figura é mostrado o centroide (Ct) e indicada a interação do tipo CH... π com o aminoácido Ser353. Figura construída com DS Visualizer 3.0.

3.2.2.18 COMPOSTO 14s_S_NO₂ DA FAMÍLIA PRO

Tabela 3.2.20 - Algumas interações do composto 14s_S_NO₂ com a COX-2 (1cx2)

Interação enzima COX-2 - ligante	átomo enzima	átomo ligante	distância (Å)
CH... π : SER353:HA - Ct122	HA	Ct122	2,31 Å
GLN192:HE21 - O3	HE21	O3	1,82 Å
HIS90:HE2 - O4	HE2	O4	1,89 Å

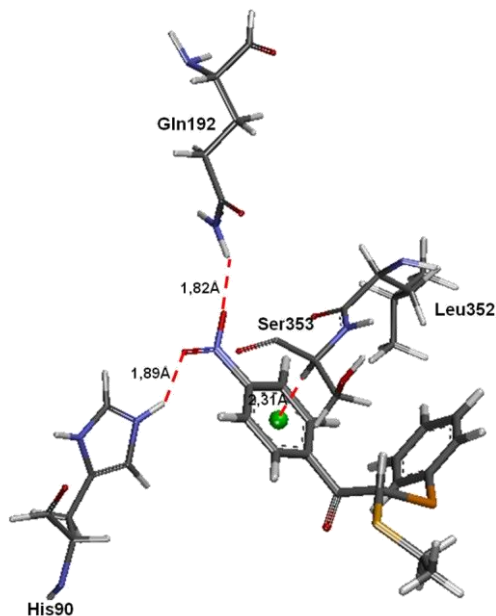


Figura 3.2.20. Algumas interações do composto 14s_S_NO₂ com resíduos de aminoácidos do sítio da COX-2. Na figura é mostrado o centroide (Ct) e indicada a interação do tipo CH... π com o aminoácido Ser353. Figura construída com DS Visualizer 3.0.

3.2.2.19 COMPOSTO 15R_S_OCH₃ DA FAMÍLIA PRO

Tabela 3.2.21 – Algumas interações do composto 15r_S_OCH₃ com a COX-2 (1cx2)

Interação enzima COX-2 - ligante	átomo enzima	átomo ligante	distância (Å)
CH... π : SER353:HA - Ct	HA	Ct125	2,31
HIS90:HE2 - O24	HE2	O24	1,95

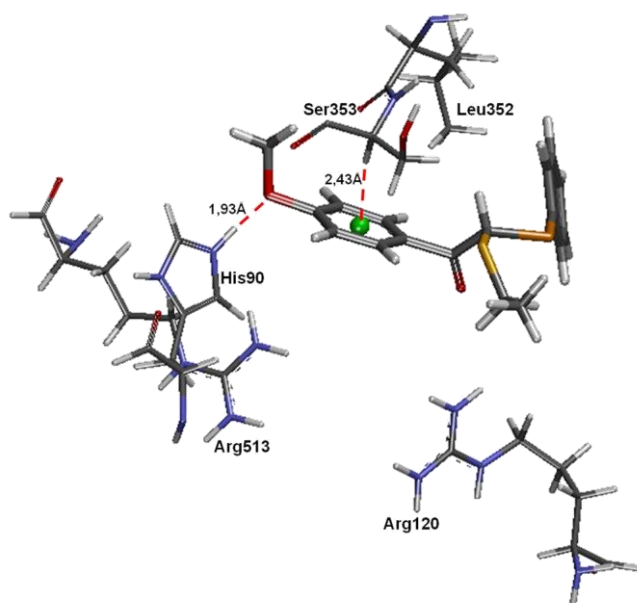


Figura 3.2.21. Algumas interações do composto 15r_S_OCH₃ com resíduos de aminoácidos do sítio da COX-2. Na figura é mostrado o centroide (Ct) e indicada a interação do tipo CH... π com o aminoácido Ser353. Figura construída com DS Visualizer 3.0.

3.2.2.20 COMPOSTO 15s_S_OCH₃ DA FAMÍLIA PRO

Tabela 3.2.22 - Algumas interações do composto 15s_S_OCH₃ com a COX-2 (1cx2)

Interação enzima COX-2 - ligante	átomo enzima	átomo ligante	distância (Å)
CH... π : SER353:HA - Ct126	HA	Ct126	2,43
HIS90:HE2 - O24	HE2	O24	1,93

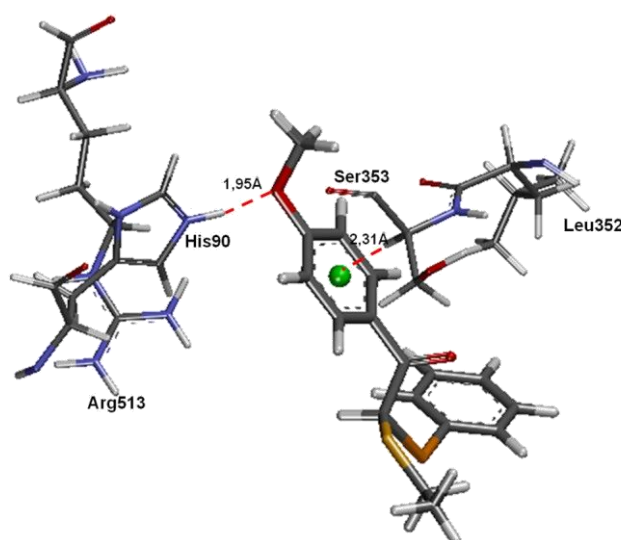


Figura 3.2.22. Algumas interações do composto 15s_S_OCH₃ com resíduos de aminoácidos do sítio da COX-2. Na figura é mostrado o centroide (Ct) e indicada a interação do tipo CH... π com o aminoácido Ser353. Figura construída com DS Visualizer 3.0.

3.2.3 ESTUDOS DE DOCKING DOS COMPLEXOS DA FAMÍLIA PRO E A ENZIMA COX-1

3.2.3.1 COMPOSTO 1s_SO₂_BR DA FAMÍLIA PRO

Tabela 3.2.23 - Algumas interações do composto 1s_SO₂_Br com a COX-1 (3kk6)

Interação enzima COX-1 - ligante	átomo enzima	átomo ligante	distância (Å)
CH... π : SER353:HA - Ct9	HA	Ct9	2,98
CH... π : ILE523:HG11 - Ct9	HG11	Ct9	2,90
GLY526:HA2 - Br24	HA2	Br24	2,66

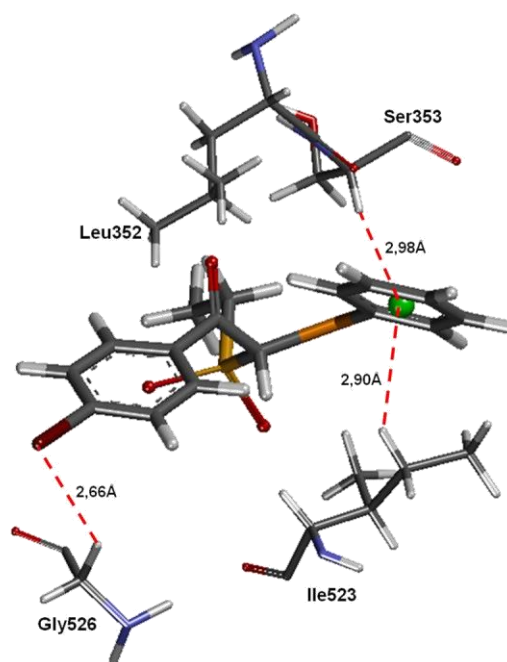


Figura 3.2.23. Algumas interações do composto 1s_SO₂_Br com resíduos de aminoácidos do sítio da COX-1. Na figura são mostrados os centroides (Ct) e indicadas as interações do tipo CH... π com os aminoácidos Ile523 e Ser353. Figura construída com DS Visualizer 3.0.

3.2.3.2 COMPOSTO 2s_SO₂_CH₃ DA FAMÍLIA PRO

Tabela 3.2.24 – Algumas interações do composto 2s_SO₂_CH₃ com a COX-1 (3kk6)

Interação enzima COX-1 - ligante	átomo enzima	átomo ligante	distância (Å)
CH... π : SER353:HA - Ct10	HA	Ct10	2,98
CH... π : ILE523:HG11 - Ct10	HG11	Ct10	2,90

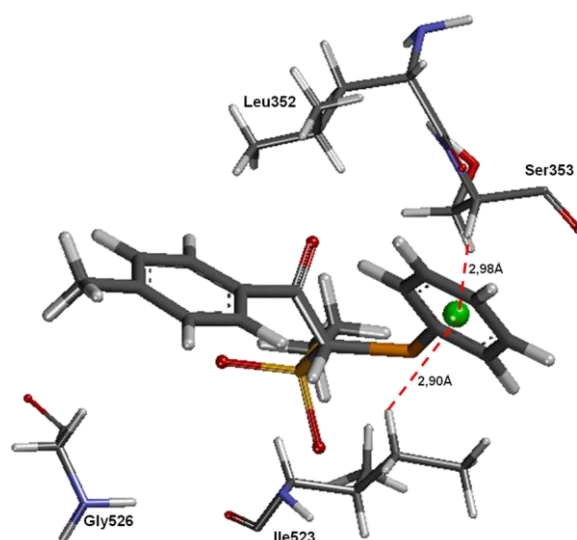


Figura 3.2.24. Algumas interações do composto 2s_SO₂_CH₃ com resíduos de aminoácidos do sítio da COX-1. Na figura são mostrados os centroides (Ct) e indicadas as interações do tipo CH... π com os aminoácidos Ile523 e Ser353. Figura construída com DS Visualizer 3.0.

3.2.3.3 COMPOSTO 3s_SO2_H DA FAMÍLIA PRO

Tabela 3.2.25- Algumas interações do composto 3s_SO2_H com a COX-1 (3kk6)

Interação enzima COX-1 - ligante	átomo enzima	átomo ligante	distância (Å)
CH... π : SER353:HA - Ct11	HA	Ct11	2,98
CH... π : ILE523:HG11 - Ct11	HG11	Ct11	2,90

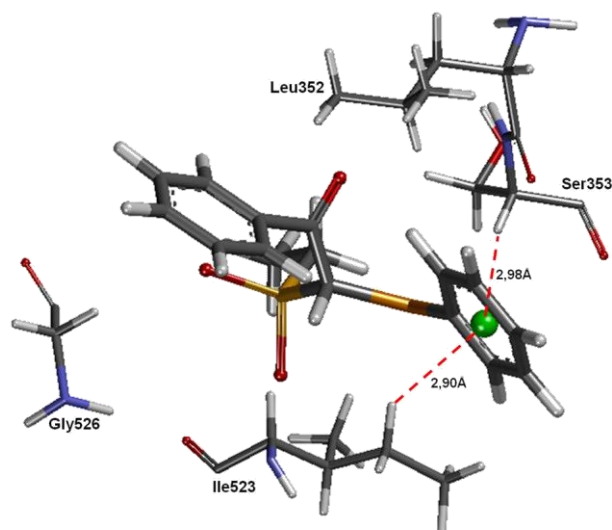


Figura 3.2.25. Algumas interações do composto 3s_SO2_H com resíduos de aminoácidos do sítio da COX-1. Na figura são mostrados os centroides (Ct) e indicadas as interações do tipo CH... π com os aminoácidos Ile523 e Ser353. Figura construída com DS Visualizer 3.0.

3.2.3.4 COMPOSTO 4s_SO2_NO2 DA FAMÍLIA PRO

Tabela 3.2.26 - Algumas interações do composto 4s_SO2_NO2 com a COX-1 (3kk6)

Interação enzima COX-1 - ligante	átomo enzima	átomo ligante	distância (Å)
CH... π : SER353:HA - Ct12	HA	Ct12	2,94
CH... π : ILE523:HG11 - Ct12	HG11	Ct12	2,94
CH... π : ALA527:HA - Ct20	HA	Ct20	3,66

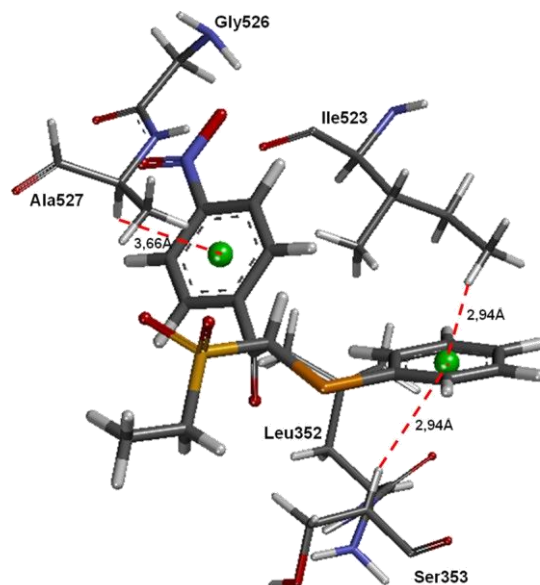


Figura 3.2.26. Algumas interações do composto 4s_SO2_NO₂ com resíduos de aminoácidos do sítio da COX-1. Na figura são mostrados os centroides (Ct) e indicadas as interações do tipo CH... π com os aminoácidos Al527, Ile523 e Ser353. Figura construída com DS Visualizer 3.0.

3.2.3.5 COMPOSTO 6R_SO_BR DA FAMÍLIA PRO

Tabela 3.2.27 - Algumas interações do composto 6r_SO_Br com a COX-1 (3kk6)

Interação enzima COX-1 - ligante	átomo enzima	átomo ligante	distância (Å)
CH... π : SER353:HA - Ct13	HA	Ct13	2,38
CH... π : ILE523:HG21 - Ct13	HG21	Ct13	2,80
ILE517:HN - Br24	HN	Br24	2,82

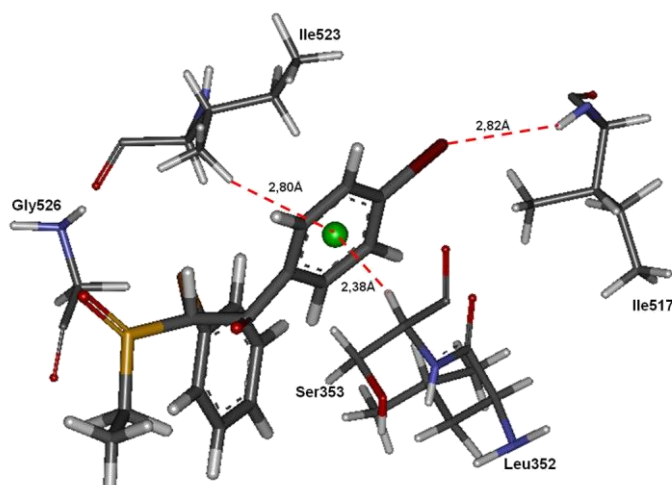


Figura 3.2.27. Algumas interações do composto 6r_SO_Br com resíduos de aminoácidos do sítio da COX-1. Na figura são mostrados os centroides (Ct) e indicadas as interações do tipo CH... π com os aminoácidos Ile523 e Leu352. Figura construída com DS Visualizer 3.0.

3.2.3.6 COMPOSTO 7r_SO_CH₃ DA FAMÍLIA PRO

Tabela 3.2.28 - Algumas interações do composto 7r_SO_CH₃ com a COX-1 (3kk6)

Interação enzima COX-1 - ligante	átomo enzima	átomo ligante	distância (Å)
CH... π : SER353:HA - Ct14	HA	Ct4	2,38
CH... π : ILE523:HG11 - Ct14	HG11	Ct14	2,80

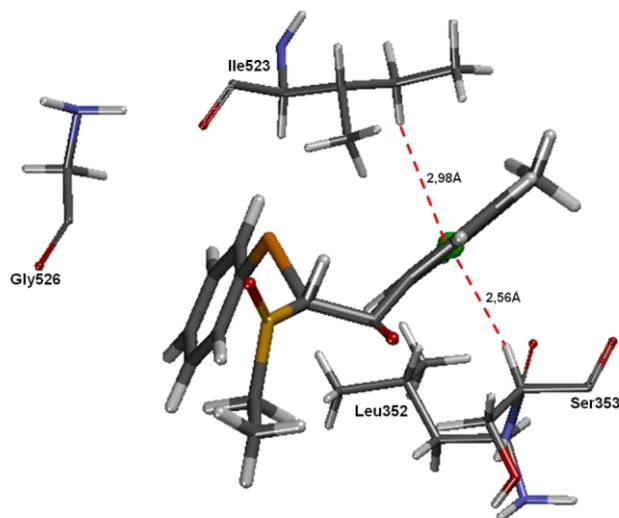


Figura 3.2.28. Algumas interações do composto 7r_SO_CH₃ com resíduos de aminoácidos do sítio da COX-1. Na figura são mostrados os centroides (Ct) e indicadas as interações do tipo CH... π com os aminoácidos Ile523 e Ser353. Figura construída com DS Visualizer 3.0.

3.2.3.7 COMPOSTO 7s_SO_CH₃ DA FAMÍLIA PRO

Tabela 3.2.29 - Algumas interações do composto 7s_SO_CH₃ com a COX-1 (3kk6)

Interação enzima COX-1 - ligante	átomo enzima	átomo ligante	distância (Å)
CH... π : SER353:HA - Ct15	HA	Ct15	2,48
CH... π : ILE523:HG21 - Ct15	HG21	Ct15	2,98
CH... π : GLY526:HA2 - Ct21	HA2	Ct21	3,18
ARG120:HH22 - O19	HH22	O19	2,38

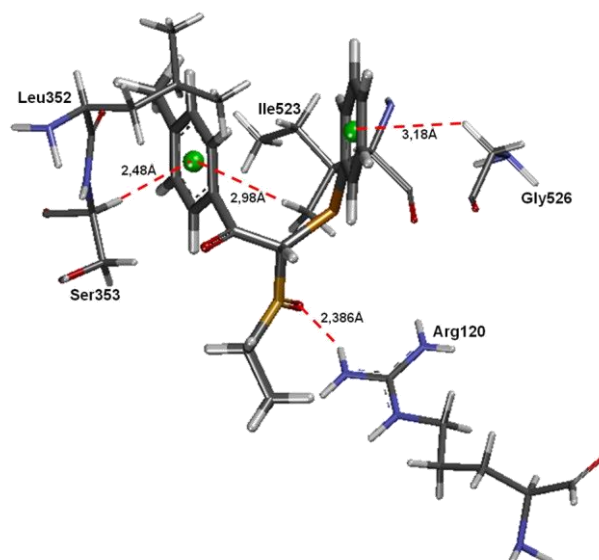


Figura 3.2.29. Algumas interações do composto 7s_SO_CH₃ com resíduos de aminoácidos do sítio da COX-1. Na figura são mostrados os centroides (Ct) e indicadas as interações do tipo CH... π com os aminoácidos Ile523 e Ser353. Figura construída com DS Visualizer 3.0.

3.2.3.8 COMPOSTO 8R_SO_NO₂ DA FAMÍLIA PRO

Tabela 3.2.30 - Algumas interações do composto 8r_SO_NO₂ com a COX-1 (3kk6)

Interação enzima COX-1 - ligante	átomo enzima	átomo ligante	distância (Å)
CH... π : SER353:HA – Ct16	HA	Ct16	2,27
CH... π : ILE523:HG21 – Ct16	HG21	Ct16	3,01
ILE517:HN – O4	HN	O4	2,32

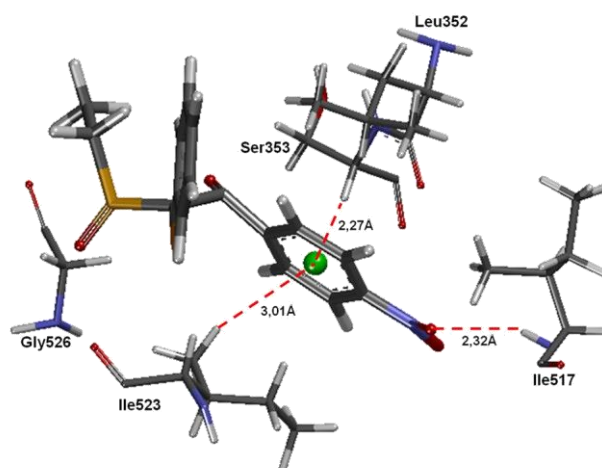


Figura 3.2.30. Algumas interações do composto 8r_SO_NO₂ com resíduos de aminoácidos do sítio da COX-1. Na figura são mostrados os centroides (Ct) e indicadas as interações do tipo CH... π com os aminoácidos Ile523 e Ser353. Figura construída com DS Visualizer 3.0.

3.2.3.9 COMPOSTO 8s_SO_NO₂ DA FAMÍLIA PRO

Tabela 3.2.31 - Algumas interações do composto 8s_SO_NO₂ com a COX-1 (3kk6)

Interação enzima COX-1 - ligante	átomo enzima	átomo ligante	distância (Å)
CH... π : SER353:HA - Ct17	HA	Ct17	2,55Å
CH... π : ILE523:HG21 - Ct7	HG21	Ct17	2,95 Å
ILE517:HN - O3	HN	O3	2,27 Å
HIS90:HE1 - O4	HE1	O4	2,34 Å

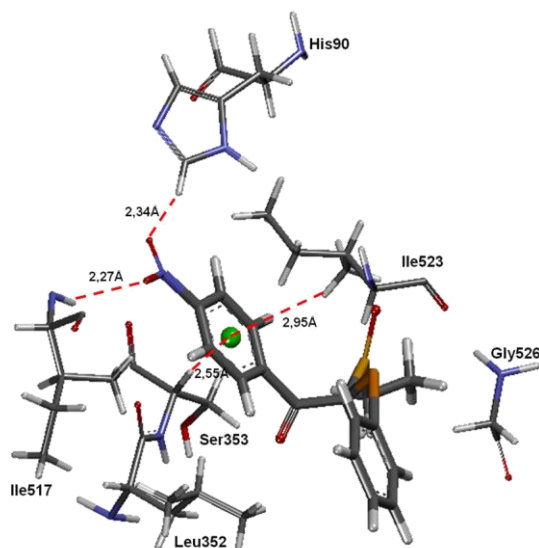


Figura 3.2.31. Algumas interações do composto 8s_SO_NO₂ com resíduos de aminoácidos do sítio da COX-1. Na figura são mostrados os centroides (Ct) e indicadas as interações do tipo CH... π com os aminoácidos Ile523 e Ser353. Figura construída com DS Visualizer 3.0.

3.2.3.10 COMPOSTO 9r_SO_OCH₃ DA FAMÍLIA PRO

Tabela 3.2.32 - Algumas interações do composto 9r_SO_OCH₃ e com a COX-1 (3kk6)

Interação enzima COX-1 - ligante	átomo enzima	átomo ligante	distância (Å)
CH... π : SER353:HA - Ct18	HA	Ct18	2,19
CH... π : ILE523:HG11 - Ct18	HG11	Ct18	2,84
HIS90:HE1 - O23	HE1	O23	3,21

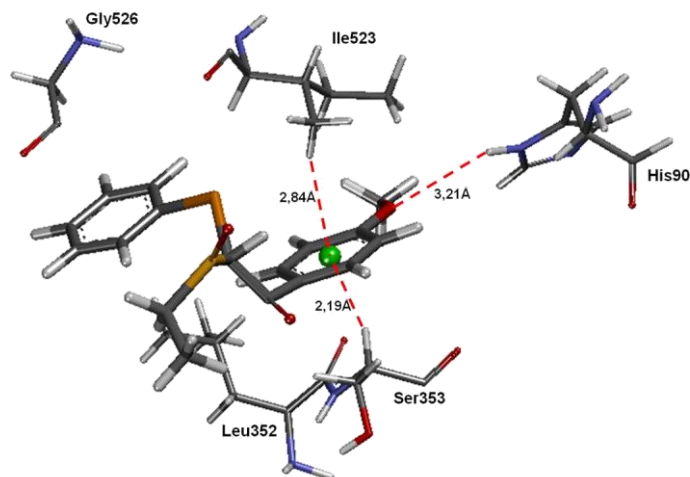


Figura 3.2.32. Algumas interações do composto 9r_SO_OCH₃ com resíduos de aminoácidos do sítio da COX-1. Na figura são mostrados os centroides (Ct) e indicadas as interações do tipo CH... π com os aminoácidos Ile523 e Ser353. Figura construída com DS Visualizer 3.0.

3.2.3.11 COMPOSTO 11s_S_BR DA FAMÍLIA PRO

Tabela 3.2.33 - Algumas interações do composto 11s_S_Br com a COX-1 (3kk6)

Interação enzima COX-1 - ligante	átomo enzima	átomo ligante	distância (Å)
CH... π : SER353:HA - Ct1	HA	Ct1	2,83
CH... π : ILE523:HG11 - Ct1	HG11	Ct1	2,92
CH... π : TYR385:Ct19 - Br24	Ct19	Br24	3,94

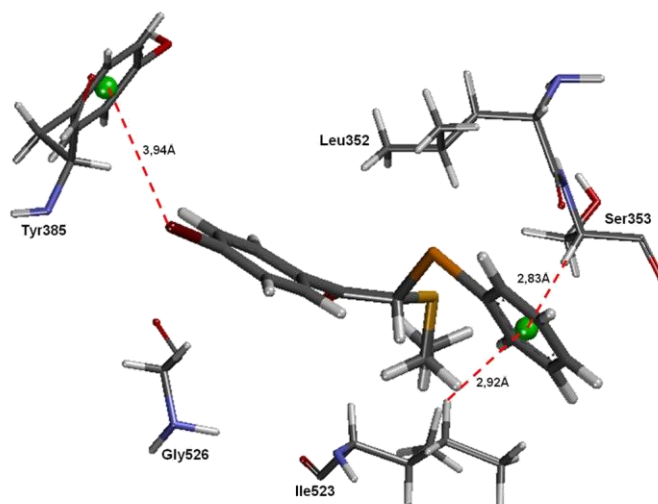


Figura 3.2.33. Algumas interações do composto 11s_S_Br com resíduos de aminoácidos do sítio da COX-1. Na figura são mostrados os centroides (Ct) e indicadas as interações do tipo CH... π com os aminoácidos Tyr385, Ile523 e Ser353. Figura construída com DS Visualizer 3.0.

3.2.3.12 COMPOSTO 12r_S_CH3 DA FAMÍLIA PRO

Tabela 3.2.34 - Algumas interações do composto 12r_S_CH3 com a COX-1 (3kk6)

Interação enzima COX-1 - ligante	átomo enzima	átomo ligante	distância (Å)
CH... π : SER353:HA - Ct12	HA	Ct2	3,94
CH... π : ILE523:HG11 - Ct12	HG11	Ct2	3,94

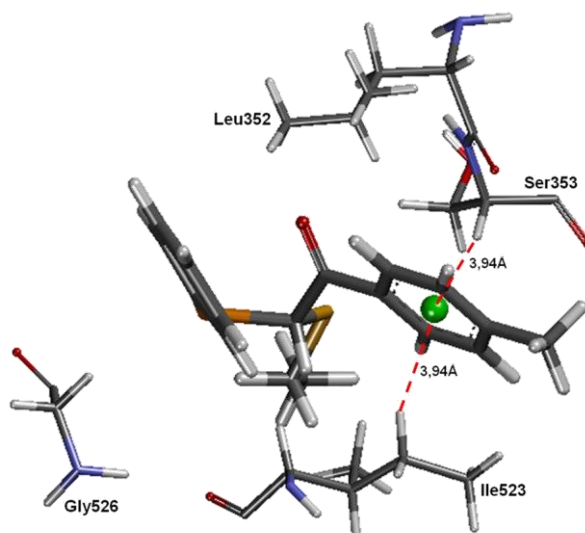


Figura 3.2.34. Algumas interações do composto 12r_S_CH3 com resíduos de aminoácidos do sítio da COX-1. Na figura são mostrados os centróides (Ct) e indicadas as interações do tipo CH... π com os aminoácidos Ile523 e Ser353. Figura construída com DS Visualizer 3.0.

3.2.3.13 COMPOSTO 12s_S_CH3 DA FAMÍLIA PRO

Tabela 3.2.35 - Algumas interações do composto 12s_S_CH3 com a COX-1 (3kk6)

Interação enzima COX-1 - ligante	átomo enzima	átomo ligante	distância (Å)
CH... π : SER353:HA - Ct3	HA	Centróide3	2,84Å
CH... π : ILE523:HG11 - Ct3	HG11	Centróide3	2,92Å
CH... π : TYR385:Ct18 - H24	Ct18	CH24	3,55Å

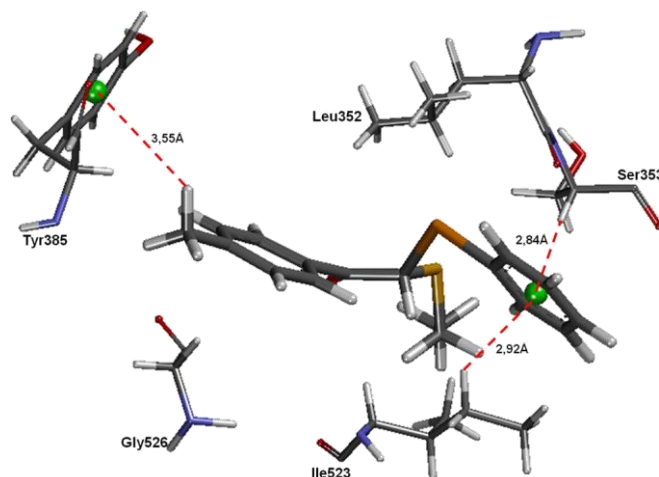


Figura 3.2.35. Algumas interações do composto 12s_S_CH₃ com resíduos de aminoácidos do sítio da COX-1. Na figura são mostrados os centroides (Ct) e indicadas as interações do tipo CH $\cdots\pi$ com os aminoácidos Tyr385, Ile523 e Ser353. Figura construída com DS Visualizer 3.0.

3.2.3.14 COMPOSTO 13s_S_H DA FAMÍLIA PRO

Tabela 3.2.36 – Algumas interações do composto 13s_S_H e com a COX-1 (3kk6)

Interação enzima COX-1 - ligante	átomo enzima	átomo ligante	distância (Å)
CH $\cdots\pi$: SER353:HA - Ct4	HA	Ct4	2,40
CH $\cdots\pi$: ILE523:HG11 - Ct4	HG11	Ct4	2,80

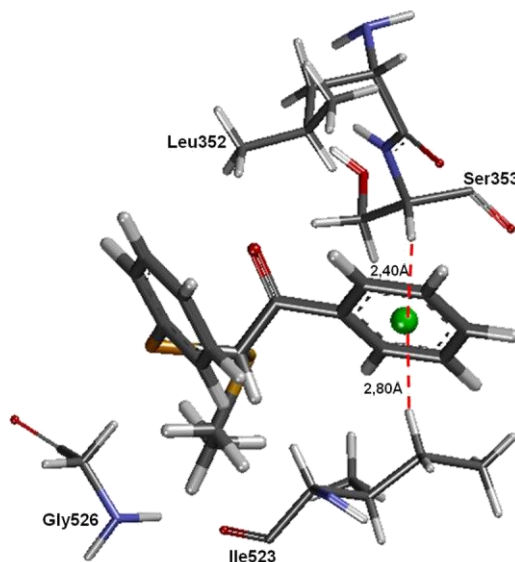


Figura 3.2.36. Algumas interações do composto 13s_S_H com resíduos de aminoácidos do sítio da COX-1. Na figura são mostrados os centroides (Ct) e indicadas as interações do tipo CH $\cdots\pi$ com os aminoácidos Ile523 e Ser353. Figura construída com DS Visualizer 3.0.

3.2.3.15 COMPOSTO 14r_S_NO₂ DA FAMÍLIA PRO

Tabela 3.2.37 - Algumas interações do composto 14r_S_NO₂ e com a COX-1 (3kk6)

Interação enzima COX-1 - ligante	átomo enzima	átomo ligante	distância (Å)
CH... π : SER353:HA - Ct6	HA	Ct6	2,47
CH... π : ILE523:HG11 - Ct6	HG11	Ct6	2,90
ILE517:HN - O4	HN	O4	2,67
HIS90:HE1 - O3	HE1	O3	2,07

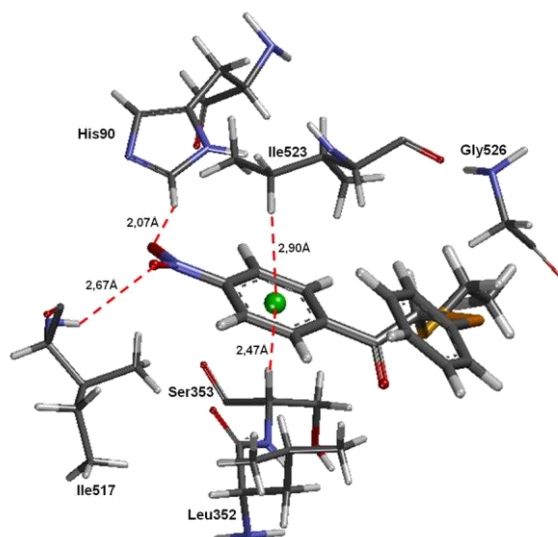


Figura 3.2.37. Algumas interações do composto 14r_S_NO₂ com resíduos de aminoácidos do sítio da COX-1. Na figura são mostrados os centroides (Ct) e indicadas as interações do tipo CH... π com os aminoácidos Ile523 e Ser353. Figura construída com DS Visualizer 3.0.

3.2.3.16 COMPOSTO 14s_S_NO₂ DA FAMÍLIA PRO

Tabela 3.2.38 - Algumas interações do composto 14s_S_NO₂ com a COX-1 (3kk6)

Interação enzima COX-1 - ligante	átomo enzima	átomo ligante	distância (Å)
CH... π : SER353:HA - Ct7	HA	Ct7	2,47Å
CH... π : ILE523:HG11 - Ct7	HG11	Ct7	2,96Å
ILE517:HN - O4	HN	O4	2,04Å
HIS90:HE1 - O3	HE1	O3	2,80Å

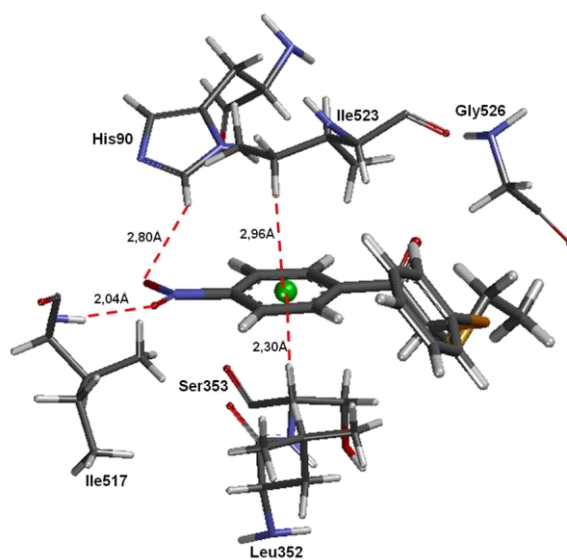


Figura 3.2.38. Algumas interações do composto 14s_S_NO₂ com resíduos de aminoácidos do sítio da COX-1. Na figura são mostrados os centroides (Ct) e indicadas as interações do tipo CH... π com os aminoácidos Ile523 e Ser353. Figura construída com DS Visualizer 3.0.

APÊNDICE 3.3

Nesta seção são apresentadas as figuras e as tabelas contendo os resultados para os cálculos das interações π entre os 15 compostos da família PRO, enantiômeros R e S, e as enzimas COX-1 e COX-2.

Os cálculos foram realizados utilizando os procedimentos desenvolvidos por Sacco (2013), para as poses previamente selecionadas por visualização molecular a partir dos cálculos de docking (resultados apresentados no Relatório 1).

3.3.1 INTERAÇÕES π DO COMPLEXO CRISTALOGRÁFICO CELECOXIB-COX-2 (ESTRUTURA 3LN1)

3.3.2 INTERAÇÕES π DO LIGANTE SC-558 COM A ENZIMA COX-2

3.3.3 INTERAÇÕES π DOS COMPLEXOS DA FAMÍLIA PRO COM A ENZIMA COX-2

3.3.4 INTERAÇÕES π DO COMPLEXO CRISTALOGRÁFICO CELECOXIB-COX-1 (ESTRUTURA 3KK6)

3.3.5 INTERAÇÕES π DO LIGANTE SC-558 COM A ENZIMA COX-1

3.3.6 INTERAÇÕES π DOS COMPLEXOS DA FAMÍLIA PRO COM A ENZIMA COX-1

3.3.1 INTERAÇÕES π DO COMPLEXO CRISTALGRÁFICO CELECOXIB-COX-2 (CÓDIGO PDB 3LN1)

Tabela 3.3.1 – Interações π do ligante cristalográfico com a enzima COX-2 (3LN1)*

Interações π	distância (Å)
CH... π : SER339:HA – Ct1	2,46
CH... π : VAL509: HG12 – Ct1	3,04
CH... π : VAL509: HG23 – Ct1	3,18
CH... π : LEU338: HD22 – Ct2	3,72
CH... π : ALA513: N – Ct2	3,88
CH... π : ALA513: HA – Ct2	3,30
CH... π : ALA513: HB3 – Ct3	3,35
CH... π : VAL335: HG12 – Ct3	2,94

Ct = centroide

*numeração dos aminoácidos conforme estrutura 3LN1. A equivalência com a estrutura 1CX2 está apresentada na tabela x da Seção C.

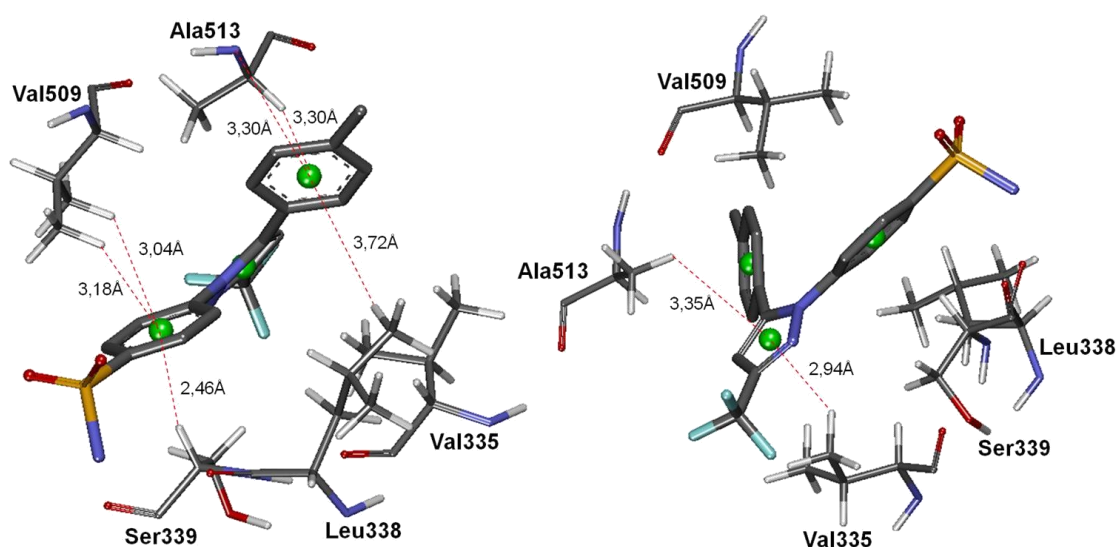


Figura 3.3.1. Interações do tipo C-H... π com os aminoácidos Val509, Ser339, Ala513, Leu338 e Val335 e do tipo N... π com Ala513. Os Hidrogênios do ligante foram omitidos para facilitar a visualização. Numeração dos aminoácidos conforme estrutura 3LN1. A equivalência com a estrutura 1CX2 está apresentada na tabela 4 da Seção B.

3.3.2 INTERAÇÕES π DO LIGANTE SC-558 COM A ENZIMA COX-2 (CÓDIGO PDB 1CX2)

Tabela 3.3.2 – Interações π do ligante SC-558 com a enzima COX-2

Interações π	distância (Å)
CH... π : VAL523:HG12 – Ct1	2,86
CH... π : SER353: HA – Ct1	2,64
CH... π : ALA527: N – Ct2	3,72
CH... π : ALA527: HA – Ct2	2,93
CH... π : LEU352: HD23 – Ct2	3,83
CH... π : VAL349: HG11 – Ct3	3,65
CH... π : ALA527: HB1 – Ct3	3,47

Ct=centroide

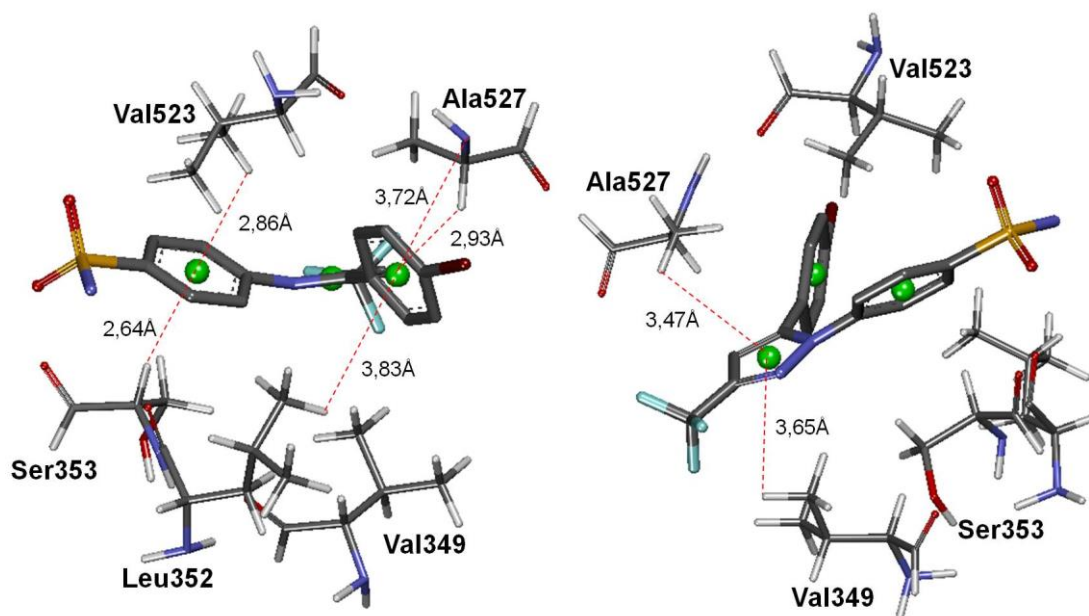


Figura 3.3.2. Interações do tipo C-H... π com os aminoácidos Val523, Ser353, Ala527, Val349 e Leu352 e do tipo N... π com Ala527. Os Hidrogênios do ligante foram omitidos para facilitar a visualização.

3.3.3 INTERAÇÕES π DOS COMPLEXOS DA FAMÍLIA PRO COM A ENZIMA COX-2

3.3.3.1 LIGANTE 1r_SO₂_BR DA FAMÍLIA PRO

Tabela 3.3.3 – Interações π do ligante 1r_SO₂_Br com a enzima COX-2

Interações π	distância (Å)
CH... π : VAL523: HG11 – Ct2	2,85
CH... π : SER353:HA – Ct2	2,69
CH... π : SER353:O – Ct2	4,29
CH... π : LEU352: HD23 – Ct1	2,79
CH... π : LEU352: HD21 – Ct1	3,76

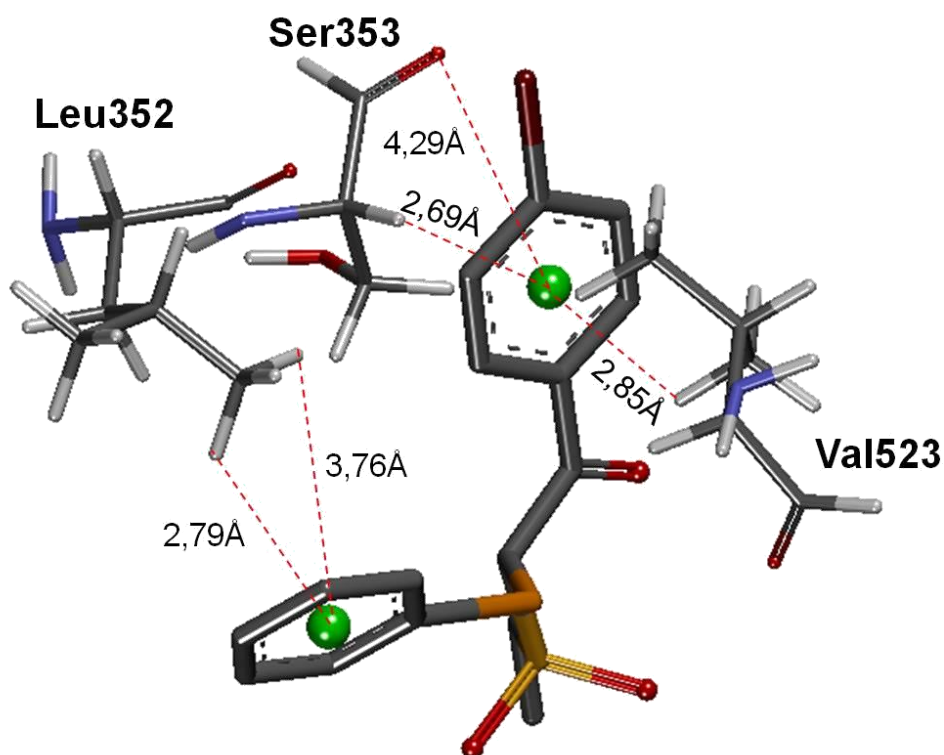


Figura 3.3.3. Interações do tipo C-H... π com os aminoácidos Val523, Ser353 e Leu352 e do tipo O... π com Ser353. Os Hidrogênios do ligante foram omitidos para facilitar a visualização.

3.3.3.2 LIGANTE 1s_SO₂_BR DA FAMÍLIA PRO

Tabela 3.3.4 - Interações π do ligante 1s_SO₂_Br com a enzima COX-2

Interações π	distância (Å)
CH... π : ALA527:N – Ct1	3,60
CH... π : GLY526:O – Ct1	3,64
CH... π : SER353:N – Ct2	4,23
CH... π : VAL523:HG12 – Ct2	3,35
CH... π : VAL523:HG11 – Ct2	3,14

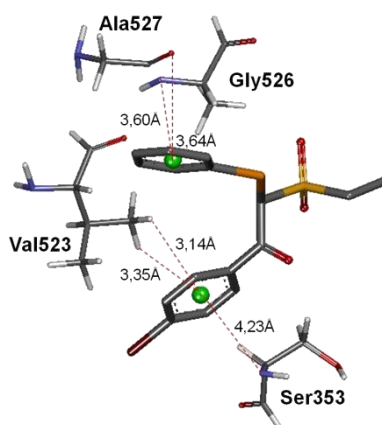


Figura 3.3.4. Apresentação das interações do tipo C-H... π com os aminoácidos Val523, do tipo N... π com Ala527 e Ser353 e do tipo O... π com Gly526. Os Hidrogênios do ligante foram omitidos para facilitar a visualização.

3.3.3.3 LIGANTE 2r_SO₂_H DA FAMÍLIA PRO

Tabela 3.3.5 - Interações π do ligante 2r_SO₂_H com a enzima COX-2

Interações π	distância (Å)
CH... π : VAL523: HG23 – Ct2	3,07
CH... π : VAL523: HG22 – Ct2	2,59
CH... π : SER353: O – Ct2	4,07
CH... π : ALA527: HA – Ct1	3,73
CH... π : TRP387: HH2 – Ct1	3,71

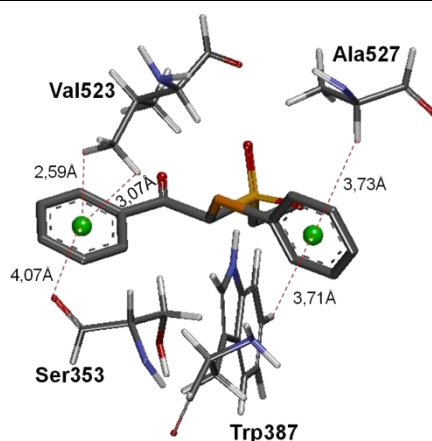


Figura 3.3.5. Apresentação das interações do tipo C-H... π com os aminoácidos Val523, Ala527 e Trp387, e do tipo O... π com Ser353. Os Hidrogênios do ligante foram omitidos para facilitar a visualização.

3.3.3.4 LIGANTE 2s_SO₂_H DA FAMÍLIA PRO

Tabela 3.3.6 - Interações π do ligante 2s_SO₂_H com a enzima COX-2

Interações π	distância (Å)
CH... π : ALA527:N – Ct1	3,77
CH... π : VAL523:HG11 – Ct2	3,10
CH... π : VAL523:HG12 – Ct2	3,08
CH... π : SER353:HA – Ct2	2,59
CH... π : SER353:O – Ct2	3,99
CH... π : SER353:N – Ct2	4,47

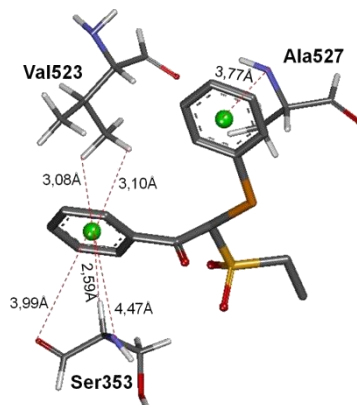


Figura 3.3.6. Interações do tipo C-H... π com os aminoácidos Val523 e Ser353, do tipo N... π com Ser353 e Ala527 e do tipo O... π com Ser353. Os Hidrogênios do ligante foram omitidos para facilitar a visualização.

3.3.3.5 LIGANTE 3R_SO₂_CH₃ DA FAMÍLIA PRO

Tabela 3.3.7 - Interações π do ligante 3r_SO₂_CH₃ com a enzima COX-2

Interações π	distância (Å)
CH... π : SER353:HA – Ct2	2,60
CH... π : SER353:O – Ct2	4,09
CH... π : LEU352: HD23 – Ct1	3,07
CH... π : VAL523: HG11 – Ct2	3,05

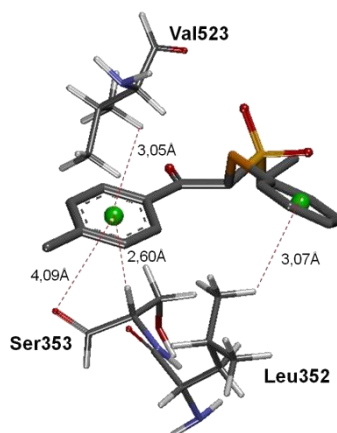


Figura 3.3.7. Apresentação das interações do tipo C-H... π com os aminoácidos Val523, Ser353 e Leu352, e do tipo O... π com Ser353. Os Hidrogênios do ligante foram omitidos para facilitar a visualização.

3.3.3.6 LIGANTE 3s_SO₂_CH₃ DA FAMÍLIA PRO

Tabela 3.3.8 - Interações π do ligante 3s_SO₂_CH₃ com a enzima COX-2

Interações π	distância (Å)
CH... π :ALA527:N – Ct1	3,78
CH... π : VAL523:O – Ct1	4,44
CH... π : VAL523:HG11 – Ct2	3,26
CH... π : VAL523:HG23 – Ct2	3,15
CH... π : SER353:HA – Ct2	2,65
CH... π : SER353:O – Ct2	4,01

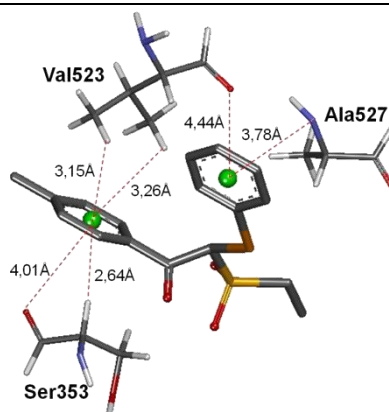


Figura 3.3.8. Apresentação das interações do tipo C-H... π com os aminoácidos Val523 e Ser353, do tipo N... π com Ala527 e do tipo O... π com Ser353 e Val523. Os Hidrogênios do ligante foram omitidos para facilitar a visualização.

3.3.3.7 LIGANTE 4r_SO₂_NO₂ DA FAMÍLIA PRO

Tabela 3.3.9 – Interações π do ligante 4r_SO₂_NO₂ com a enzima COX-2

Interações π	distância (Å)
CH... π : SER353:O – Ct1	4,06
CH... π : VAL523:HG22 – Ct1	2,61
CH... π : VAL523:HG23 – Ct1	3,05
CH... π : LEU352: HD23 – Ct2	3,35
CH... π : LEU352: HD22 – Ct2	3,43
CH... π : ALA527: HA – Ct2	3,64
CH... π : ALA527: N – Ct2	4,23

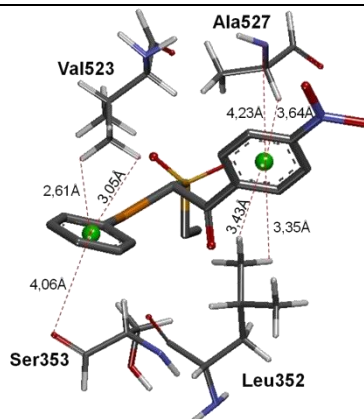


Figura 3.3.9. Interações do tipo C-H... π com os aminoácidos Val523, Ala527 e Leu352, do tipo N... π com Ala527 e do tipo O... π com Ser353. Os Hidrogênios do ligante foram omitidos para facilitar a visualização.

3.3.3.8 LIGANTE 4s_SO₂_NO₂ DA FAMÍLIA PRO

Tabela 3.3.10 – Interações π do ligante 4s_SO₂_NO₂-1 com a enzima COX-2

Interações π	distância (Å)
CH... π : ALA527:N – Ct1	3,96
CH... π : VAL523:O – Ct1	4,42
CH... π : SER353:HA – Ct2	2,84
CH... π : SER353:O – Ct2	4,04
CH... π : VAL523:HG11 – Ct2	3,21

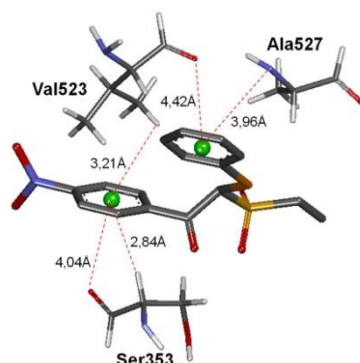


Figura 3.3.10. Interações do tipo C-H... π com os aminoácidos Val523 e Ser353, do tipo N... π com Ala527 e do tipo O... π com Ser353 e Val523. Os Hidrogênios foram omitidos para facilitar a visualização.

3.3.3.9 LIGANTE 5r_SO₂_OCH₃ DA FAMÍLIA PRO

Tabela 3.3.11 – Interações π do ligante 5r_SO₂_OCH₃ com a enzima COX-2

Interações π	distância (Å)
CH... π : SER353:HB2 – Ct2	3,60
CH... π : VAL523: HG12 – Ct2	3,08
CH... π : VAL523: HG22 – Ct2	3,74
CH... π : LEU352: HD21 – Ct1	3,70

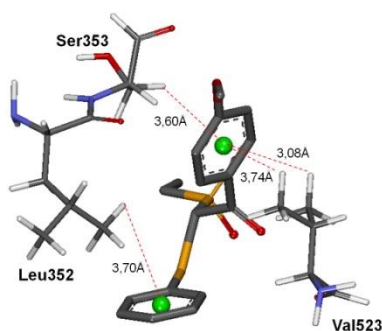


Figura 3.3.11. Interações do tipo C-H... π com os aminoácidos Leu352, Val523 e Ser353. Os Hidrogênios foram omitidos para facilitar a visualização.

3.3.3.10 LIGANTE 5s_SO₂_OCH₃ DA FAMÍLIA PRO

Tabela 3.3.12 – Interações π do ligante 5s_SO₂_OCH₃ com a enzima COX-2

Interações π	distância (Å)
CH... π : ALA527:N – Ct1	3,71
CH... π : VAL523:HG11 – Ct2	3,48
CH... π : VAL523:HG12 – Ct2	3,48
CH... π : SER353:N – Ct2	4,09

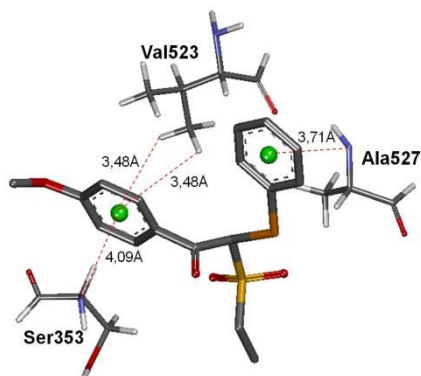


Figura 3.3.12. Apresentação das interações do tipo C-H... π com os aminoácidos Val523, do tipo N... π com Ala527 e Ser353. Os Hidrogênios foram omitidos para facilitar a visualização.

3.3.3.11 Ligante 6r_SO_Br da família PRO

Tabela 3.3.13 – Interações π do ligante 6r-SO-Br com a enzima COX-2

Interações π	distância (Å)
CH... π : LEU352: HD22 – Ct2	3,32
CH... π : LEU352: HD23 – Ct2	3,21
CH... π : ALA527: HA – Ct2	3,70
CH... π : ALA527: N – Ct2	4,36
CH... π : SER353: O – Ct1	4,00
CH... π : VAL523: HG22 – Ct1	2,64
CH... π : VAL523: HG23 – Ct1	3,06

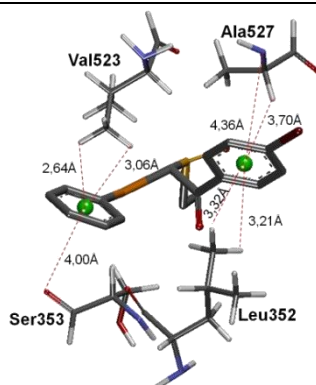


Figura 3.3.13. Apresentação das interações do tipo C-H... π com os aminoácidos Val523, Ala527 e Leu352, do tipo N... π com Ala527 e do tipo O... π com Ser353. Os Hidrogênios foram omitidos para facilitar a visualização.

3.3.3.12 LIGANTE 6s_SO_BR DA FAMÍLIA PRO

Tabela 3.3.14 – Interações π do ligante 6s-SO-Br com a enzima COX-2

Interações π	distância (Å)
CH... π : ALA527:N – Ct1	3,82
CH... π : VAL523: HG11– Ct2	3,26
CH... π : VAL523: HG23 – Ct2	3,05
CH... π : SER353:O – Ct2	4,08
CH... π : SER353: HA – Ct2	2,70

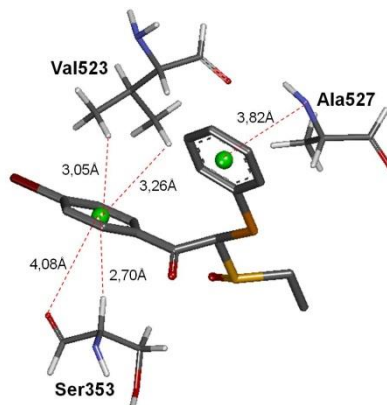


Figura 3.3.14. Apresentação das interações do tipo C-H... π com os aminoácidos Val523 e Ser353, do tipo N... π com Ala527 e do tipo O... π com Ser353. Os Hidrogênios foram omitidos para facilitar a visualização.

3.3.3.13 LIGANTE 7r_SO_H DA FAMÍLIA PRO

Tabela 3.3.15 – Interações π do ligante 7r_SO_CH₃ com a enzima COX-2

Interações π	distância (Å)
CH... π : TRP387:HH2 – Ct2	3,68
CH... π : ALA527:N – Ct2	4,29
CH... π : SER353: HA – Ct1	2,70
CH... π : SER353: O – Ct1	4,16
CH... π : VAL523: HG11 – Ct1	2,94
CH... π : VAL523: HG12 – Ct1	2,99

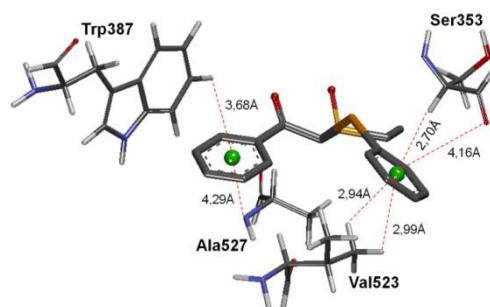


Figura 3.3.15. Interações do tipo C-H... π com os aminoácidos Val523, Trp387 e Ser353, do tipo N... π com Ala527 e do tipo O... π com Ser35. Os hidrogênios foram omitidos para facilitar a visualização.

3.3.3.14 LIGANTE 7s_SO_H DA FAMÍLIA PRO

Tabela 3.3.16 – Interações π do ligante 7s_SO_CH₃ com a enzima COX-2

Interações π	distância (Å)
CH... π : ALA527:N – Ct1	4,03
CH... π : VAL523:HG11 – Ct2	3,17
CH... π : VAL523:HG12 – Ct2	3,19
CH... π : SER353:HA – Ct2	2,83
CH... π : SER353:O – Ct2	4,01

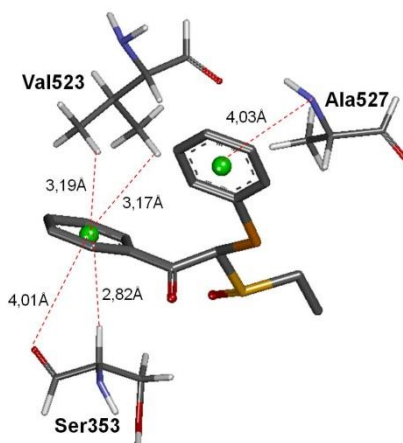


Figura 3.3.16. Interações do tipo C-H... π com os aminoácidos Val523 e Ser353, do tipo N... π com Ala527 e do tipo O... π com Ser353. Os Hidrogênios foram omitidos para facilitar a visualização.

3.3.3.15 LIGANTE 8r_SO_CH₃ DA FAMÍLIA PRO

Tabela 3.3.17 – Interações π do ligante 8r-SO-CH₃ com a enzima COX-2

Interações π	distância (Å)
CH... π : ALA527:HA – Ct2	3,16
CH... π : ALA527:N – Ct2	3,81
CH... π : GLY526:O – Ct2	3,91
CH... π : VAL523:HG11 – Ct1	3,26
CH... π : VAL523:HG23 – Ct1	3,16
CH... π : SER353:O – Ct1	3,98
CH... π : TYR385:Ct12 – H2O	3,63

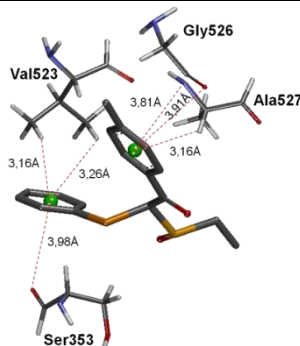


Figura 3.3.17. Interações do tipo C-H... π com os aminoácidos Val523, Ala527 e Tyr385, do tipo N... π com Ala527 e do tipo O... π com Ser353 e Gly526. Os Hidrogênios foram omitidos para facilitar a visualização.

3.3.3.16 LIGANTE 8s_SO_CH₃ DA FAMÍLIA PRO

Tabela 3.3.18 – Interações π do ligante 8s-SO-CH₃ com a enzima COX-2

Interações π	distância (Å)
CH... π : ALA527:N – Ct1	3,81
CH... π : VAL523:O – Ct1	4,32
CH... π : VAL523: HG11 – Ct2	3,25
CH... π : VAL523: HG23 – Ct2	3,09
CH... π : SER353: HA – Ct2	2,69
CH... π : SER353: O – Ct2	4,05

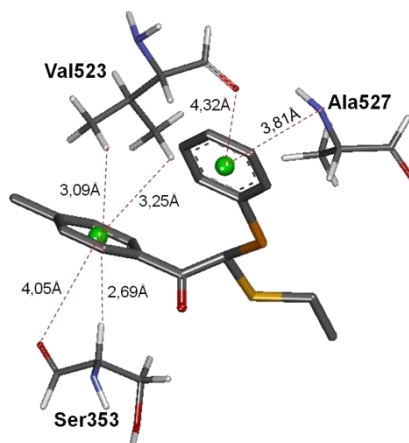


Figura 3.3.18. Interações do tipo C-H... π com os aminoácidos Val523 e Ser353, do tipo N... π com Ala527 e do tipo O... π com Ser353 e Val523. Os Hidrogênios foram omitidos para facilitar a visualização.

3.3.3.17 LIGANTE 9r_SO_NO₂ DA FAMÍLIA PRO

Tabela 3.3.19 – Interações π do ligante 9r_SO_NO₂ com a enzima COX-2

Interações π	distância (Å)
CH... π : VAL523:HG22 – Ct1	2,61
CH... π : VAL523:HG23 – Ct1	3,09
CH... π : SER353: O – Ct1	4,02
CH... π : LEU352:HD22 – Ct2	3,21
CH... π : LEU352:HD23 – Ct2	2,98

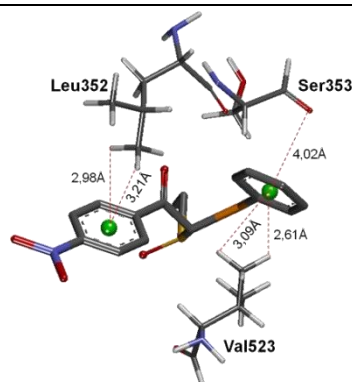


Figura 3.3.19. Apresentação das interações do tipo C-H... π com os aminoácidos Val523 e Leu352, e do tipo O... π com Ser353. Os hidrogênios foram omitidos para facilitar a visualização.

3.3.18 LIGANTE 9s_SO_NO₂ DA FAMÍLIA PRO

Tabela 3.3.20 – Interações π do ligante 9s_SO_NO₂ com a enzima COX-2

Interações π	distância (Å)
CH... π : ALA527:N – Ct1	4,25
CH... π : LEU352:HD22 – Ct1	3,43
CH... π : VAL523:HG11 – Ct2	3,16
CH... π : SER353:HA – Ct2	2,78
CH... π : SER353:O – Ct2	4,02

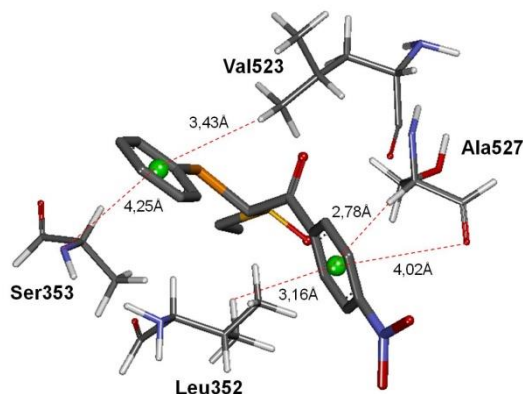


Figura 3.3.20. Apresentação das interações do tipo C-H... π com os aminoácidos Val523, Ser353 e Leu352, do tipo N... π com Ala527 e do tipo O... π com Ser353. Os hidrogênios foram omitidos para facilitar a visualização.

3.3.19 LIGANTE 10R_SO_OCH₃ DA FAMÍLIA PRO

Tabela 3.3.21 – Interações π do ligante 10r_SO_OCH₃ com a enzima COX-2

Interações π	distância (Å)
CH... π : VAL523:HG12 – Ct2	3,18
CH... π : VAL523:HG22 – Ct2	3,57
CH... π : SER353:HA – Ct2	2,50
CH... π : SER353:N – Ct2	4,37
CH... π : GLY526:O – Ct1	3,96

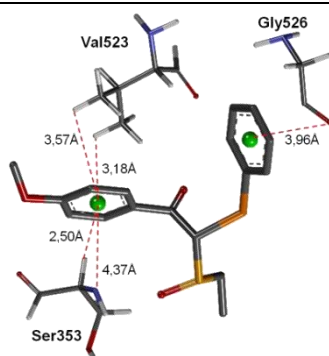


Figura 3.3.21. Interações do tipo C-H... π com os aminoácidos Val523 e Ser353, do tipo N... π com Ser353 e do tipo O... π com Gly526. Os Hidrogênios foram omitidos para facilitar a visualização.

3.3.3.20 LIGANTE 10s_SO_OCH₃ DA FAMÍLIA PRO

Tabela 3.3.22 – Interações π do ligante 10s_SO_OCH₃ com a enzima COX-2

Interações π	distância (Å)
CH... π : GLY526: HG12 – Ct2	3,56
CH... π : VAL523: HG11 – Ct2	3,55
CH... π : SER353: HA – Ct2	2,16
CH... π : SER353: N – Ct2	3,99

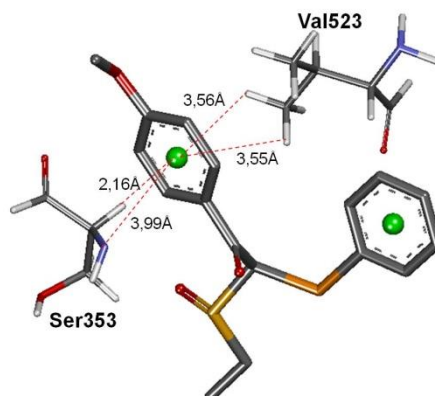


Figura 3.3.22. Apresentação das interações do tipo C-H... π com os aminoácidos Val523, Gly526 e Ser353, do tipo N... π com Ser353. Os Hidrogênios foram omitidos para facilitar a visualização.

3.3.3.21 LIGANTE 11r_S_BR DA FAMÍLIA PRO

Tabela 3.3.23 – Interações π do ligante 11r_S_Br com a enzima COX-2

Interações π	distância (Å)
CH... π : SER353:O – Ct1	4,03
CH... π : VAL523:HG22 – Ct1	2,59
CH... π : VAL523:HG23 – Ct1	3,10
CH... π : ALA527: N – Ct2	3,82
CH... π : LEU352: HD23 – Ct2	3,80
CH... π : VAL523: O – Ct2	4,17

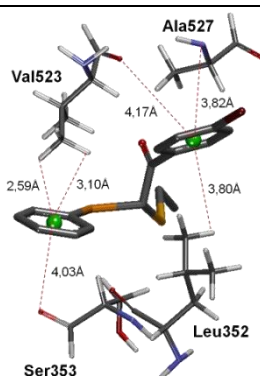


Figura 3.3.23. Apresentação das interações do tipo C-H... π com os aminoácidos Val523 e Leu352, do tipo N... π com Ala527 e do tipo O... π com Ser353 e Val523. Os Hidrogênios foram omitidos para facilitar a visualização.

3.3.3.22 LIGANTE 11s_S_BR DA FAMÍLIA PRO

Tabela 3.3.24 – Interações π do ligante 11s_S_Br com a enzima COX-2

Interações π	distância (Å)
CH... π : GLY526: O – Ct1	4,28
CH... π : LEU352: HD23 – Ct1	3,49
CH... π : SER353: HA – Ct2	2,75
CH... π : SER353: O – Ct2	4,30
CH... π : VAL523: HG11 – Ct2	2,84
CH... π : VAL523: HG12 – Ct2	3,21

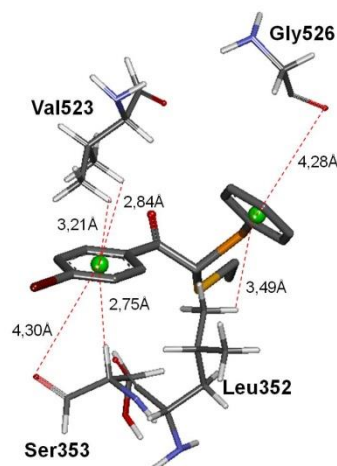


Figura 3.3.24. Apresentação das interações do tipo C-H... π com os aminoácidos Val523, Leu352 e Ser353 e do tipo O... π com Ser353 e Gly526. Os Hidrogênios foram omitidos para facilitar a visualização.

3.3.3.23 LIGANTE 12r_S_H DA FAMÍLIA PRO

Tabela 3.3.25 – Interações π do ligante 12r_S_H com a enzima COX-2

Interações π	distância (Å)
CH... π : VAL523:HG11 – Ct2	3,08
CH... π : VAL523:HG12 – Ct2	2,95
CH... π : SER353:HA – Ct2	2,73
CH... π : SER353:O – Ct2	4,00
CH... π : : ALA527:N – C1	3,84

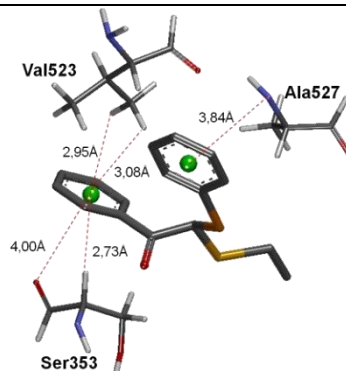


Figura 3.3.25. Apresentação das interações do tipo C-H... π com os aminoácidos Val523 e Ser353, do tipo N... π com Ala527 e do tipo O... π com Ser353. Os Hidrogênios foram omitidos para facilitar a visualização.

3.3.3.24 LIGANTE 12s_S_H DA FAMÍLIA PRO

Tabela 3.3.26 – Interações π do ligante 12s_S_H com a enzima COX-2

Interações π	distância (Å)
CH... π : ALA527:HA – Ct1	3,62
CH... π : SER353:O – Ct2	4,07
CH... π : VAL523:HG23 – Ct2	3,06
CH... π : VAL523:HG22 – Ct2	2,53

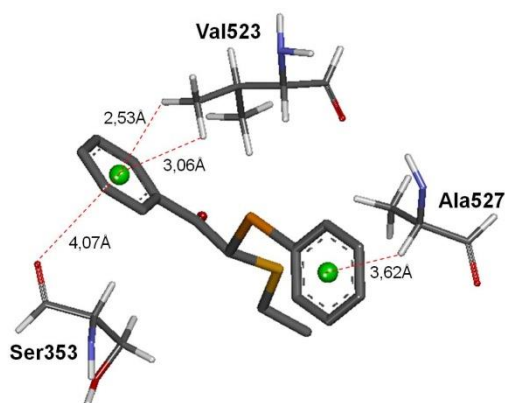


Figura 3.3.26. Interações do tipo C-H... π com os aminoácidos Val523 e Ala527 e do tipo O... π com Ser353. Os Hidrogênios foram omitidos para facilitar a visualização.

3.3.3.25 LIGANTE 13R_S_CH₃ DA FAMÍLIA PRO

Tabela 3.3.27 – Interações π do ligante 13r_S_CH₃ com a enzima COX-2

Interações π	distância (Å)
CH... π : LEU352:HD23 – Ct1	3,68
CH... π : VAL523:O – Ct1	4,32
CH... π : VAL523:HG13 – Ct2	4,07
NH... π : ARG10:HH12 – Ct2	3,64

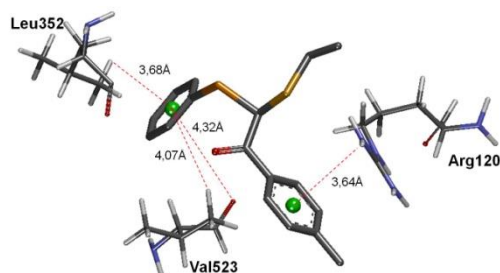


Figura 3.3.27. Interações do tipo C-H... π com os aminoácidos Val523 e Leu352, do tipo N-H... π com Arg120 e do tipo O... π com Val523. Os Hidrogênios foram omitidos para facilitar a visualização.

3.3.3.26 LIGANTE 13s_S_CH₃ DA FAMÍLIA PRO

Tabela 3.3.28 – Interações π do ligante 13s_S_CH₃ com a enzima COX-2

Interações π	distância (Å)
CH... π : GLY526:O – Ct12	4,21
CH... π : ALA527: N – Ct1	4,04
CH... π : LEU52: HD23 – Ct1	3,54
CH... π : VAL523: HG11 – Ct2	2,85
CH... π : VAL523: HG23 – Ct2	3,26
CH... π :SER353: HA – Ct2	2,72
CH... π : SER353: O – Ct2	4,30

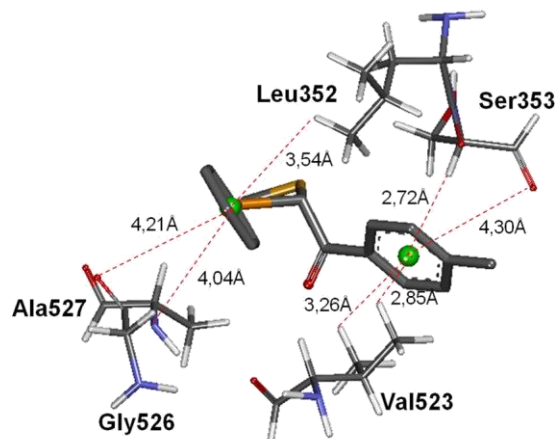


Figura 3.3.28. Interações do tipo C-H... π com os aminoácidos Val523, Leu52 e Ser353, do tipo N... π com Ala527 e do tipo O... π com Ser353 e Gly526. Os Hidrogênios foram omitidos para facilitar a visualização.

3.3.3.27 LIGANTE 14r_S_NO₂ DA FAMÍLIA PRO

Tabela 3.3.29 – Interações π do ligante 14r_S_NO₂ com a enzima COX-2

Interações π	distância (Å)
CH... π : TYR355:HH – Ct1	3,66
CH... π : ARG120:NH1 – Ct1	4,07
CH... π : ARG120:HH11 – Ct1	3,23
CH... π : VAL349:HG11 – Ct1	3,54
CH... π : VAL349:HG12 – Ct1	3,17
CH... π : TRP387:HH2 – Ct2	3,73
CH... π : LEU52:HD22 – Ct2	3,33
CH... π :ALA527:N – Ct2	4,42

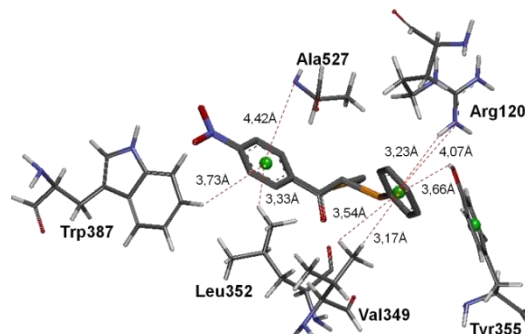


Figura 3.3.29. Interações do tipo C-H... π com os aminoácidos Val349, Leu52, Arg120, Trp387 e Tyr355, do tipo N... π com Ala527 e do tipo N-H... π com Arg120. Os Hidrogênios foram omitidos para facilitar a visualização.

3.3.28 LIGANTE 14s_S_NO₂ DA FAMÍLIA PRO

Tabela 3.3.30 – Interações π do ligante 14s_S_NO₂ com a enzima COX-2

Interações π	distância (Å)
CH... π : SER353:HA – Ct1	4,02
CH... π : SER353:O – Ct1	2,62
CH... π : VAL523:HG11 – Ct1	3,06
CH... π : VAL523:HG12 – Ct1	3,04
CH... π : ALA527:N – Ct2	3,89

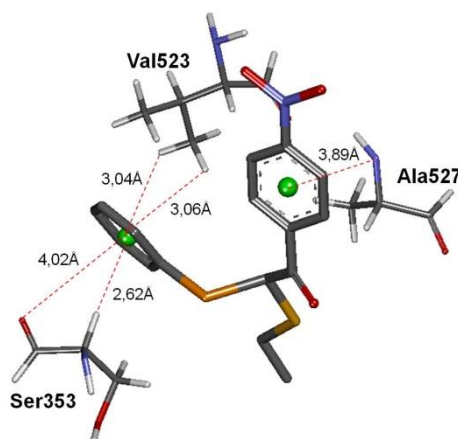


Figura 3.3.30. Apresentação das interações do tipo C-H... π com os aminoácidos Val523 e Ser353, do tipo N... π com Ala527 e do tipo O... π com Ser353. Os Hidrogênios foram omitidos para facilitar a visualização.

3.3.29 LIGANTE 15r_S_OCH₃ DA FAMÍLIA PRO

Tabela 3.3.31 – Interações π do ligante 15r_S_OCH₃ com a enzima COX-2

Interações π	distância (Å)
CH... π : :GLY526:O – Ct1	3,65
CH... π : VAL523:HG11 – Ct2	3,47
CH... π : VAL523:HG12 – Ct2	3,48
CH... π : SER353:N – Ct2	4,09

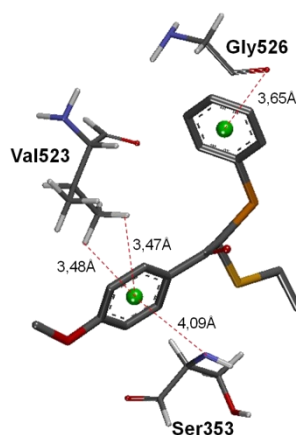


Figura 3.3.31. Apresentação das interações do tipo C-H... π com os aminoácidos Val523, do tipo N... π com Ser353 e do tipo O... π com Gly526. Os Hidrogênios foram omitidos para facilitar a visualização.

3.3.3.30 LIGANTE 15s_S_OCH₃ DA FAMÍLIA PRO

Tabela 3.3.32 – Interações π do ligante 15s_S_OCH₃ com a enzima COX-2

Interações π	distância (Å)
CH... π : GLY526:O – Ct1	4,09
CH... π : VAL523:HG12 – Ct2	3,15
CH... π : SER353:HA – Ct2	2,51
CH... π : SER353:N – Ct2	4,40
CH... π : ARG513:NH1 – Ct2	4,50

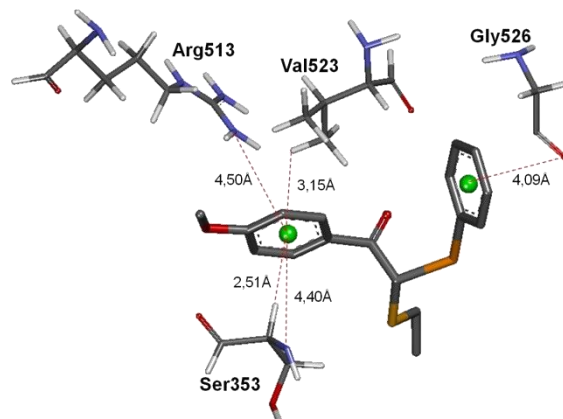


Figura 3.3.32. Apresentação das interações do tipo C-H... π com os aminoácidos Val523 e Ser353, do tipo N... π com Ser353, do tipo N-H... π com Arg513 e do tipo O... π com Gly526. Os Hidrogênios foram omitidos para facilitar a visualização.

3.3.4 INTERAÇÕES π DO COMPLEXO CRISTALOGRÁFICO CELECOXIB-COX-1 (CÓDIGO PDB 3KK6)

Tabela 3.3.33 – Interações π do ligante cristalográfico com a enzima COX-1 (3KK6)

Interações π	distância (Å)
CH... π : LEU352:HD23 – Ct1	3,34
CH... π : ILE523:HG21 – Ct1	2,86
CH... π : SER353:HA – Ct1	2,27
CH... π : ALA527:HA – Ct2	3,20
CH... π : VAL349:HG13 – Ct3	3,07

Ct = centroide

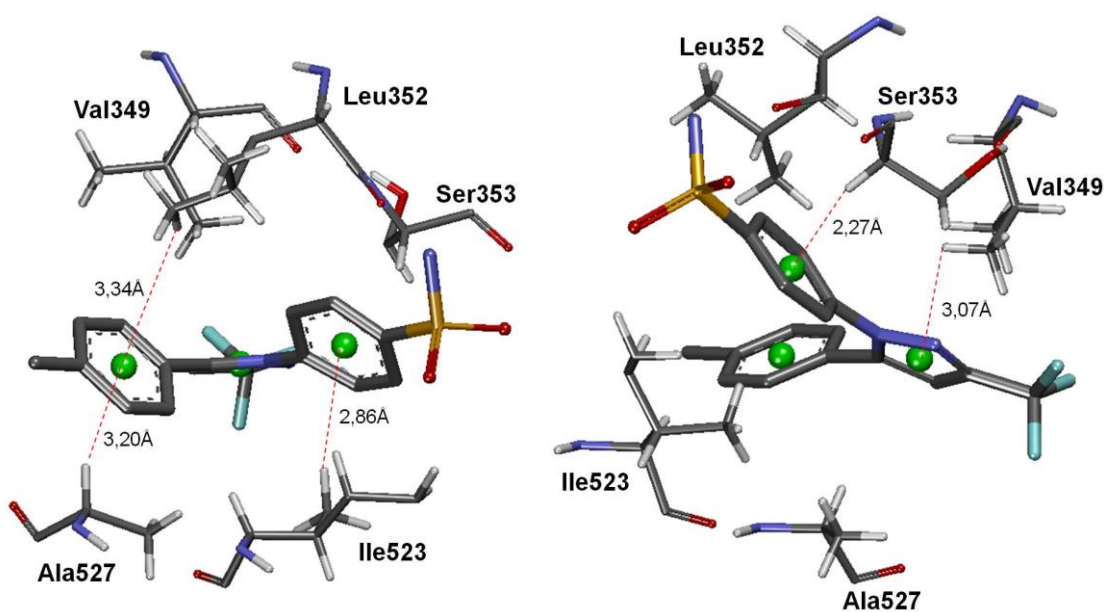


Figura 3.3.33. Interações do tipo C-H... π com os aminoácidos Val349, Ser339, Ala513, Leu338 e Val335 e do tipo N... π com Ala513. Os Hidrogênios do ligante foram omitidos para facilitar a visualização.

3.3.5 INTERAÇÕES π DO LIGANTE SC-558 COM A ENZIMA COX-1 (CÓDIGO PDB 1CX2)

Tabela 3.3.34 – Interações π do ligante SC-558 com a enzima COX-1

Interações π	distância (Å)
CH... π : SER353:HA – Ct1	2,62
CH... π : ILE523:HG21 – Ct1	2,56
CH... π : LEU352:HD21 – Ct2	3,41
CH... π : ALA527:N – Ct2	3,80
CH... π : ALA527:HB2 – Ct3	3,70
CH... π : SER353:HB2 – Ct3	3,35

Ct = centroide

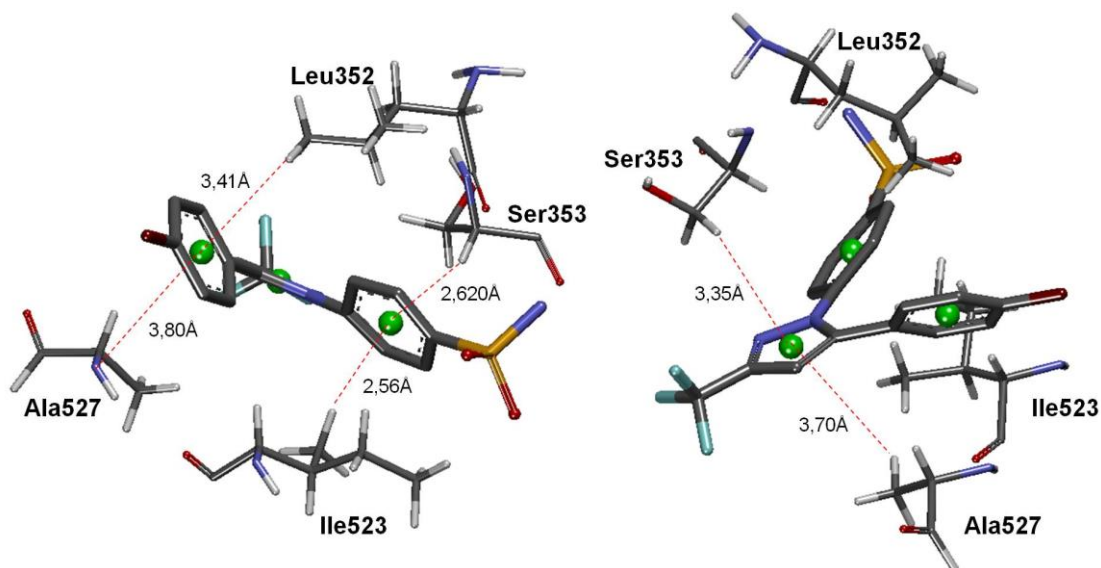


Figura 3.3.34. Interações do tipo C-H... π com os aminoácidos Ala527, Leu352, Ser353 e Ile523 e do tipo N... π com Ala527. Os Hidrogênios do ligante foram omitidos para facilitar a visualização.

3.3.6 INTERAÇÕES π DOS COMPLEXOS DA FAMÍLIA PRO COM A ENZIMA COX-1

3.3.6.1 LIGANTE 1R_SO₂_BR DA FAMÍLIA PRO

Tabela 3.3.35 – Interações π do ligante 1r_SO₂_Br com a enzima COX-1

Interações π	distância (Å)
CH... π : ILE523: HG12 – Ct1	2,96
CH... π : ILE523: HG21 – Ct1	3,20
CH... π : LEU352: O – Ct1	3,28
CH... π : ALA527: N – Ct2	3,41
CH... π : ALA527: H – Ct2	3,72
CH... π : LEU352: HD21 – Ct2	3,79

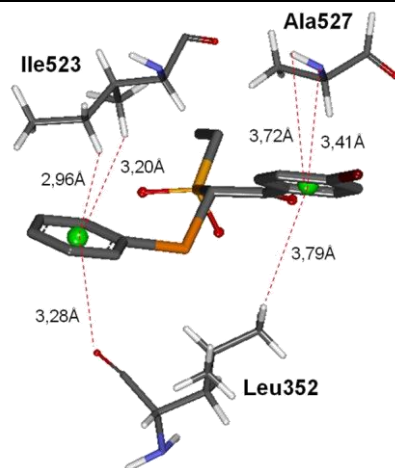


Figura 3.3.35. Interações do tipo C-H... π com os aminoácidos Ile523 e Leu352, do tipo N... π e N-H... π com Ala527 e do tipo O... π com Leu352. Os Hidrogênios foram omitidos para facilitar a visualização.

3.3.6.2 LIGANTE 1s_SO₂_BR DA FAMÍLIA PRO

Tabela 3.3.36 – Interações π do ligante 1s_SO₂_Br com a enzima COX-1

Interações π	distância (Å)
CH... π : SER353:O – Ct1	4,16
CH... π : SER353:N – Ct1	4,46
CH... π : ILE523:HG12 – Ct1	2,96
CH... π : LEU352: HD21 – Ct2	3,10
CH... π : ALA527: HA – Ct2	3,64
CH... π : ALA527: N – Ct2	4,14
CH... π : GLY526: O – Ct2	4,24

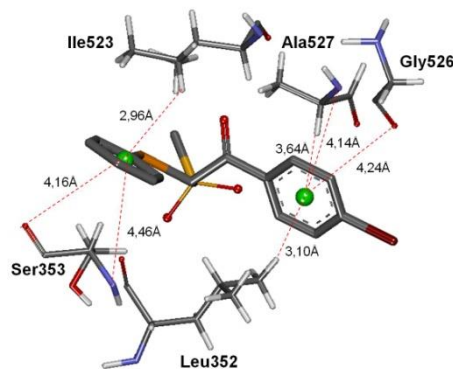


Figura 3.3.36. Interações do tipo C-H... π com os aminoácidos Ile523, Ala527 e Leu352, do tipo N... π e N-H... π com Ala527 e Ser353 e do tipo O... π com Ser353 e Gly526. Os Hidrogênios foram omitidos para facilitar a visualização.

3.3.6.3 LIGANTE 2R_SO₂_H DA FAMÍLIA PRO

Tabela 3.3.37 – Interações π do ligante 2r_SO₂_H com a enzima COX-1

Interações π	distância (Å)
CH... π : ALA527: N – Ct1	3,89
CH... π : GLY526: O – Ct1	4,00
CH... π : GLY526: HA – Ct1	3,07
CH... π : LEU352: HD21 – Ct1	3,41
CH... π : SER353:N – Ct2	4,16
CH... π : ILE523:HG12- Ct2	3,03

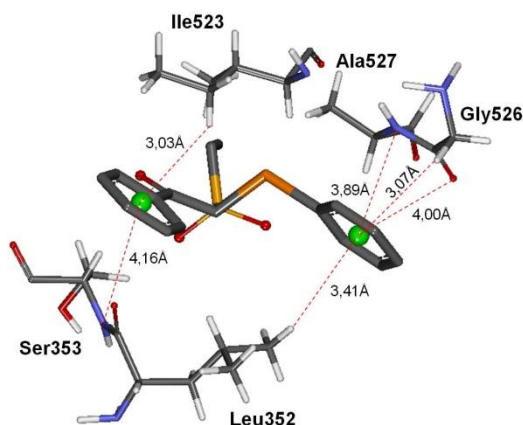


Figura 3.3.37. Apresentação das interações do tipo C-H... π com os aminoácidos Ile523, Gly526 e Leu352, do tipo N... π com Ala527 e Ser353 e do tipo O... π com Gly526. Os Hidrogênios foram omitidos para facilitar a visualização.

3.3.6.4 LIGANTE 2s_SO₂_H DA FAMÍLIA PRO

Tabela 3.3.38 – Interações π do ligante 2s_SO₂_H com a enzima COX-1

Interações π	distância (Å)
CH... π : SER353:O – Ct1	4,04
CH... π : SER353:N – Ct1	4,28
CH... π : ILE523:HG23 – Ct1	3,08
CH... π : LEU352: HD21 – Ct2	2,84
CH... π : LEU352: HD23 – Ct2	2,83
CH... π : ALA527: N – Ct2	4,36

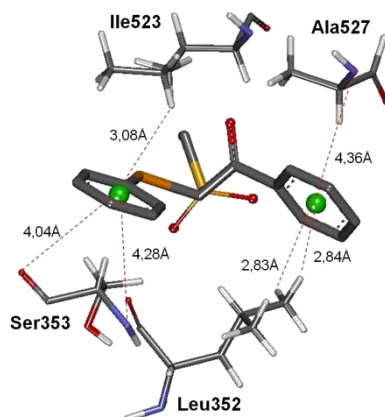


Figura 3.3.38. Apresentação das interações do tipo C-H... π com os aminoácidos Ile523 e Leu352, do tipo N... π com Ala527 e Ser353 e do tipo O... π com Gly526. Os Hidrogênios foram omitidos para facilitar a visualização.

3.3.6.5 LIGANTE 3R_SO₂_CH₃ DA FAMÍLIA PRO

Tabela 3.3.39 – Interações π do ligante 3r_SO₂_CH₃ com a enzima COX-1

Interações π	distância (Å)
CH... π : LEU352: O – Ct1	3,21
CH... π : ILE523: HG12 – Ct1	2,94
CH... π : LEU352: HD21 – Ct2	3,77
CH... π : ALA527: N – Ct2	3,48
CH... π : GLYL526: Ct2 – O	3,47

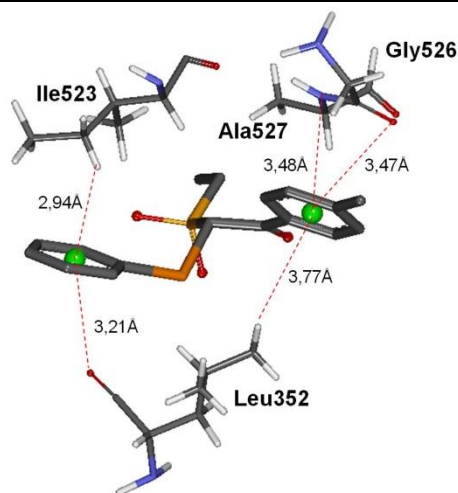


Figura 3.3.39. Representação das interações: do tipo C-H... π com os aminoácidos Ile523e Leu352, do tipo N... π com Ala527 e do tipo O... π com Gly526 e Ser353. Os Hidrogênios foram omitidos para facilitar a visualização.

3.3.6.6 LIGANTE 3S_SO₂_CH₃ DA FAMÍLIA PRO

Tabela 3.3.40 – Interações π do ligante 3s_SO₂_CH₃ com a enzima COX-1

Interações π	distância (Å)
CH... π : SER353:O – Ct1	4,32
CH... π : ILE523:HG12 – Ct1	2,86
CH... π : LEU352: HD21 – Ct2	3,21
CH... π : LEU352: HD23 – Ct2	3,28
CH... π : GLY526: O – Ct2	4,10
CH... π : ALA527: HA – Ct2	3,60
CH... π : ALA527: N – Ct2	3,98

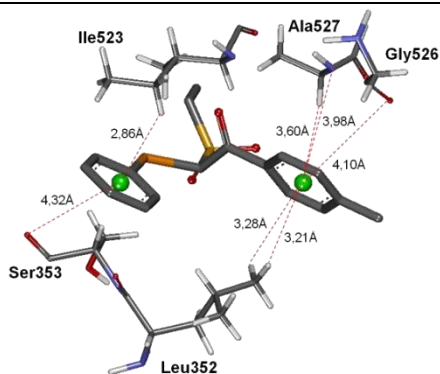


Figura 3.3.40. Representação das interações: do tipo C-H... π com os aminoácidos Ile523, Ala527 e Leu352, do tipo N... π com Ala527 e do tipo O... π com Gly526 e Ser353. Os Hidrogênios foram omitidos para facilitar a visualização.

3.3.6.7 LIGANTE 4R_SO₂_NO₂ DA FAMÍLIA PRO

Tabela 3.3.41 – Interações π do ligante 4r_SO₂_NO₂ com a enzima COX-1

Interações π	distância (Å)
CH... π : ALA527: N – Ct1	3,91
CH... π : GLY526: HA – Ct1	3,30
CH... π : GLY526: O – Ct1	4,02
CH... π : LEU352: HD21 – Ct1	3,30
CH... π : LEU352: HD23 – Ct1	3,64
CH... π : ILE523: HG12 – Ct2	2,90
CH... π : SER353: O – Ct2	4,23

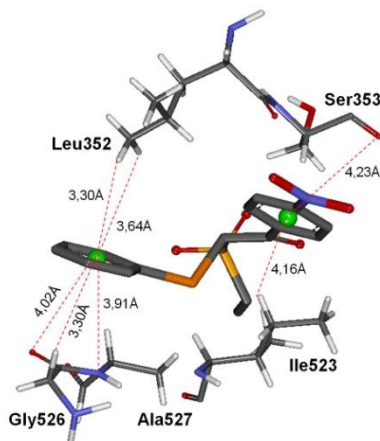


Figura 3.3.41. Interações do tipo C-H... π com os aminoácidos Ile523, Gly526 e Leu352, do tipo N... π com Ala527 e do tipo O... π com Gly526 e Ser353. Os Hidrogênios foram omitidos para facilitar a visualização.

3.3.6.8 LIGANTE 4S_SO₂_NO₂ DA FAMÍLIA PRO

Tabela 3.3.42 – Interações π do ligante 4s_SO₂_NO₂ com a enzima COX-1

Interações π	distância (Å)
CH... π : ILE523:HG12 – Ct1	2,96
CH... π : LEU352: HD21 - Ct2	3,34
CH... π : ALA527: HA – Ct2	3,36
CH... π : GLY526 : O – Ct2	4,14

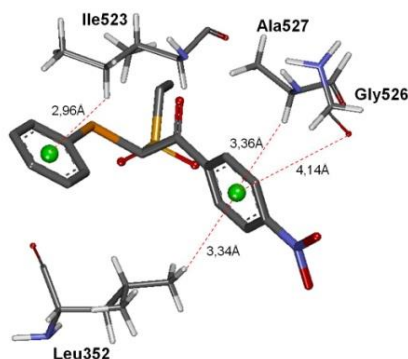


Figura 3.3.42. Interações do tipo C-H... π com os aminoácidos Ile523, Ala527 e Leu352, do tipo N... π com Ala527 e do tipo O... π com Gly526. Os Hidrogênios foram omitidos para facilitar a visualização.

3.3.6.9 LIGANTE 5R_SO₂_OCH₃ DA FAMÍLIA PRO

Tabela 3.3.43 – Interações π do ligante 5r_SO₂_OCH₃ com a enzima COX-1

Interações π	distância (Å)
CH... π : ILE523:HG12 – Ct1	3,07
CH... π : ILE523: HG21 – Ct1	2,99
CH... π : SER353: N – Ct1	4,25
CH... π : SER353: HA – Ct1	2,56
CH... π : SER353: O – Ct1	3,96
CH... π : ALA527: N – Ct2	3,50
CH... π : LEU352: HD21 – Ct2	3,69
CH... π : LEU352: HD23 – Ct2	3,76

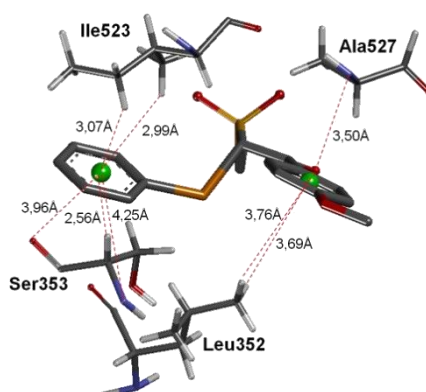


Figura 3.3.43. Interações do tipo C-H... π com os aminoácidos Ile523, Ser353 e Leu352, do tipo N... π com Ala527 e Ser353 e do tipo O... π com Ser353. Os Hidrogênios foram omitidos para facilitar a visualização.

3.3.6.10 LIGANTE 5s_SO₂_OCH₃ DA FAMÍLIA PRO

Tabela 3.3.44 – Interações π do ligante 5s_SO₂_OCH₃ com a enzima COX-1

Interações π	distância (Å)
CH... π : SER353:O – Ct1	4,15
CH... π : ILE523:HG12 – Ct1	2,99
CH... π : LEU352:HD23 – Ct2	3,40
CH... π : LEU352:HD21 – Ct2	3,29
CH... π : ALA527:N – Ct2	3,88
CH... π : GLY526:HA – Ct2	3,72

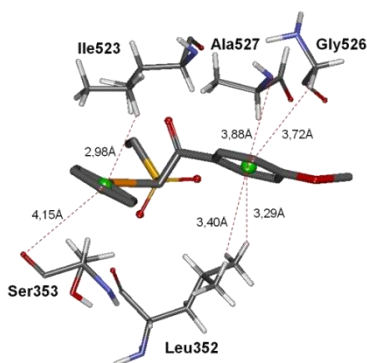


Figura 3.3.44. Interações do tipo C-H... π com os aminoácidos Ile523, Gly526 e Leu352, do tipo N... π com Ala527 e do tipo O... π com Ser353. Os Hidrogênios foram omitidos para facilitar a visualização.

3.3.6.11 LIGANTE 6R_SO_BR DA FAMÍLIA PRO

Tabela 3.3.45 – Interações π do ligante 6r_SO_Br com a enzima COX-1

Interações π	distância (Å)
CH... π : ILE523:HG12 – Ct1	2,89
CH... π : SER353:O – Ct1	4,18
CH... π : ALA527:N – Ct2	3,61
CH... π : LEU352:HD21 – Ct2	3,67

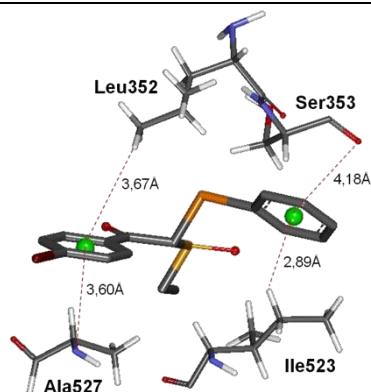


Figura 3.3.45. Apresentação das interações do tipo C-H... π com os aminoácidos Ile523 e Leu352, do tipo N... π com Ala527 e do tipo O... π com Ser353. Os Hidrogênios foram omitidos para facilitar a visualização.

3.3.6.12 LIGANTE 6S_SO_BR DA FAMÍLIA PRO

Tabela 3.3.46 – Interações π do ligante 6s_SO_Br com a enzima COX-1

Interações π	distância (Å)
CH... π : ILE523:HG12 – Ct1	2,93
CH... π : LEU352:HD23 – Ct2	3,08
CH... π : LEU352:HD21 – Ct2	3,10
CH... π : ALA527:HA – Ct2	3,65
CH... π : ALA527:N – Ct2	4,14
CH... π : GLY526:O – Ct2	4,22

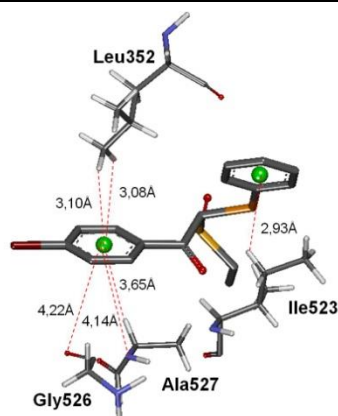


Figura 3.3.46. Apresentação das interações do tipo C-H... π com os aminoácidos Ile523, Ala527 e Leu352, do tipo N... π com Ala527 e do tipo O... π com Gly526. Os Hidrogênios foram omitidos para facilitar a visualização.

3.3.6.13 LIGANTE 7r_SO_H DA FAMÍLIA PRO

Tabela 3.3.47 – Interações π do ligante 7r_SO_H com a enzima COX-1

Interações π	distância (Å)
CH... π : ILE523:HG12 – Ct1	3,09
CH... π : ILE523:HD12 – Ct1	3,51
CH... π : SER353: N – Ct1	4,23
CH... π : SER353: HA – Ct1	2,72
CH... π : LEU352: HD21 – Ct2	3,64
CH... π : ALA527: N – Ct2	3,91
CH... π : GLY526: O – Ct2	3,60
CH... π : GLY526: HA – Ct2	3,02

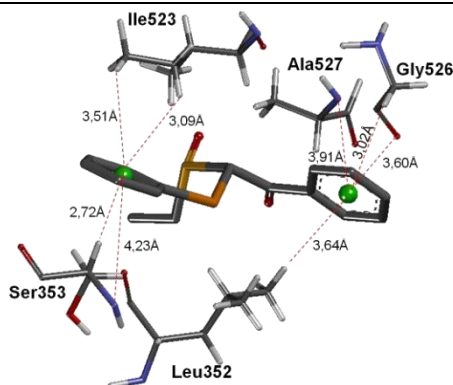


Figura 3.3.47. Apresentação das interações do tipo C-H... π com os aminoácidos Ile523, Gly526 e Leu352, do tipo N... π com Ala527 e Ser353, e do tipo O... π com Gly526. Os Hidrogênios foram omitidos para facilitar a visualização.

3.3.6.14 LIGANTE 7s_SO_H DA FAMÍLIA PRO

Tabela 3.3.48 – Interações π do ligante 7s_SO_H com a enzima COX-1

Interações π	distância (Å)
CH... π : SER353:HA – Ct1	2,66
CH... π : SER353:O – Ct1	4,18
CH... π : SER353:N – Ct1	4,15
CH... π : ILE523:HG12 – Ct1	2,98
CH... π : LEU352:HD21 – Ct2	3,15
CH... π : LEU352:HD23 – Ct2	3,50
CH... π : GLY526: O – Ct2	4,12
CH... π : GLY526: HA – Ct2	3,44
CH... π : ALA527: N – Ct2	4,06

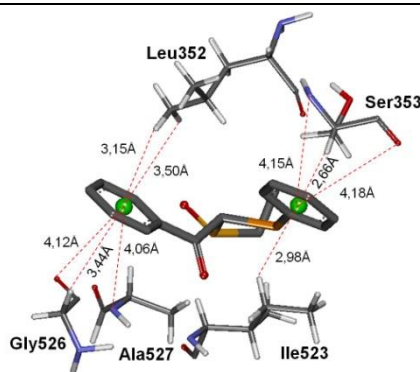


Figura 3.3.48. Apresentação das interações do tipo C-H... π com os aminoácidos Ile523, Gly526, Ser353 e Leu352, do tipo N... π com Ala527 e Ser353, e do tipo O... π com Gly526 e Ser353. Os Hidrogênios foram omitidos para facilitar a visualização.

3.3.6.15 LIGANTE 8r_SO_CH₃ DA FAMÍLIA PRO

Tabela 3.3.49 – Interações π do ligante 8r_SO_CH₃ com a enzima COX-1

Interações π	distância (Å)
CH... π : ILE523: HG12 – Ct2	2,91
CH... π : SER353: O – Ct2	4,27
CH... π : ALA527: N – Ct1	4,15
CH... π : ALA527: HA – Ct1	3,73
CH... π : GLY526: O – Ct1	4,29
CH... π : LEU352: HD21 – Ct1	3,04

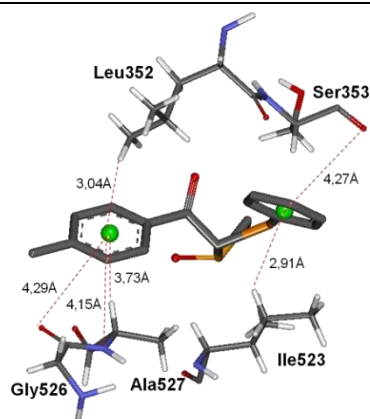


Figura 3.3.49. Apresentação das interações do tipo C-H... π com os aminoácidos Ile523, Ala527, Ser353 e Leu352, do tipo N... π com Ala527 e do tipo O... π com Gly526 e Ser353. Os Hidrogênios foram omitidos para facilitar a visualização.

3.3.6.16 LIGANTE 8s_SO_CH₃ DA FAMÍLIA PRO

Tabela 3.3.50 – Interações π do ligante 8s_SO_CH₃ com a enzima COX-1

Interações π	distância (Å)
CH... π : SER353:O – Ct1	4,16
CH... π : ILE523:HG12 – Ct1	2,99
CH... π : LEU352:HD23 – Ct2	3,09
CH... π : LEU352:HD21 – Ct2	3,27
CH... π : ALA527:HA – Ct2	3,42
CH... π : ALA527:N – Ct2	4,05
CH... π : GLY526:O – Ct2	4,23

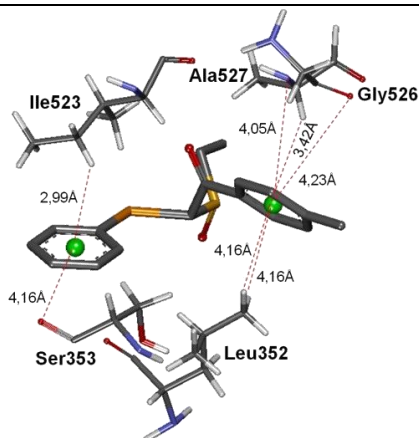











Figura 3.3.50. Apresentação das interações do tipo C-H... π com os aminoácidos Ile523, Ala527 e Leu352, do tipo N... π com Ala527 e do tipo O... π com Gly526 e Ser353. Os Hidrogênios foram omitidos para facilitar a visualização.

3.3.6.17 LIGANTE 9R_SO_NO₂ DA FAMÍLIA PRO

Tabela 3.3.51 – Interações π do ligante 9r_SO_NO₂ com a enzima COX-1

Interações 	distância (Å)
CH...  ILE523: HG12 – Ct1	3,04
CH...  ILE523:HD12 – Ct1	3,44
CH...  SER353: N – Ct1	4,30
CH...  SER353: HA – Ct1	2,79
CH...  LEU352: HD21 – Ct2	3,74
CH...  ALA527: N – Ct2	3,77
CH...  GLY526: HA – Ct2	2,84
CH...  GLY526: O – Ct2	3,54

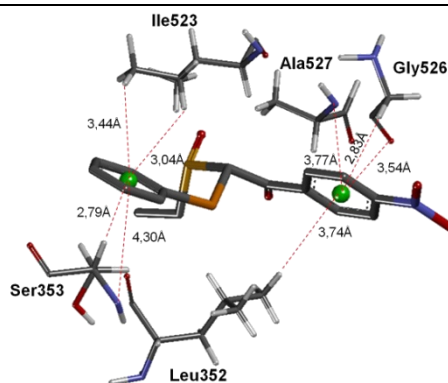









Figura 3.3.51. Interações do tipo C-H... π com os aminoácidos Ile523, Gly526, Ser353 e Leu352, do tipo N... π com Ala527 e Ser353 e do tipo O... π com Gly526. Os Hidrogênios foram omitidos para facilitar a visualização.

3.3.6.18 LIGANTE 9S_SO_NO₂ DA FAMÍLIA PRO

Tabela 3.3.52 – Interações π do ligante 9s_SO_NO₂ com a enzima COX-1

Interações 	distância (Å)
CH...  ILE523:HG12 – Ct1	2,94
CH...  LEU352:HD21 – Ct2	3,11
CH...  LEU352:HD23 – Ct2	3,13
CH...  ALA527: HA – Ct2	3,65
CH...  ALA527: N – Ct2	4,10
CH...  GLY526: O – Ct2	4,21

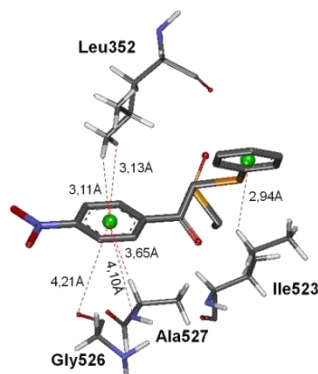









Figura 3.3.52. Interações do tipo C-H... π com os aminoácidos Ile523, Ala527 e Leu352, do tipo N... π com Ala527 e do tipo O... π com Gly526. Os Hidrogênios foram omitidos para facilitar a visualização.

3.6.19 LIGANTE 10R_SO_OCH₃ DA FAMÍLIA PRO

Tabela 3.3.53 – Interações π do ligante 10r_SO_OCH₃ com a enzima COX-1

Interações 	distância (Å)
CH...  ILE523:HG12 – Ct1	2,91
CH...  SER353: O – Ct1	4,19
CH...  ALA527: N – Ct2	4,03
CH...  ALA527: HA – Ct2	3,69
CH...  LEU352: HD23 – Ct1	3,18
CH...  LEU352: HD21 – Ct1	3,15

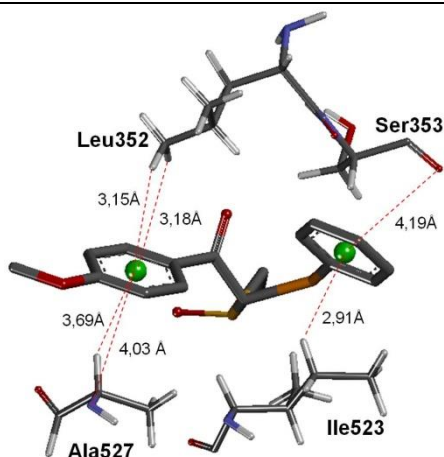







Figura 3.3.53. Interações do tipo C-H... π com os aminoácidos Ile523, Ala527 e Ser353, do tipo N... π com Ala527 e do tipo O... π com Ser353. Os Hidrogênios foram omitidos para facilitar a visualização.

3.3.6.20 LIGANTE 10S_SO_OCH₃ DA FAMÍLIA PRO

Tabela 3.3.54 – Interações π do ligante 10s_SO_OCH₃ com a enzima COX-1

Interações 	distância (Å)
CH...  SER353:O – Ct1	4,09
CH...  ILE523:HG12 – Ct1	3,00
CH...  LEU352: HD23 – Ct2	3,62
CH...  ALA527: HA – Ct2	2,68

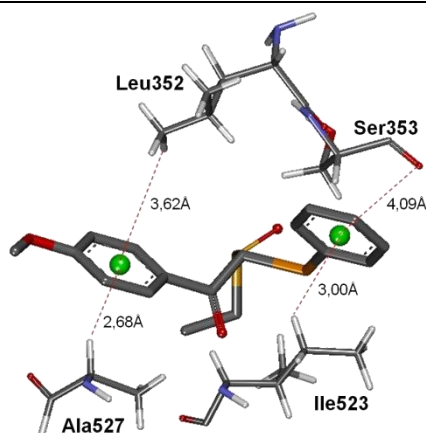










Figura 3.3.54. Interações do tipo C-H... π com os aminoácidos Ile523, Ala527 e Ser353, e do tipo O... π com Ser353. Os Hidrogênios foram omitidos para facilitar a visualização.

3.3.6.21 LIGANTE 11R_S_BR DA FAMÍLIA PRO

Tabela 3.3.55 – Interações π do ligante 11r_S_Br com a enzima COX-1

Interações 	distância (Å)
CH...  ILE523: HG12 – Ct1	2,91
CH...  SER353: O – Ct1	4,23
CH...  ALA527: N – Ct2	4,09
CH...  ALA527: HA – Ct2	3,57
CH...  LEU352: HD21 – Ct2	3,15
CH...  LEU352: HD23 – Ct2	3,09
CH...  GLY526: O – Ct2	4,23

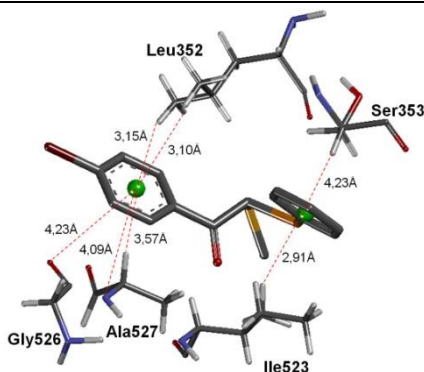








Figura 3.3.55. Interações do tipo C-H... π com os aminoácidos Ile523, Ala527 e Leu352, do tipo N... π com Ala527 e do tipo O... π com Ser353 e Gly526. Os Hidrogênios foram omitidos para facilitar a visualização.

3.3.6.22 LIGANTE 11S_S_BR DA FAMÍLIA PRO

Tabela 3.3.56 – Interações π do ligante 11s_S_Br com a enzima COX-1

Interações 	distância (Å)
CH...  SER353:O – Ct1	3,02
CH...  ILE523:HG12 – Ct1	4,07
CH...  LEU352:HD23 – Ct2	3,74
CH...  LEU352: HD21 – Ct2	3,56
CH...  ALA527: N – Ct2	3,72
CH...  GLY526: O – Ct2	3,63

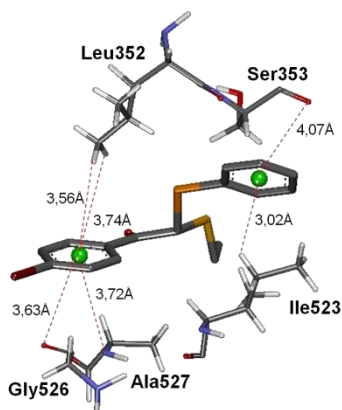












Figura 3.3.56. Interações do tipo C-H... π com os aminoácidos Ile52 e Leu352, do tipo N... π com Ala527 e do tipo O... π com Ser353 e Gly526. Os Hidrogênios foram omitidos para facilitar a visualização.

3.3.6.23 LIGANTE 12R_S_H DA FAMÍLIA PRO

Tabela 3.3.57 – Interações π do ligante 12r_S_H com a enzima COX-1

Interações 	distância (Å)
CH...  ILE523: HG12 – Ct1	2,87
CH...  SER353:O – Ct1	4,28
CH...  SER353:N – Ct1	4,26
CH...  SER353:HA – Ct1	2,79
CH...  ALA527: N – Ct2	3,88
CH...  LEU352: HD21 – Ct2	3,31
CH...  LEU352: HD231 – Ct2	3,62
CH...  GLY526: O – Ct2	4,03
CH...  GLY526: HA – Ct2	3,33

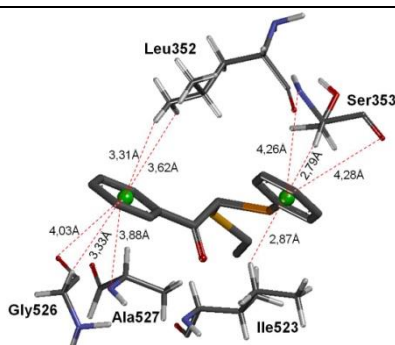










Figura 3.3.57. Interações do tipo C-H... π com os aminoácidos Ile523, Ser353, Gly526 e Leu352, do tipo N... π com Ala527 e Ser353, e do tipo O... π com Ser353 e Gly526. Os Hidrogênios foram omitidos para facilitar a visualização.

3.3.6.24 LIGANTE 12S_S_H DA FAMÍLIA PRO

Tabela 3.3.58 – Interações π do ligante 12r_S_H com a enzima COX-1

Interações 	distância (Å)
CH...  SER353:HA – Ct1	2,86
CH...  SER353:O – Ct1	4,10
CH...  SER353:N – Ct1	4,36
CH...  ILE523:HG12 – Ct1	2,98
CH...  GLY526: HA2 – Ct2	2,81
CH...  ALA527: N – Ct2	3,79
CH...  LEU352: HD21 – Ct2	3,70

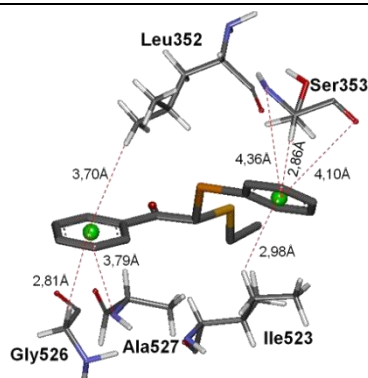


Figura 3.3.58. Interações do tipo C-H... π com os aminoácidos Ile523, Ser353, Gly526 e Leu352, do tipo N... π com Ala527 e Ser353, e do tipo O... π com Ser353. Os Hidrogênios foram omitidos para facilitar a visualização.

3.3.6.25 LIGANTE 13R_S_CH₃ DA FAMÍLIA PRO

Tabela 3.3.59 – Interações π do ligante 13r_S_CH₃ com a enzima COX-1

Interações π	distância (Å)
CH... π : ILE523: HG12 – Ct1	3,05
CH... π : SER353: N – Ct1	4,20
CH... π : ALA527: N – Ct2	3,75
CH... π : LEU352: HD21 – Ct2	3,47
CH... π : LEU352: HD23 – Ct2	3,74
CH... π : GLY526: O – Ct2	3,78

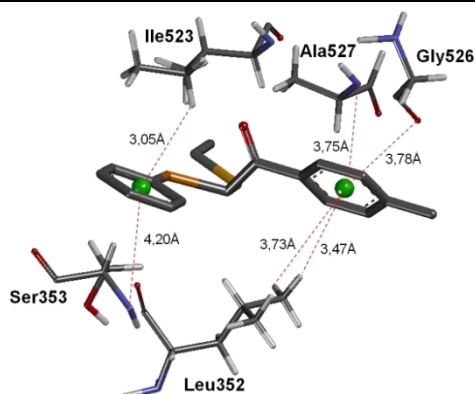


Figura 3.3.59. Interações do tipo C-H... π com os aminoácidos Ile523 e Leu352, do tipo N... π com Ala527 e Ser353, e do tipo O... π com Gly526. Os Hidrogênios foram omitidos para facilitar a visualização.

3.3.6.26 LIGANTE 13s_S_CH₃ DA FAMÍLIA PRO

Tabela 3.3.60– Interações π do ligante 13s_S_CH₃ com a enzima COX-1

Interações π	distância (Å)
CH... π : SER353:HA – Ct1	2,66
CH... π : SER353:O – Ct1	4,05
CH... π : SER353:N – Ct1	4,27
CH... π : ILE523:HG12 – Ct1	2,99
CH... π : LEU352: HD23 – Ct2	3,77
CH... π : LEU352: HD21 – Ct2	3,77
CH... π : GLY526: O – Ct2	3,48

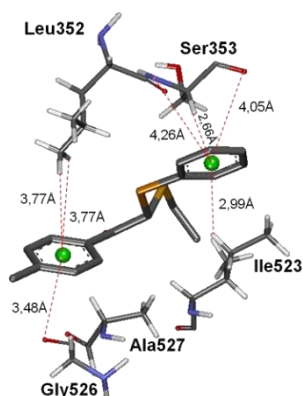


Figura 3.3.60. Interações do tipo C-H... π com os aminoácidos Ile523, Ser353 e Leu352, do tipo N... π com Ser353, e do tipo O... π com Ser353 e Gly526. Os Hidrogênios foram omitidos para facilitar a visualização.

3.3.6.27 LIGANTE 14R_S_NO₂ DA FAMÍLIA PRO

Tabela 3.3.61 – Interações π do ligante 14r_S_NO₂ com a enzima COX-1

Interações π	distância (Å)
CH... π : ALA527: N – Ct1	3,64
CH... π : GLY526: HA – Ct1	3,09
CH... π : LEU352: HD21 – Ct1	3,56
CH... π : ILE523: HG12 – Ct2	3,13
CH... π : SER353: O – Ct2	3,92
CH... π : SER353: N – Ct2	4,14

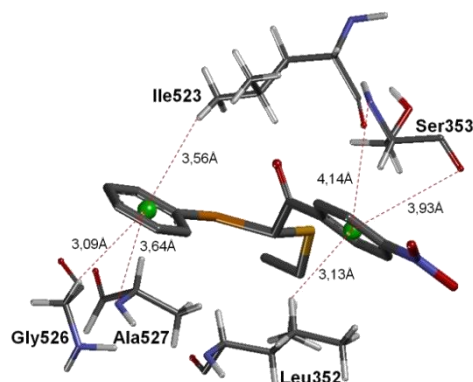


Figura 3.3.61. Interações do tipo C-H... π com os aminoácidos Ile523, Gly526 e Leu352, do tipo N... π com Ala527 e Ser353, e do tipo O... π com Ser353. Os Hidrogênios foram omitidos para facilitar a visualização.

3.3.6.28 LIGANTE 14S_S_NO₂ DA FAMÍLIA PRO

Tabela 3.3.62 – Interações π do ligante 14s_S_NO₂ com a enzima COX-1

Interações π	distância (Å)
CH... π : SER353:HA – Ct1	2,81
CH... π : SER353:O – Ct1	4,05
CH... π : SER353:N – Ct1	4,32
CH... π : ILE523:HG12 – Ct1	2,99
CH... π : ALA527: N – Ct2	3,63
CH... π : GLY526: O – Ct2	3,52
CH... π : LEU352: HD21 – Ct2	3,74

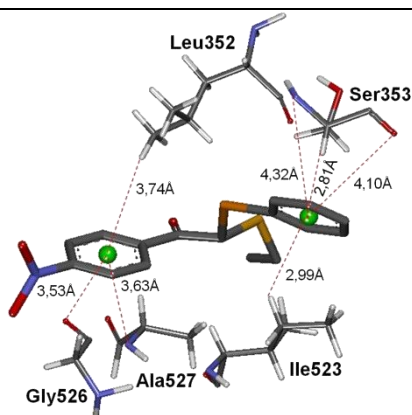


Figura 3.3.62. Interações do tipo C-H... π com os aminoácidos Ile523, Ser353 e Leu352, do tipo N... π com Ala527 e Ser353, e do tipo O... π com Ser353 e Gly526. Os Hidrogênios foram omitidos para facilitar a visualização.

3.3.6.29 LIGANTE 15R_S_OCH₃ DA FAMÍLIA PRO

Tabela 3.3.63 – Interações π do ligante 15r_s_oCH₃ com a enzima COX-1

Interações π	distância (Å)
CH... π : ILE523: HG12 – Ct1	2,96
CH... π : SER353: O – Ct1	4,20
CH... π : ALA527: N – Ct2	3,71
CH... π : ALA527: HA – Ct2	3,14
CH... π : LEU352: HD21 – Ct2	3,57
CH... π : LEU352: HD23 – Ct2	3,42
H... π : GLY526: O – Ct2	3,97

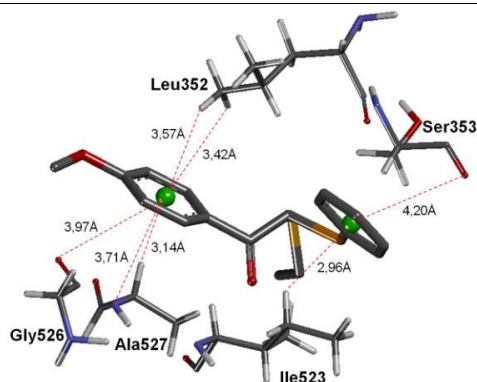


Figura 3.3.63. Interações do tipo C-H... π com os aminoácidos Ile523, Ala527 e Leu352, do tipo N... π com Ala527, e do tipo O... π com Ser353 e Gly526. Os Hidrogênios foram omitidos para facilitar a visualização.

3.3.6.30 LIGANTE 15s_S_OCH₃ DA FAMÍLIA PRO

Tabela 3.3.64 – Interações π do ligante 15s_s_oCH₃ com a enzima COX-1

Interações π	distância (Å)
CH... π : SER353:HA – Ct1	2,74
CH... π : SER353:N – Ct1	4,36
CH... π : SER353:O – Ct1	4,04
CH... π : ILE523:HG12 – Ct1	2,95
CH... π : LEU352: HD21 – Ct2	3,73
CH... π : LEU352: HD23 – Ct2	3,74
CH... π : ALA527: N – Ct2	3,44
CH... π : ALA527: H – Ct2	3,72
CH... π : GLY526: O – Ct2	3,74

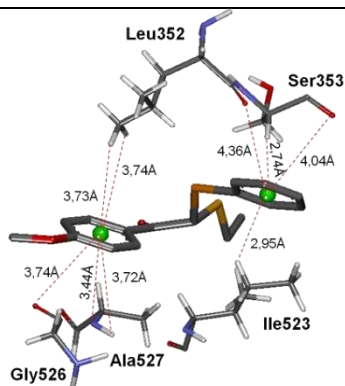


Figura 3.3.64. Interações do tipo C-H... π com os aminoácidos Ile523, Ser353, Ala527 e Leu352, do tipo N... π com Ala527 e Ser353, e do tipo O... π com Ser353 e Gly526. Os Hidrogênios foram omitidos para facilitar a visualização.

APÊNDICE 3.4

Nesta seção são apresentadas as figuras contendo a ocupação dos subsítios das enzimas COX-1 e COX-2 pelos substituintes X e Y dos compostos R e S da família PRO.

A caracterização dos subsítios de COX-2 já havia sido considerada na literatura (SANTOS et al, 2001; BOUAZIZ-TERRACHET et al, 2010). Os subsítios para a COX-1 foram determinados neste trabalho.

3.4.1 OCUPAÇÃO DOS SUBSÍTIOS DA ENZIMA COX-2

3.4.2 OCUPAÇÃO DOS SUBSÍTIOS DA ENZIMA COX-1

3.4.1 OCUPAÇÃO DOS SUBSÍTIOS DA ENZIMA COX-2

3.4.1.1 OCUPAÇÃO DOS SUBSÍTIOS PELO LIGANTE CRISTALOGRÁFICO CELECOXIB (3LN1)

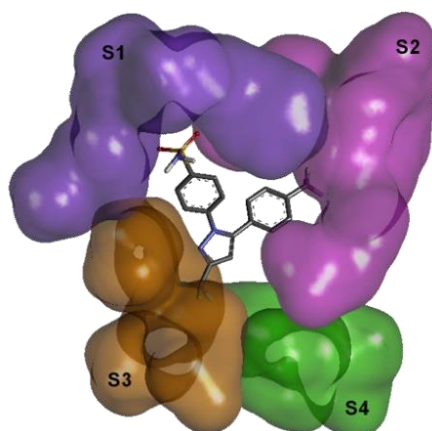


Figura 3.4.1. Ocupação dos subsítios pelo Celecoxib, com o grupo NH_2SO_2 no subsítio S1 (em roxo) e o grupo CH_3 no subsítio S2 (em rosa) da enzima COX-2. O grupo CF_3 se encontrava próximo aos subsítios S3 e S4, mantendo interações com Tyr355, Leu359 e Leu531 (sequência de aminoácidos de acordo com a estrutura 1cx2, apresentada na tabela 4 da Seção C).

3.4.1.2 OCUPAÇÃO DOS SUBSÍTIOS PELO LIGANTE CRISTALOGRÁFICO SC-558 (1CX2)

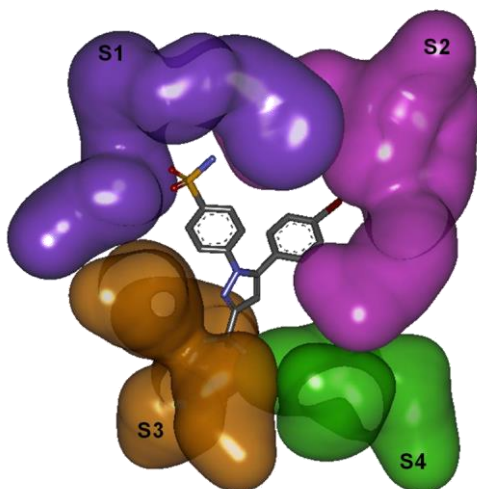


Figura 3.4.2. Ocupação dos subsítios pelo ligante SC-558, com o grupo NH_2SO_2 no subsítio S1 (em roxo) e o Br no subsítio S2 (em rosa) da enzima COX-2. O grupo CF_3 se encontrava próximo aos subsítios S3 e S4, mantendo interações com Tyr355, Arg120, Val349 e Leu531.

3.4.1.3 ENANTIÔMEROS R

OCUPAÇÃO DO SUBSÍLIO S1 PELOS SUBSTITUINTES Y

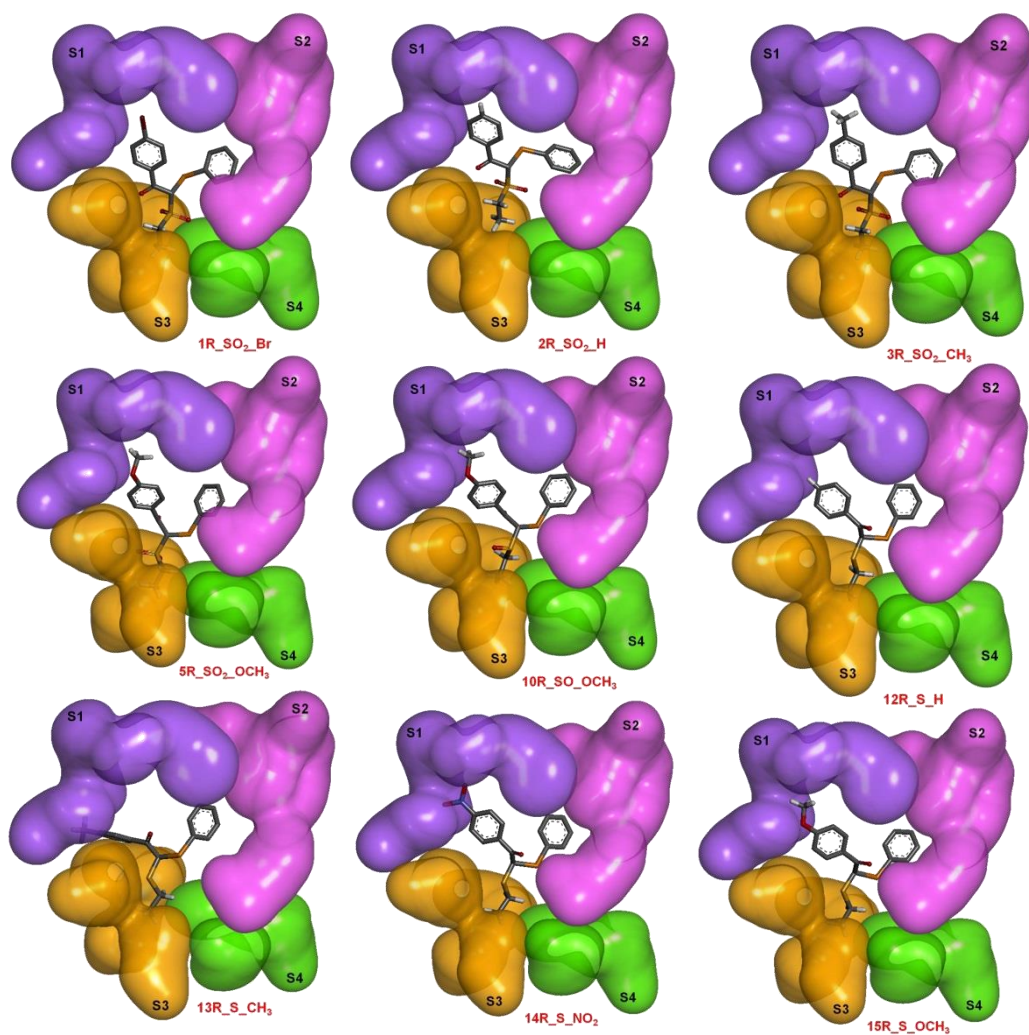


Figura 3.4.3. Compostos da Família PRO com o substituinte Y no subsítio S1 (em roxo) da enzima COX-2. Para todos os compostos foi observado que o substituinte X se encontrava próximo aos subsítios S3 e S4, mantendo interações com Tyr355.

OCUPAÇÃO DO SUBSÍCIO S2 PELOS SUBSTITUINTES Y

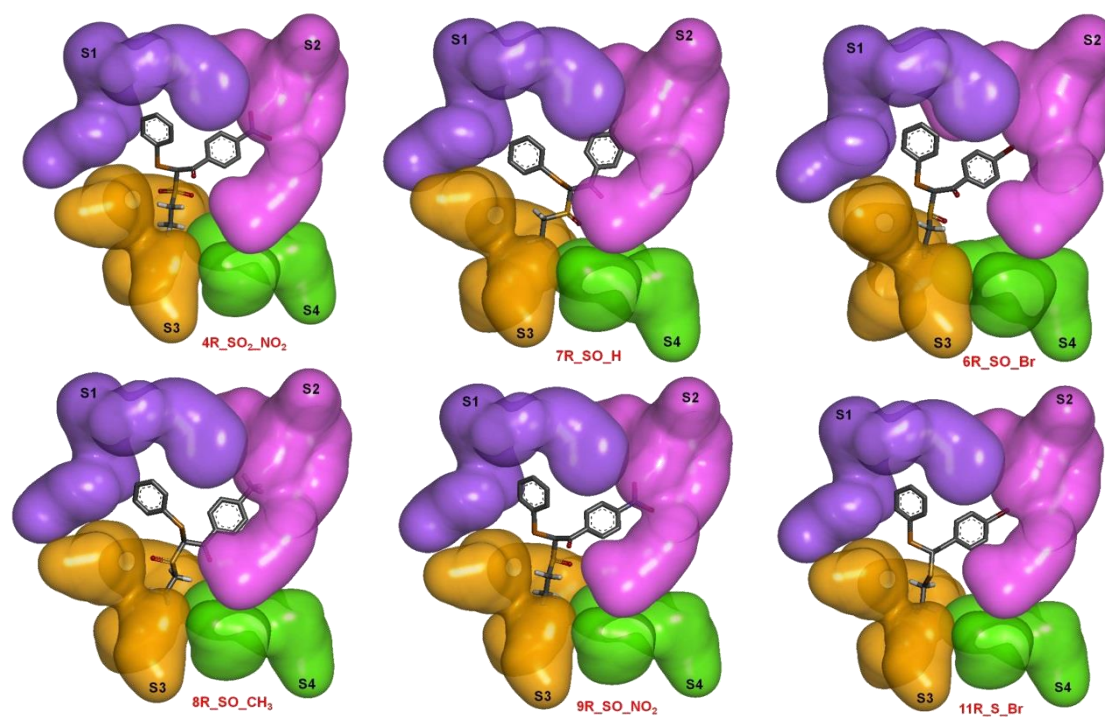


Figura 3.4.4. Compostos da Família PRO com o substituinte Y no subsítio S2 (em rosa) da enzima COX-2. Para todos os compostos foi observado que o substituinte X se encontrava próximo aos subsítios S3 e S4, mantendo interações com Tyr355.

3.4.1.3 ENANTIÔMEROS S

OCUPAÇÃO DO SUBSÍLIO S1 PELOS SUBSTITUINTES Y

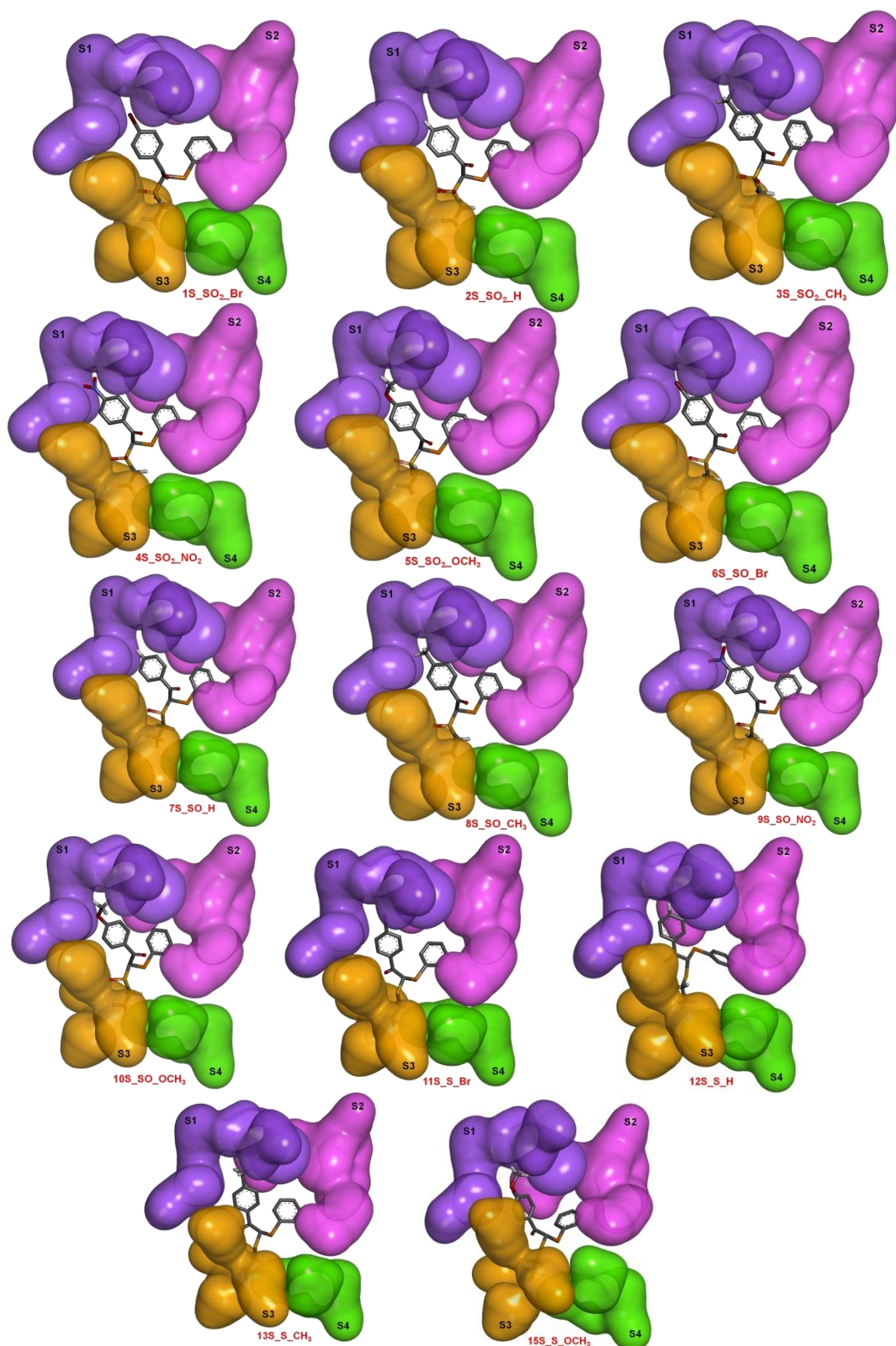


Figura 3.4.5. Compostos da Família PRO com o substituinte Y no subsítio S1 (em roxo) da enzima COX-2. Para todos os compostos foi observado que o substituinte X se encontrava próximo aos subsítios S3 e S4, mantendo interações com Tyr355.

OCUPAÇÃO DO SUBSÍTIO S2 PELOS SUBSTITUINTES Y

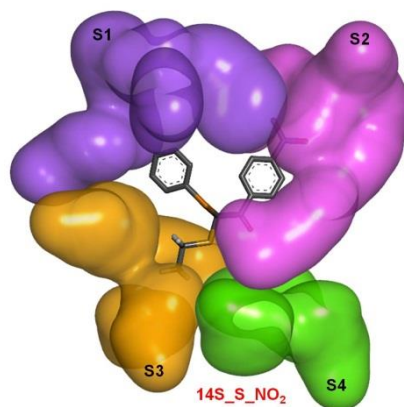


Figura 3.4.6. Composto da Família PRO com o substituinte Y no subsítio S2 (em rosa) da enzima COX-2. Foi observado que o substituinte X se encontrava próximo aos subsítios S3 e S4, mantendo interações com Tyr355.

3.4.2 OCUPAÇÃO DOS SUBSÍTIOS DA ENZIMA COX-1

3.4.2.1 OCUPAÇÃO DOS SUBSÍTIOS PELO LIGANTE CRISTALOGRÁFICO CELECOXIB (3LN1)

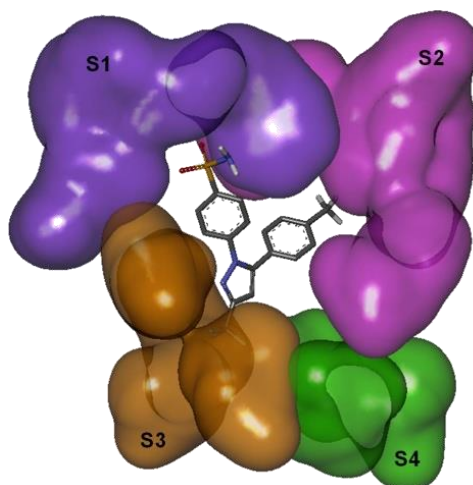


Figura 3.4.7. Ocupação dos subsítios pelo Celecoxib, com o grupo NH_2SO_2 no subsítio S1 (em roxo) e o grupo CH_3 no subsítio S2 (em rosa) da enzima COX-2. O grupo CF_3 se encontrava próximo aos subsítios S3 e S4, mantendo interações com Val116, Val349, Leu359 e Leu531.

3.4.2.2 OCUPAÇÃO DOS SUBSÍTIOS PELO LIGANTE CRISTALOGRÁFICO SC-558 (3KK6)

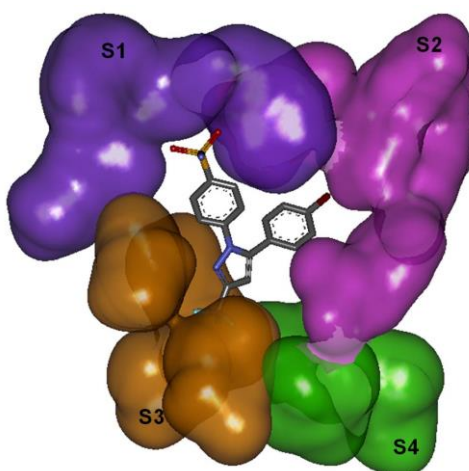


Figura 3.4.8. Ocupação dos subsítios pelo ligante SC-558, com o grupo NH_2SO_2 no subsítio S1 (em roxo) e o Br no subsítio S2 (em rosa) da enzima COX-2. O grupo CF_3 se encontrava próximo aos subsítios S3 e S4, mantendo interações com Leu359 e Leu531.

3.4.2.2 ENANTIÔMEROS R

OCUPAÇÃO DO SUBSÍCIO S1 PELOS SUBSTITUINTES Y

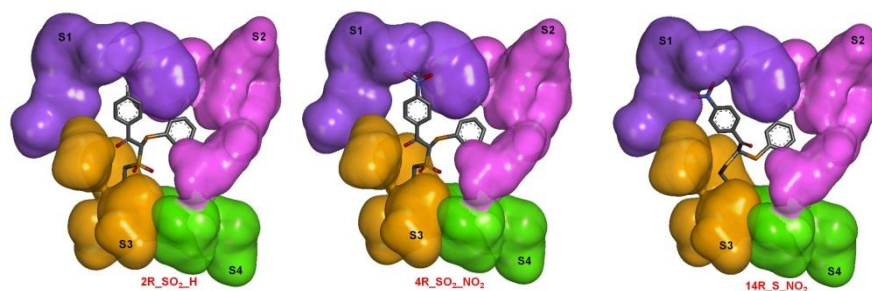


Figura 3.4.9 Compostos da Família PRO com o substituinte Y no subsítio S1 (em roxo) da enzima COX-1. Para todos os compostos foi observado que o substituinte X se encontrava próximo aos subsítios S3 e S4, mantendo interações com Tyr355.

OCUPAÇÃO DO SUBSÍLIO S2 PELOS SUBSTITUINTES Y

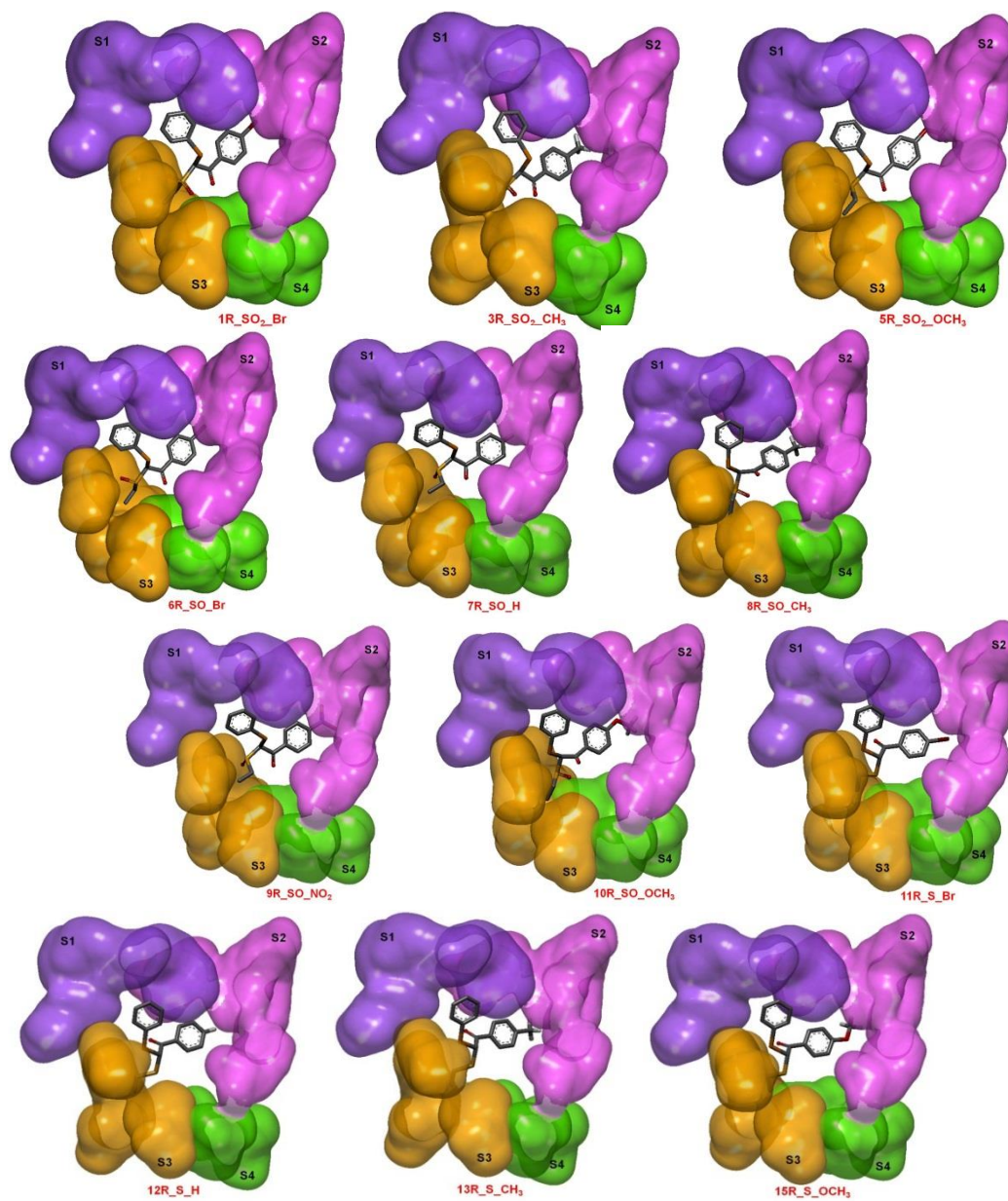


Figura 3.4.10. Compostos da Família PRO com o substituinte Y no subsítio S2 (em rosa) da enzima COX-1. Para todos os compostos foi observado que o substituinte X se encontrava próximo ao subsítio S3 mantendo interações com Tyr355.

3.4.2.3 ENANTIÔMEROS S

OCUPAÇÃO DO SUBSÍLIO S2 PELOS SUBSTITUINTES Y

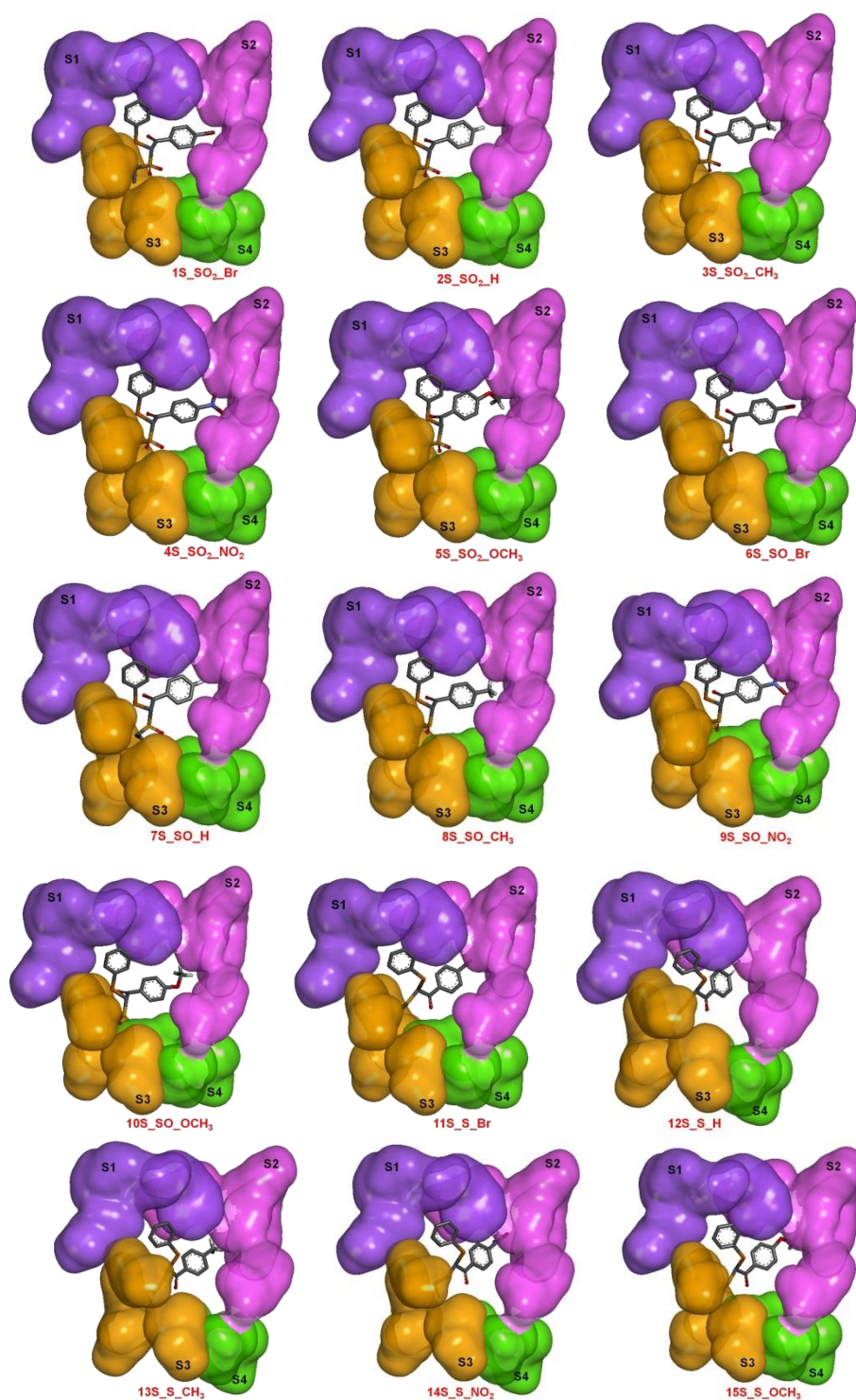


Figura 3.4.11. Compostos da Família PRO com o substituinte Y no subsítio S2 (em rosa) da enzima COX-1. Para todos os compostos foi observado que o substituinte X se encontrava próximo ao subsítio S3 mantendo interações com Tyr355.

APÊNDICE 3.5

Nesta seção são apresentadas as figuras da espessura da pata de todos os animais, medida no Experimento I e no Experimento II, e da temperatura retal, medida no Experimento

I.

3.5.1. EXPERIMENTO I

3.5.1.1. ESPESSURA DAS PATAS

A. CONTROLE-PBS

B. GRUPOS COM CARRAGENINA

B.1. CONTROLE - CARRAGENINA

B.2. 50CH₃ - CARRAGENINA

B.3. CELECOXIBE - CARRAGENINA

B.4. 6 BR - CARRAGENINA

B.5. 100CH₃ - CARRAGENINA

C. GRUPOS COM ZYMOBAN

C.1. CONTROLE - ZYMOBAN

C.2. 50CH₃ - ZYMOBAN

C.3. CELECOXIBE - ZYMOBAN

C.4. 6BR - ZYMOBAN

C.5. 100CH₃ - ZYMOBAN

3.5.1.2. TEMPERATURA RETAL

A. CONTROLE-PBS

B. GRUPOS COM CARRAGENINA

B.1. CONTROLE - CARRAGENINA

B.2. 50CH₃ - CARRAGENINA

B.3. CELECOXIBE - CARRAGENINA

B.4. 6 BR - CARRAGENINA

B.5. 100CH₃ - CARRAGENINA

C. GRUPOS COM ZYMOBAN

C.1. CONTROLE - ZYMOBAN

C.2. 50CH₃ - ZYMOBAN

C.3. CELECOXIBE - ZYMOBAN

C.4. 6BR - ZYMOBAN

C.5. 100CH₃ - ZYMOBAN

3.5.2. EXPERIMENTO II

3.5.2.1. ESPESSURA DAS PATAS

A. CONTROLE-PBS

B. GRUPOS COM CARRAGENINA

B.1. CONTROLE - CARRAGENINA

B.2. 50CH₃ - CARRAGENINA

B.3. CELECOXIBE - CARRAGENINA

B.4. 6BR - CARRAGENINA

B.5. 100CH₃ - CARRAGENINA

C. GRUPOS COM ZYMOBAN

C.1. CONTROLE - ZYMOBAN

C.2. 50CH₃ - ZYMOBAN

C.3. CELECOXIBE - ZYMOBAN

C.4. 6BR - ZYMOBAN

C.5. 100CH₃ - ZYMOBAN

3.5.2.2. TEMPERATURA

A. CONTROLE-PBS

B. GRUPOS COM CARRAGENINA

B.1. CONTROLE - CARRAGENINA

B.2. 50CH₃ - CARRAGENINA

B.3. CELECOXIBE - CARRAGENINA

B.4. 6Br - CARRAGENINA

B.5. 10OCH₃ - CARRAGENINA

C. GRUPOS COM ZYMOBAN

C.1. CONTROLE - ZYMOBAN

C.2. 5OCH₃ - ZYMOBAN

C.3. CELECOXIBE - ZYMOBAN

C.4. 6Br - ZYMOBAN

C.5. 10OCH₃ - ZYMOBAN

3.5.1. EXPERIMENTO I

3.5.1.1. ESPESSURA DAS PATAS

Os resultados estão apresentados em tabela contendo variação da espessura da pata esquerda para cada animal. É apresentada a diferença entre os valores de antes da aplicação da carragenina e do zymosan e após os tratamentos. Os grupos estão separados de acordo com o agente irritante (zymosan e carragenina) e estão identificados por letras, sendo o grupo Controle-PBS, o primeiro grupo (A). As figuras apresentam os valores da espessura da pata para cada animal de cada grupo.

A. CONTROLE-PBS

O grupo controle PBS apresentou aumento da espessura logo após aplicação do PBS (Figura 3.5.1) sendo que diminuiu após 1 hora, mantendo-se constante até o final do experimento, para cada animal. Essa variação está apresentada na Tabela 3.5.1.

Animal	Logo após	1h	2h	3h	4h	24h
A	1	0	0	0	0	0
B	1	0	0	0	0	0
C	1	0	0	0	0	0

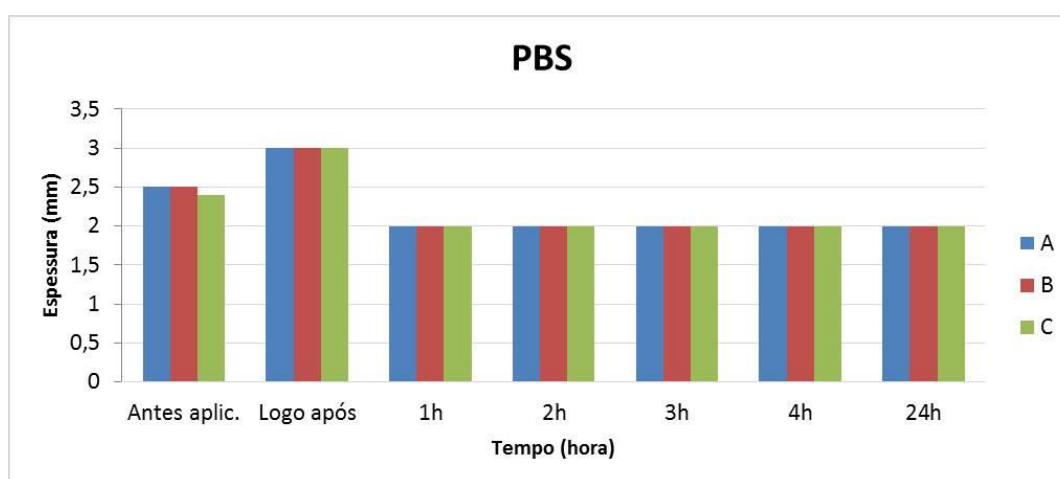


Figura 3.5.1. Espessura da pata dos animais do grupo Controle PBS. O eixo das ordenadas mostra o tempo em horas e o eixo das abcissas apresenta a espessura em mm. Os animais A, B e C estão apresentados em azul, vermelho e verde, respectivamente.

B. GRUPOS COM CARRAGENINA

B.1. CONTROLE– CARRAGENINA

O grupo controle da carragenina (sem tratamento) manteve a variação da espessura constante para todos os animais durante o intervalo de tempo em que foi medido o edema. A Tabela 3.5.2 apresenta esses dados, mostrando os valores da diferença da espessura da pata para cada animal do grupo, representado por A, B e C.

Animais	Logo após	1h	2h	3h	4h	24h
A	1,5	1	1	1	1	1
B	1	1	1	1	1	0
C	1	0	0	0	0	0

Na figura 3.5.2 estão apresentadas as medidas das espessuras durante intervalo de tempo em que foi medido o edema para cada animal.

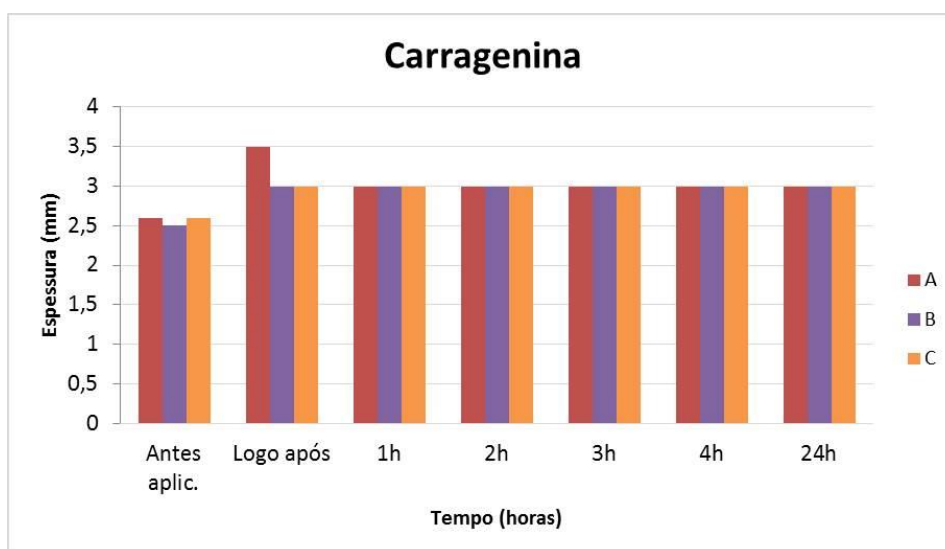


Figura 3.5.2. Espessura da pata dos animais para o grupo Controle Carragenina. O eixo das ordenadas mostra o tempo em horas e o eixo das abcissas apresenta a espessura em mm. Os animais A, B e C estão apresentados em vermelho, roxo e laranja, respectivamente.

B.2. 5OCH₃ – CARRAGENINA

Foi possível observar que para o composto 5-OCH₃ o edema diminuiu após 1 hora da aplicação da carragenina, mantendo essa diminuição após 2 horas para todos os animais. No entanto, após 3 horas houve pequeno aumento da espessura da pata para o Animal B. Após 4 e 24 horas o edema diminuiu para todos os animais e

manteve-se constante. A Tabela 3.5.3 apresenta os dados citados, mostrando as espessuras da pata para cada animal desse grupo (A, B, C e D).

Animal	logo após	1h	2h	3h	4h	24h
A	1,5	0,5	0,5	0	0	0
B	1,5	1	0	0,2	0	0
C	1	0,5	0,5	0,5	0	0
D	0,5	0,5	0	0	0	0

Na figura 3.5.3 estão apresentadas as medidas das espessuras durante intervalo de tempo em que foi medido o edema para cada animal.

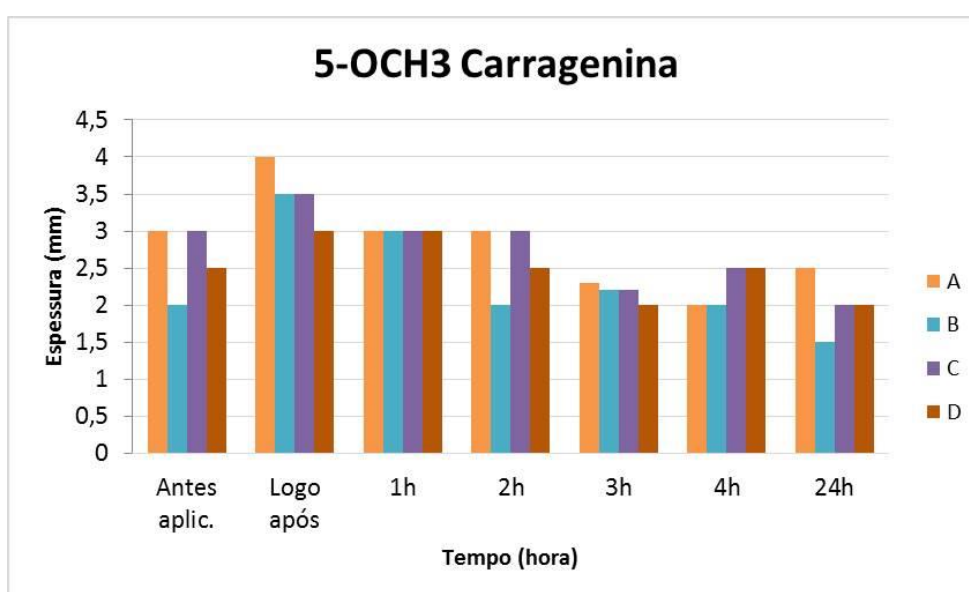


Figura 3.5.3. Espessura da pata dos animais do grupo 5OCH₃ - Carragenina. O eixo das ordenadas mostra o tempo em horas e o eixo das abcissas apresenta a espessura em mm. Os animais A, B, C e D estão apresentados em laranja, azul, roxo e marrom, respectivamente.

B.3. CELECOXIBE – CARRAGENINA

Para o celecoxibe, notou-se uma diminuição do edema após 1 hora da aplicação para, mantendo após 2, 3 e 4 horas. No entanto, para o animal B houve um pequeno aumento do edema após 4 horas, diminuindo posteriormente. Após 24 horas o edema diminuiu igualando com a espessura inicial da pata para todos os animais. A Tabela 3.5.4 apresenta esses dados, apresentando a espessura da pata de cada animal do grupo.

Animal	Logo após	1h	2h	3h	4h	24h
A	1,6	0,6	0,6	0,4	0,6	0,1
B	0,9	0,4	0,4	0,2	0,4	0
C	0,9	0	0	0	0	0
D	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0

Na figura 3.5.4 estão apresentadas as medidas das espessuras durante intervalo de tempo em que foi medido o edema para cada animal.

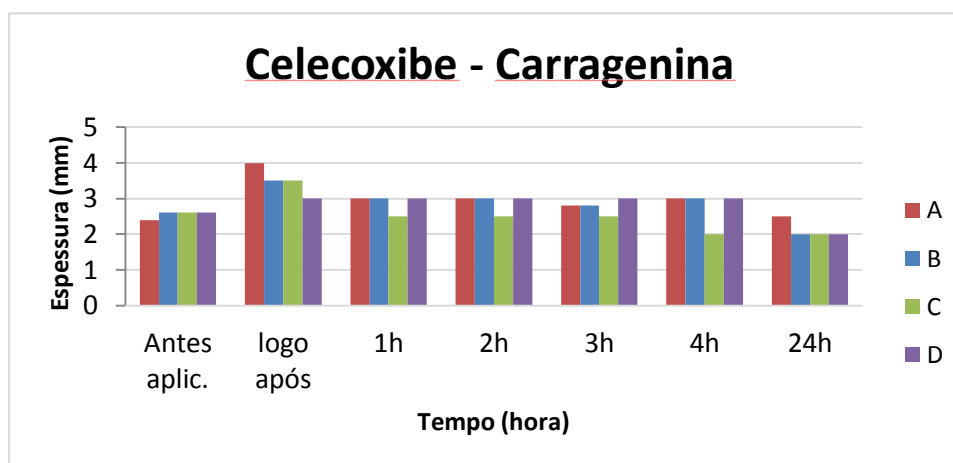


Figura 3.5.4. Espessura da pata dos animais do grupo Celecoxibe-Carragenina. O eixo das ordenadas mostra o tempo em horas e o eixo das abcissas apresenta a espessura em mm. Os animais A, B, C e D estão apresentados em vermelho, azul, verde e roxo respectivamente.

B.4. 6Br – CARRAGENINA

O composto 6Br começou a diminuir o edema após 2 horas da aplicação, para apenas o animal B, mantendo após 3 horas para esse animal. Após 4 horas houve diminuição do edema para todos os animais, igualando com a espessura inicial da pata. E, após 24 horas houve pequeno aumento do edema para os animais B e C. A Tabela 3.5.6 apresenta esses valores.

Animal	Logo após	1h	2h	3h	4h	24h
A	1	1	1	1	0	0
B	1	1	0,5	0,5	0	0,5
C	1	1	1	1	0	0,5
D	1	1,5	1	1	0	0

Na figura 3.5.5 estão apresentadas as medidas das espessuras durante intervalo de tempo em que foi medido o edema para cada animal.

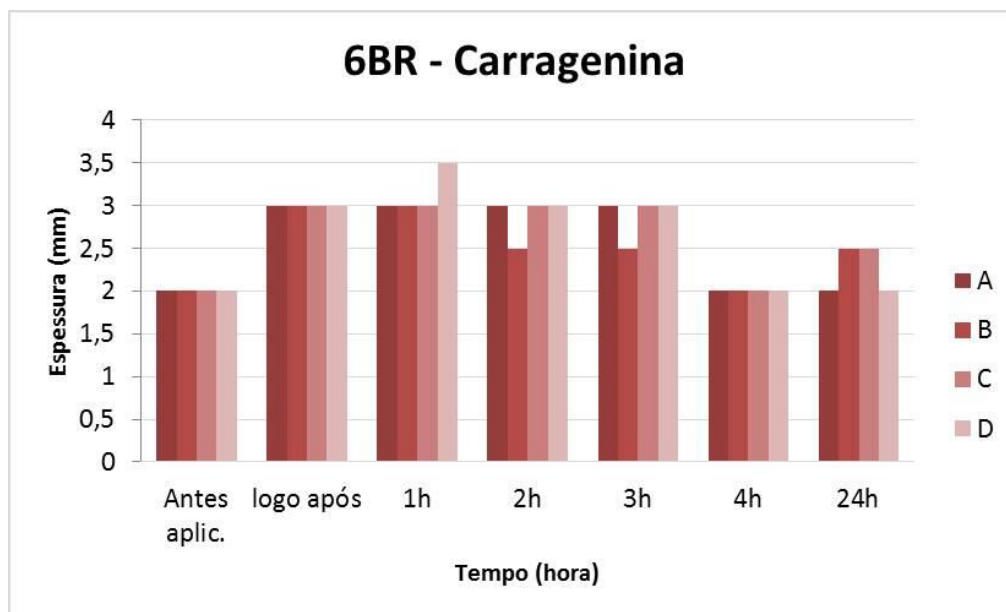


Figura 3.5.5. Espessura da pata dos animais para o grupo 6Br-Carragenina. O eixo das ordenadas mostra o tempo em horas e o eixo das abcissas apresenta a espessura em mm. Os animais A, B, C e D estão apresentados em tons de vermelho, do tom mais escuro para o mais claro, respectivamente.

B.5. 10OCH₃ – CARRAGENINA

Para o composto 10-OCH₃ foi observado que a espessura das patas manteve igual àquela observada após a aplicação da carragenina até após 3 horas. Neste tempo houve aumento para o animal D, diminuindo após 4 horas. Após 24 horas, os animais A, B e C apresentaram espessura da pata igual à inicial. Esses dados estão apresentados na Tabela 3.5.6.

Animal	Logo após	1h	2h	3h	4h	24h
A	1	1	1	1	1	0
B	1	1	1	1	1	0
C	1	1	1	1	1	1
D	1	1	1	1,5	0,5	0

Na figura 3.5.6 estão apresentadas as medidas das espessuras durante intervalo de tempo em que foi medido o edema para cada animal.

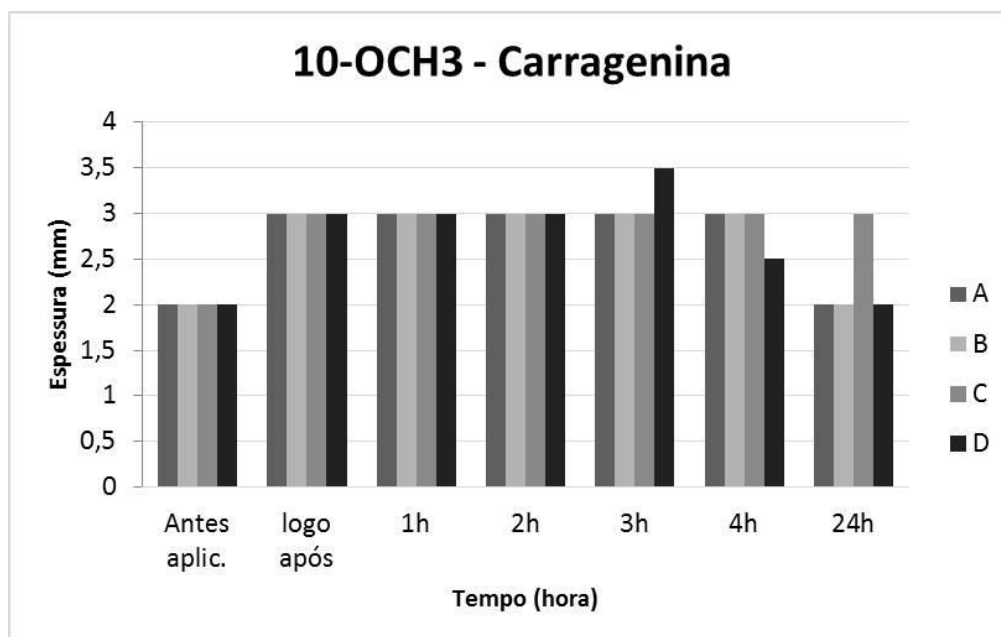


Figura 3.5.6. Espessura da pata dos animais do grupo 10-OCH₃-Carragenina. O eixo das ordenadas mostra o tempo em horas e o eixo das abcissas apresenta a espessura em mm. Os animais A, B, C e D estão apresentados em cinza, cinza mais claro, cinza mais escuro e preto, respectivamente.

C. GRUPOS COM ZYMOSAN

C.1. CONTROLE – ZYMOSAN

O grupo controle do Zymosan (sem tratamento) apresentou diminuição do edema após 2 horas, mantendo espessura da pata constante em 3 mm para todos os animais até após 24 horas da aplicação do agente inflamatório (Tabela 3.5.7).

Animal	Logo após	1h	2h	3h	4h	24h
A	1	1	0,5	0,5	0,5	0,5
B	1	1	0,5	0,5	0,5	0,5
C	0,9	0,4	0,4	1,4	0,4	0,4

Na figura 3.5.9 estão apresentadas as medidas das espessuras durante intervalo de tempo em que foi medido o edema para cada animal.

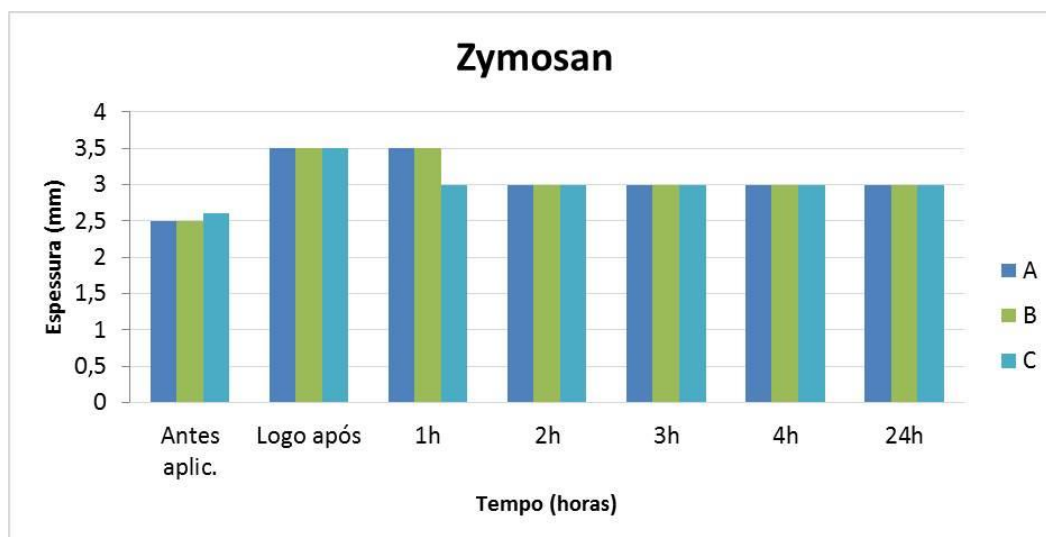


Figura 3.5.7. Espessura da pata dos animais do grupo Controle Zymosan. O eixo das ordenadas mostra o tempo em horas e o eixo das abscissas apresenta a espessura em mm. Os animais A, B e C estão apresentados azul, verde e azul turquesa, respectivamente.

C.2. 5OCH₃ – ZYMOSAN

Foi possível observar que para o composto 5-OCH₃ o edema diminuiu após 2 horas da aplicação do zymosan para todos os animais. No entanto após 3 horas houve aumento desse edema para o animal B, diminuindo após 3 horas. A espessura após 4 horas foi mantida a mesma daquela apresentada após 3 horas para todos os animais. Após 24 horas a espessura da pata se igualou à espessura inicial. A Tabela 3.5.8 apresenta os dados citados, mostrando as espessuras da pata para cada animal desse grupo (A, B, C e D).

Animal	Logo após	1h	2h	3h	4h	24h
A	0,5	0,5	0,5	0,3	0,3	0
B	0,5	0,5	0	0,3	0,3	0
C	1	1,5	0	0	0	0
D	1	0,5	0,5	0,2	0,2	0

Na figura 3.5.8 estão apresentadas as medidas das espessuras durante intervalo de tempo em que foi medido o edema para cada animal.

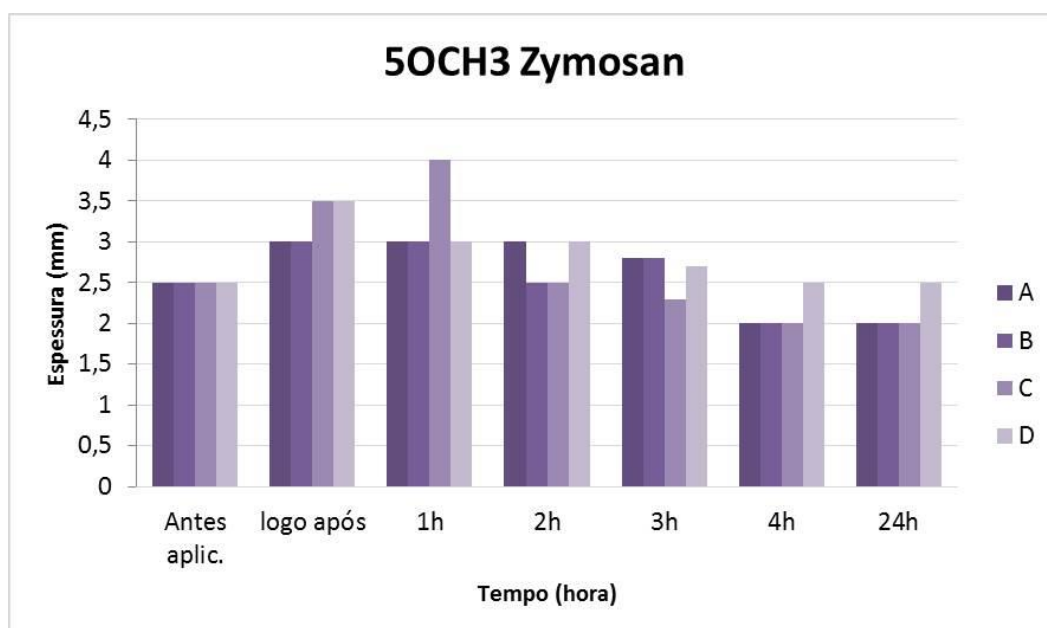


Figura 3.5.8. Espessura da pata dos animais do grupo 5OCH₃-Zymosan O eixo das ordenadas mostra o tempo em horas e o eixo das abcissas apresenta a espessura em mm. Os animais A, B, C e D estão apresentados em tons de roxo, do mais escuro para o mais claro, respectivamente.

C.3. CELECOXIBE – ZYMOSAN

Para o celecoxibe, notou-se uma diminuição do edema após 1 hora da aplicação para os animais, mantendo essa espessura após 2 horas para todos os animais, apenas havendo um aumento para o animal B. Após 3 horas, houve aumento do edema para os animais C e D e diminuição do edema para o animal B. Após 4 horas foi observado aumento do edema para todos os animais. E, após o edema diminuiu novamente, sendo que para os animais C e D a espessura da pata se igualou à medida inicial. A Tabela 3.5.9 apresenta esses dados, apresentando a espessura da pata de cada animal do grupo.

Animal	Logo após	1h	2h	3h	4h	24h
A	1,4	0,4	0,4	0	1,4	0,4
B	1	0	1	0,3	1	0,5
C	1	0	0	0,5	0,5	0
D	0,7	0	0	0,2	1,2	0

Na figura 3.5.9 estão apresentadas as medidas das espessuras durante intervalo de tempo em que foi medido o edema para cada animal.

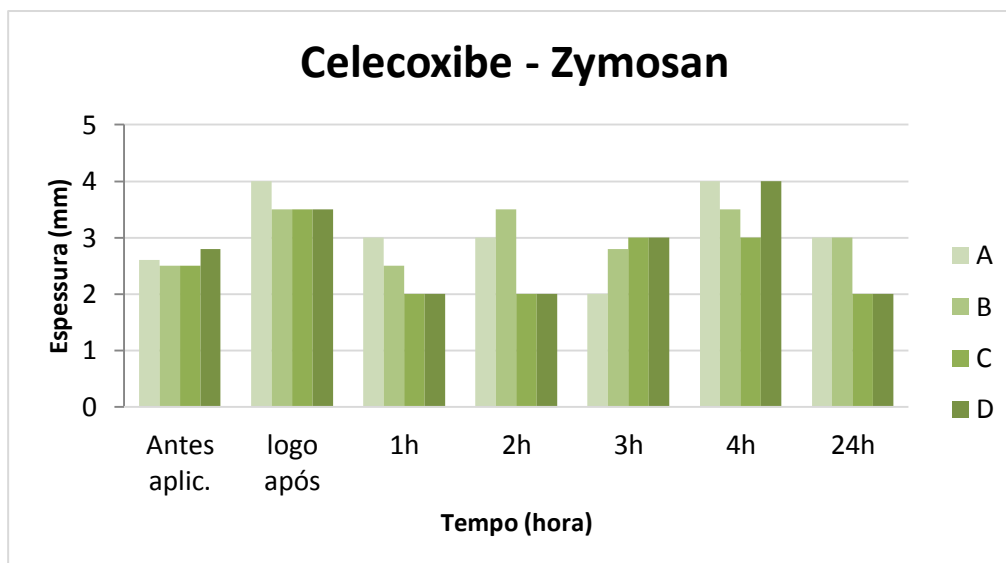


Figura 3.5.9. Espessura da pata dos animais do grupo Celecoxibe-Zymosan. O eixo das ordenadas mostra o tempo em horas e o eixo das abcissas apresenta a espessura em mm. Os animais A, B, C e D estão apresentados em tons de verde, do mais claro para o mais escuro, respectivamente.

C.4. 6Br – ZYMOSAN

Para o composto 6Br foi observado que após 1 hora houve diminuição do edema apenas para o animal B. No entanto, após 2 horas o edema desse mesmo animal aumentou, apenas diminuindo após 4 horas. Neste tempo, os animais B e D apresentaram espessura da pata igual à medida inicial, enquanto que os animais A e C não apresentaram mudança desde o período após a aplicação do zymosan. Após 24 horas, o animal B apresentou aumento no edema novamente e o animal C apresentou diminuição da espessura da pata. Para o animal A não houve alteração e para o animal D foi mantido o resultado apresentado após 4 horas. A Tabela 3.5.10 apresenta esses dados.

Animal	Logo após	1h	2h	3h	4h	24h
A	1	1	1	1	1	1
B	1	0,5	1	0,5	0	0,5
C	1	1	1	1	1	0,5
D	1	1	1	1	0	0

Na figura 3.5.10 estão apresentadas as medidas das espessuras durante intervalo de tempo em que foi medido o edema para cada animal.

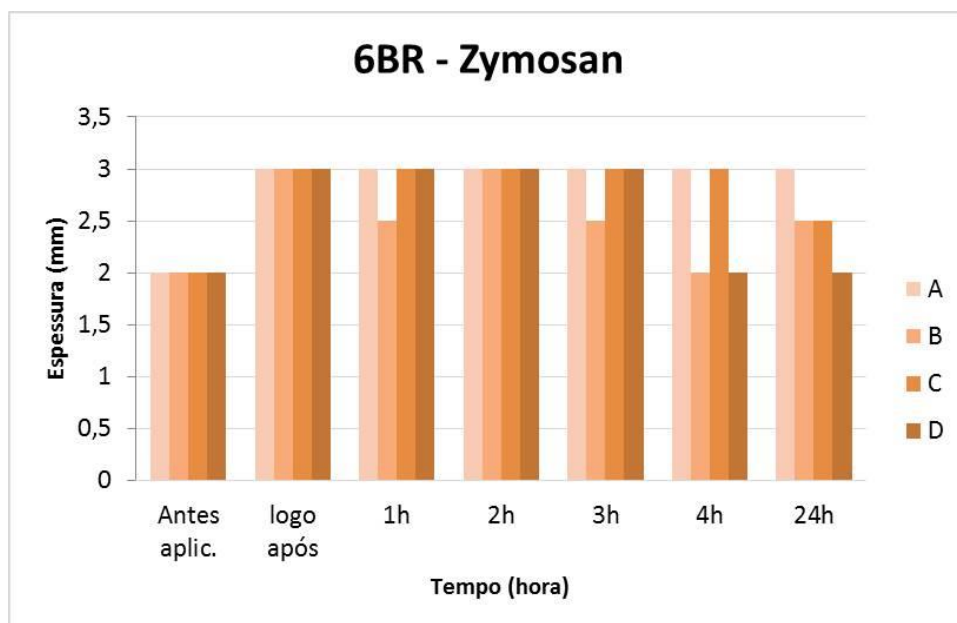


Figura 3.5.10. Espessura da pata dos animais do grupo Controle 6Br-Zymosan. O eixo das ordenadas mostra o tempo em horas e o eixo das abscissas apresenta a espessura em mm. Os animais A, B, C e D estão apresentados em tons de laranja, do mais claro para o mais escuro, respectivamente.

C.5. 10OCH₃ – ZYMOSAN

Para o composto 10-OCH₃ foi observado que houve diminuição do edema apenas 24 horas após a aplicação dos compostos, sendo que os animais A, B e D apresentaram espessura da pata igual à medida inicial. Esses dados estão apresentados na Tabela 3.5.11.

Animal	Logo após	1h	2h	3h	4h	24h
A	1	1	1	1	1	0
B	1	1	1	1	1	0
C	1	1	1	1	1	1
D	1	1	1	1,5	0,5	0

Na figura 3.5.11 estão apresentadas as medidas das espessuras durante intervalo de tempo em que foi medido o edema para cada animal.

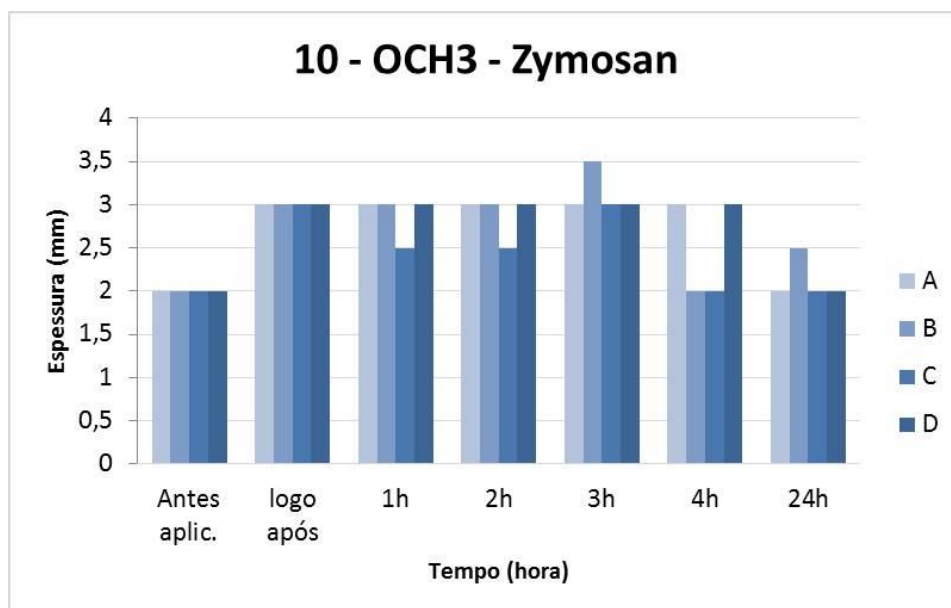


Figura 3.5.11. Espessura da pata dos animais do grupo 10-OCH₃-Zymosan. O eixo das ordenadas mostra o tempo em horas e o eixo das abcissas apresenta a espessura em mm. Os animais A, B, C e D estão apresentados em tons de azul, do tom mais claro para o tom mais escuro, respectivamente.

3.5.1.2. TEMPERATURA RETAL

A. CONTROLE-PBS

Para o PBS a temperatura variou de - 0,1 a 0,1 °C. Comparado aos grupos controles Carragenina e Zymosan, essa variação não foi significativa. Essa variação está apresentada na Tabela 3.5.12.

Grupo	Após 24h
PBS A	0,1
PBS B	-0,1
PBS C	0,1

B. GRUPOS COM CARRAGENINA

B.1. CONTROLE-CARRAGENINA

A temperatura variou de 0,1 a 1,0 °C para o grupo controle Carragenina após 24 horas da aplicação da carragenina. Para os animais A, B e C a temperatura aumentou após esse período, o que pode ser explicado devido ao fato de a carragenina ter provocado a inflamação, aumentando o calor corporal. A Tabela 3.5.13 apresenta a variação da temperatura retal para esse grupo.

Tabela 3.5.13. Variação da temperatura retal (°C) para o grupo controle Carragenina

Grupo	Após 24h
Carragenina A	0,7
Carragenina B	1,0
Carragenina C	0,1

B.2. 5-OCH₃-CARRAGENINA

Para o grupo 5-OCH₃-Carragenina a temperatura variou de - 0,9 a -1,4 °C. Todos os animais apresentaram diminuição da temperatura retal após 24 horas da aplicação da carragenina. Esses dados estão apresentados na Tabela 3.5.14.

Tabela 3.5.14. Variação da temperatura retal (°C) para o grupo 5-OCH₃-Carragenina

Grupo	Após 24h
5-OCH ₃ -Car. A	-0,8
5-OCH ₃ -Car. B	-1,4
5-OCH ₃ -Car. C	-0,4
5-OCH ₃ -Car. D	-0,9

B.3. CELECOXIBE-CARRAGENINA

A temperatura variou de 0,0 a 2,5 °C. Após 24 horas da aplicação da carragenina houve aumento da temperatura retal para todos os animais desse grupo. A Tabela 3.5.15 apresenta essa variação.

Tabela 3.5.15. Variação da temperatura retal (°C) para o grupo Celecoxibe-Carragenina

Grupo	Após 24h
Celecoxibe-Car. A	2,5
Celecoxibe-Car. B	1,1
Celecoxibe-Car. C	0,0
Celecoxibe-Car. D	1,1

B.4. 6Br-CARRAGENINA

Para o grupo 6Br-Carragenina a temperatura retal variou de 0,3 a 1,8 °C. Após 24 horas todos os animais desse grupo apresentaram aumento da temperatura retal. Esses dados estão apresentados na Tabela 3.5.16.

Tabela 3.5.16. Variação da temperatura retal (°C) para o grupo 6Br-Carragenina

Grupo	Após 24h
6Br-Car. A	1,1
6Br -Car. B	1,5
6Br-Car. C	0,3
6Br-Car. D	1,8

B.5. 10-OCH₃-CARRAGENINA

A variação da temperatura foi de 0,4 a 1,0 °C. Após 24 horas houve aumento da temperatura retal para todos os animais. A Tabela 3.5.17 apresenta a variação da temperatura retal para esse grupo.

Grupo	Após 24h
10-OCH ₃ -Car. A	1,0
10-OCH ₃ -Car. B	0,4
10-OCH ₃ -Car. C	0,4
10-OCH ₃ -Car. D	1,0

C. GRUPOS COM ZYMOSAN

C.1 CONTROLE-ZYMOSAN

A temperatura variou de - 0,5 a 1,7 °C para o grupo controle Zymosan. Após 24 horas da aplicação do zymosan a temperatura retal diminuiu para os animais A e B e aumentou para o animal C (Tabela 3.5.18).

Grupo	Após 24h
Zymosan A	-0,4
Zymosan B	-0,5
Zymosan C	1,7

C.2. 5-OCH₃-ZYMOSAN

Para o grupo 5-OCH₃-Zymosan, a temperatura variou de 0,0 a 1,3 °C. Após 24 horas da aplicação do zymosan a temperatura aumentou retal para todos os animais. Esses dados estão apresentados na Tabela 3.5.19.

Grupo	Após 24h
5-OCH ₃ -Zym. A	1,3
5-OCH ₃ - Zym. B	0,7
5-OCH ₃ - Zym. C	0,3
5-OCH ₃ - Zym. D	0,0

C.3. CELECOXIBE-ZYMOSAN

Foi observado para esse grupo que a temperatura variou de - 1,1 a 0,9 °C. Após 24 horas da aplicação do zymosan a temperatura retal diminuiu para os animais B e D e aumentou para os animais A e C. A Tabela 3.5.20 apresenta esses dados.

Tabela 3.5.20. Variação da temperatura retal (°C) para o grupo Celecoxibe-Zymosan	
Grupo	Após 24h
Celecoxibe-Zym. A	0,9
Celecoxibe-Zym. B	-1,1
Celecoxibe -Zym. C	0,5
Celecoxibe-Zym. D	-1,1

C.4. 6Br-ZYMOSAN

Para o grupo 6Br-Zymosan a temperatura variou de - 0,2 a 0,3°C. Após 24 horas a temperatura retal aumentou para o animal C e diminuiu para os animais A, B e D. A variação da temperatura retal para esse grupo está apresentada na Tabela 3.5.21.

Tabela 3.5.21. Variação da temperatura retal (°C) para o grupo 6Br-Zymosan	
Grupo	Após 24h
6Br-Zym. A	-0,1
6Br -Zym. B	-0,2
6Br-Zym. C	0,3
6Br -Zym. D	-0,1

C.5. 10-OCH₃-ZYMOSAN

A temperatura variou de -0,8 a 1,5°C. Após 24 horas a temperatura retal diminuiu para os animais A, B e C e aumentou para o animal D. Na Tabela 3.5.22 estão apresentados esses dados.

Tabela 3.5.22. Variação da temperatura retal (°C) para o grupo 10-OCH ₃ -Zymosan	
Grupo	Após 24h
10-OCH ₃ -Zym. A	-0,3
10-OCH ₃ -Zym. B	-0,1
10-OCH ₃ -Zym. C	-0,8
10-OCH ₃ -Zym. D	1,5

3.5.2. EXPERIMENTO II

3.5.2.1. ESPESSURA DAS PATAS

A. CONTROLE –PBS

O grupo controle PBS apresentou aumento da espessura logo após aplicação do PBS, sendo que diminuiu após 1 hora, mantendo-se constante até o final do experimento, para cada animal. Essa variação está apresentada na Tabela 3.5.23.

Tabela 3.5.23. Variação da espessura da pata para o grupo controle PBS

Animal	Logo após	1h	2h	3h	5h	7h	9h	11h
A	1	0	0	0	0	0	0	0
B	1	0	0	0	0	0	0	0
C	1	0	0	0	0	0	0	0

Na figura 3.5.23 estão apresentadas as medidas das espessuras durante intervalo de tempo em que foi medido o edema para cada animal.

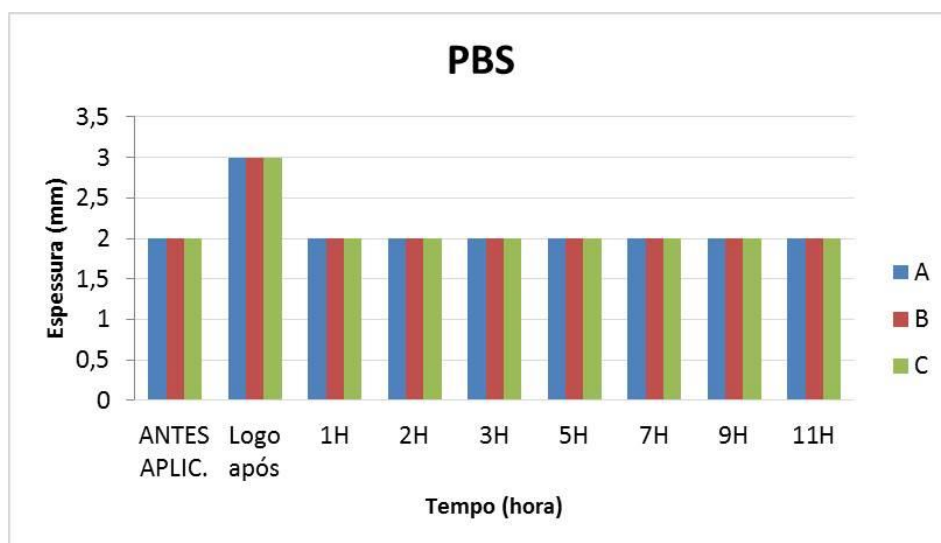


Figura 3.5.23. Espessura da pata dos animais do grupo Controle PBS. O eixo das ordenadas mostra o tempo em horas e o eixo das abcissas apresenta a espessura em mm. Os animais A, B e C estão apresentados em azul, vermelho e verde, respectivamente.

B. GRUPOS COM CARRAGENINA

B.1. CONTROLE – CARRAGENINA

O grupo controle da carragenina (sem tratamento) apresentou aumento do edema logo após aplicação do agente inflamatório. Após 1 hora apenas diminuiu o edema para o animal. Após 2 horas a espessura da pata foi a mesma da que observada após 1 hora. Após 3 horas o edema havia diminuído para todos os animais. Após 5

horas diminuiu para o animal A e aumentou para os animais B e C. Após 7 horas aumentou para o animal A e diminuiu para os animais B e C. Após 9 horas diminuiu para anima A e a espessura da pata foi mantida para os animais B e C. E, após 11 horas a espessura aumentou para os animais A e B e foi mantida para o animal C. A Tabela 3.5.24 apresenta esses dados, mostrando os valores da espessura da pata para cada animal do grupo, representado por A, B e C.

Tabela 3.5.24. Variação da espessura (mm) da pata para o grupo controle Carragenina

Animal	Logo após	1h	2h	3h	5h	7h	9h	11h
A	1,5	1	1	0,5	0	0,5	0	1
B	1	1	1	0,5	1	0,5	0,5	1
C	1	1	1	0,5	1	0,5	0,5	0,5

Na figura 3.5.24 estão apresentadas as medidas das espessuras durante intervalo de tempo em que foi medido o edema para cada animal.

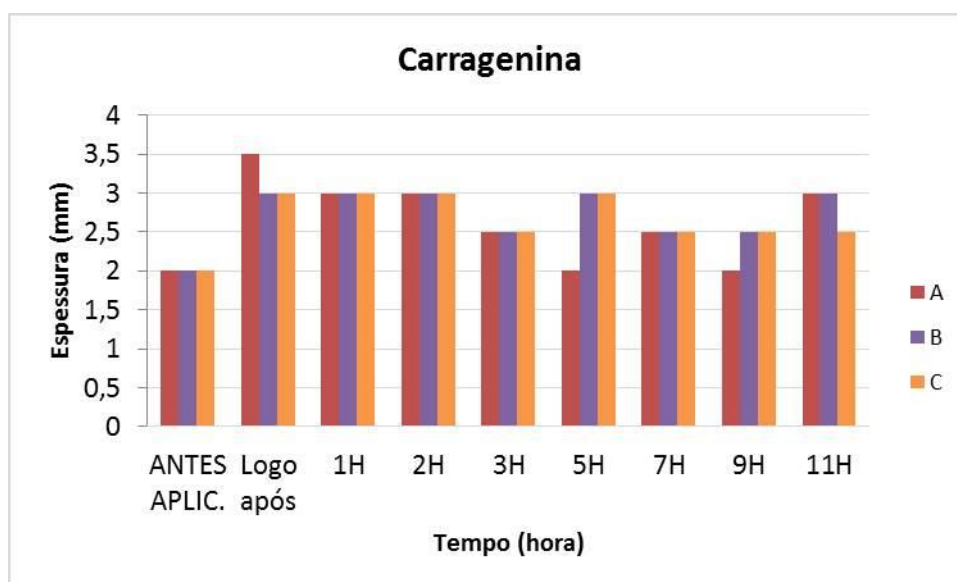


Figura 3.5.24. Espessura da pata dos animais do grupo Controle Carragenina. O eixo das ordenadas mostra o tempo em horas e o eixo das abcissas apresenta a espessura em mm. Os animais A, B e C estão apresentados em vermelho, roxo e laranja, respectivamente.

B.2. 5OCH₃ – CARRAGENINA

Foi possível observar que para o composto 5-OCH₃ o edema diminuiu após 1 hora para os animais C e D e aumentou para o animal B. Após 2 horas da aplicação do zymosan, a espessura diminuiu para todos os animais, mantendo após 3 horas. Após 5 horas houve aumento na espessura para o animal D. Após 7 horas houve aumento para o animal C e diminuição da espessura para o animal B. Após 9 horas a espessura se igualou à medida inicial e manteve-se até após 11. A Tabela 3.5.25 apresenta os

dados citados, mostrando as espessuras da pata para cada animal desse grupo (A, B, C e D).

Animal	Logo após	1h	2h	3h	5h	7h	9h	11h
A	1	1	0,5	0	0	0	0	0
B	1	1,5	1	1	0,5	0	0	0
C	1,5	1	0	0	0	0,5	0	0
D	1,5	1	0	0	0,5	0,5	0	0

Na figura 3.5.25 estão apresentadas as medidas das espessuras durante intervalo de tempo em que foi medido o edema para cada animal.

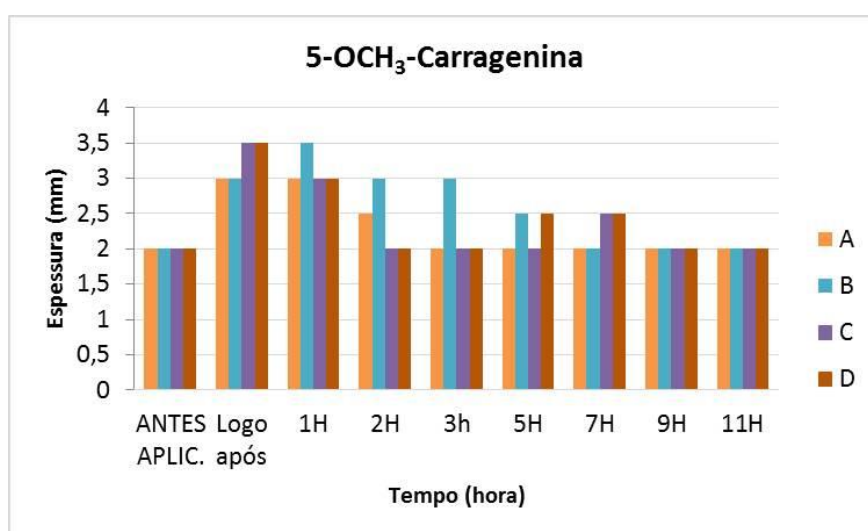


Figura 3.5.25. Espessura da pata dos animais do grupo 5-OCH₃-Zymosan. O eixo das ordenadas mostra o tempo em horas e o eixo das abcissas apresenta a espessura em mm. Os animais A, B, C e D estão apresentados em laranja, azul, roxo e marrom, respectivamente.

B.3. CELECOXIBE – CARRAGENINA

Para o celecoxibe, notou-se uma diminuição do edema após 1 hora da aplicação para apenas o animal B. Após 2 horas, o edema diminuiu para os animais B e C. Porém, após 3 horas foi observado aumento do edema para esses animais. E, após 7 horas a medida da pata se igual à medida inicial, mantendo-se após 9h e 11h. A Tabela 3.5.26 apresenta esses dados, apresentando a espessura da pata de cada animal do grupo.

Animal	Logo após	1h	2h	3h	5h	7h	9h	11h
A	1	1	1	1	0	0	0	0
B	1	0,5	0	1	0	0	0	0
C	1	1	0	0,5	0	0	0	0

D 1 1 1 0,5 0,2 0 0 0

Na figura 3.5.26 estão apresentadas as medidas das espessuras durante intervalo de tempo em que foi medido o edema para cada animal.

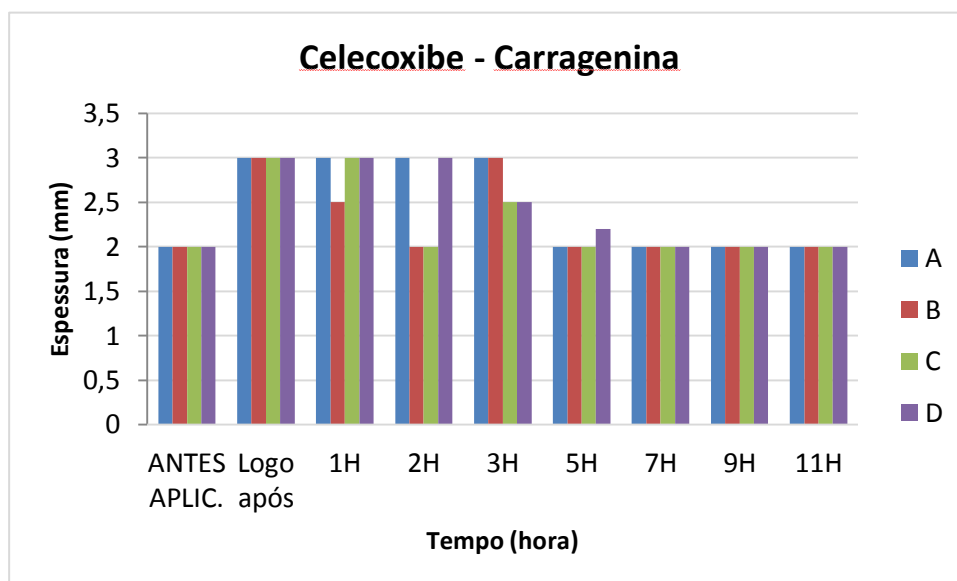


Figura 3.5.26. Espessura da pata dos animais do grupo Celecoxibe-Carragenina. O eixo das ordenadas mostra o tempo em horas e o eixo das abcissas apresenta a espessura em mm. Os animais A, B, C e D estão apresentados em azul, vermelho, verde e roxo, respectivamente.

B.4. 6Br – CARRAGENINA

O composto 6Br começou a diminuir o edema após 1 hora da aplicação apenas para o animal A, o qual apresentou a mesma medida inicial da pata até após 11 horas da aplicação. Após 2 horas o edema também diminuiu para o animal B. No entanto, para esse animal o edema aumentou após 3 e 5 horas, diminuindo após 7 horas e apresentou a medida da espessura igual à medida inicial aos 9 e 11 horas. Para os animais C e D o edema diminuiu após 7 horas, aumentando após 9 horas e voltando à medida inicial após 11 horas. A Tabela 3.5.27 apresenta esses dados.

Tabela 3.5.27. Variação da espessura (mm) da pata para o grupo 6Br

Animal	Logo após	1h	2h	3h	5h	7h	9h	11h
A	1	0,5	0	0	0	0	0	0
B	1	1	0	0,5	1	0,5	0	0
C	1	1	1	1	1	0	0,5	0
D	1	1	1	1	1	0,2	0,5	0

Na figura 3.5.27 estão apresentadas as medidas das espessuras durante intervalo de tempo em que foi medido o edema para cada animal.

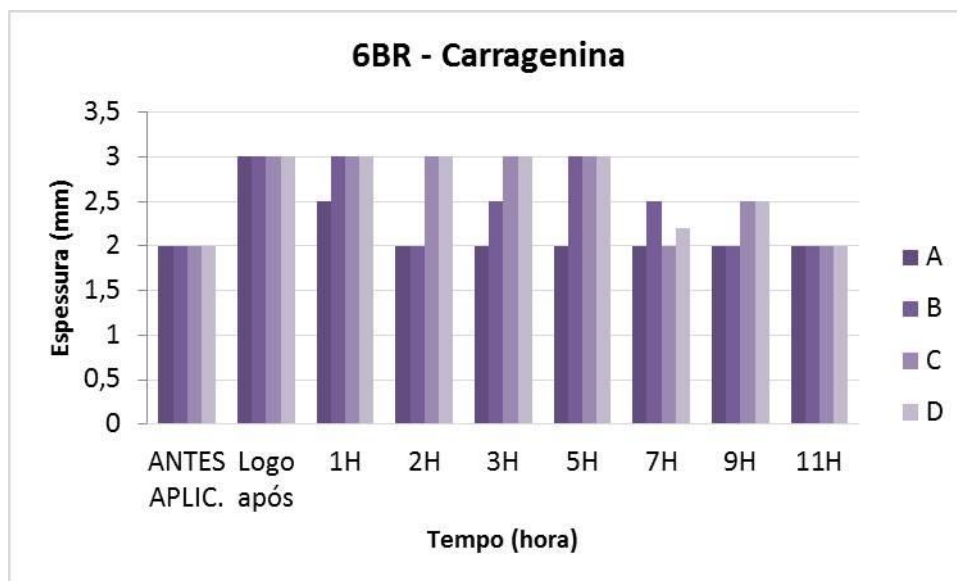


Figura 3.5.27. Espessura da pata dos animais do grupo 6Br-Carragenina. O eixo das ordenadas mostra o tempo em horas e o eixo das abscissas apresenta a espessura em mm. Os animais A, B, C e D estão apresentados em tons de roxo, do tom mais escuro para o mais claro, respectivamente.

B.5. 10-OCH₃ – CARRAGENINA

Para o composto 10-OCH₃ foi observado que a espessura diminuiu após 1 hora da aplicação para todos os animais. Após 2 horas, para os animais A e D, a espessura da pata voltou à medida inicial. Após 3 horas houve aumento da para o animal B. Após 54 horas, o edema aumentou para o animal D, diminuindo após 7 horas. Após 9 horas, o edema aumentou para o animal A. E, após 11 horas a espessura da pata para todos os animais foi a mesma da medida inicial. Esses dados estão apresentados na Tabela 3.5.28.

Tabela 3.5.28. Variação da espessura (mm) da pata para o grupo 10-OCH₃

Animal	Logo após	1h	2h	3h	5h	7h	9h	11h
A	2	1	0	0	0	0	0,5	0
B	1,5	0,5	0,5	1	0,5	0,5	0,5	0
C	1,5	1	1	0	0	0	0	0
D	1,5	1	0	0	0,5	0	0	0

Na figura 3.5.28 estão apresentadas as medidas das espessuras durante intervalo de tempo em que foi medido o edema para cada animal.

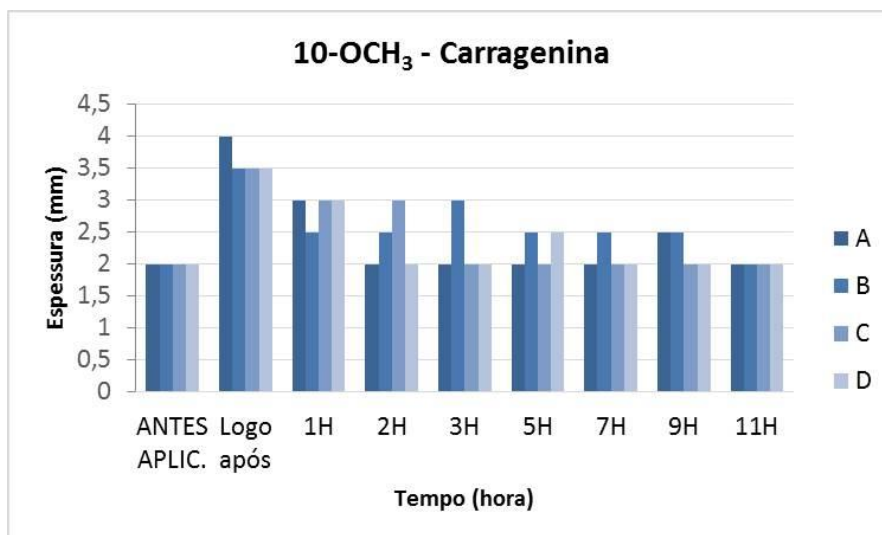


Figura 3.5.28. Espessura da pata dos animais do grupo 10-OCH₃-Carragenina. O eixo das ordenadas mostra o tempo em horas e o eixo das abcissas apresenta a espessura em mm. Os animais A, B, C e D estão apresentados em tons de azul, do tom mais escuro para o mais claro, respectivamente.

C. GRUPOS COM ZYMOSAN

C.1. CONTROLE – ZYMOSAN

O grupo controle do Zymosan (sem tratamento) apresentou diminuição do edema após 1 hora para os animais A e C. Após 2 horas diminuiu para o animal B e manteve constante para todos os animais após 3 horas. Após 5 horas houve um aumento para os animais B e C, e diminuiu para o animal A, mantendo para este animal até após 24 horas. Após 7 horas diminuiu para os animais B e C, mantendo após 9 horas. E, após 11 horas diminuiu para o animal B (Tabela 3.5.29).

Tabela 3.5.29. Variação da espessura (mm) da pata para o grupo Zymosan

Animal	Logo após	1h	2h	3h	5h	7h	9h	11h
A	1,5	1	1	1	0,5	0,5	0,5	0,5
B	1,5	1,5	1	1	2	1,5	1,5	1
C	1,5	1	1	1	1,5	1	1	1

Na figura 3.5.29 estão apresentadas as medidas das espessuras durante intervalo de tempo em que foi medido o edema para cada animal.

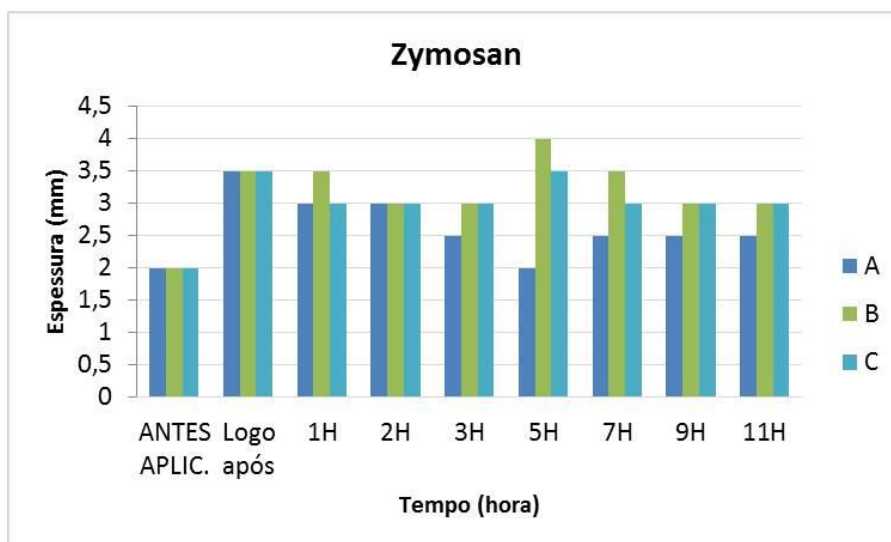


Figura 3.5.29. Espessura da pata dos animais do grupo Zymosan. O eixo das ordenadas mostra o tempo em horas e o eixo das abcissas apresenta a espessura em mm. Os animais A, B e C estão apresentados em azul, verde e azul turquesa, respectivamente.

C.2. 5OCH₃ – ZYMOSAN

Foi possível observar que para o composto 5-OCH₃ o edema diminuiu após 1 hora para todos os animais, mantendo a espessura após 2 horas. Após 3 horas a espessura diminuiu um pouco mais para todos os animais. No entanto, após 5 horas o edema aumentou para os animais C e D, diminuindo após 7 horas. Para o animal A, aumentou após 7 horas. Após 9 horas diminuiu para todos os animais, porém aumentou para os animais B e C após 11 horas. A Tabela 3.5.30 apresenta os dados citados, mostrando as espessuras da pata para cada animal desse grupo (A, B, C e D).

Animal	Logo após	1h	2h	3h	5h	7h	9h	11h
A	1,5	1	1	0,5	0	0,5	0	1
B	1	1	1	0,5	1	0,5	0,5	1
C	1	1	1	0,5	1	0,5	0,5	0,5

Na figura 3.5.30 estão apresentadas as medidas das espessuras durante intervalo de tempo em que foi medido o edema para cada animal.

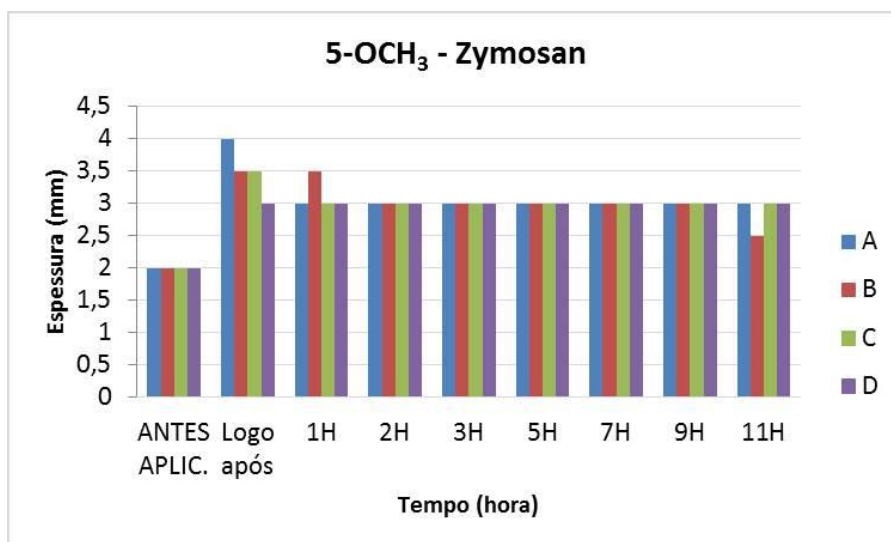


Figura 3.5.30. Espessura da pata dos animais do grupo 5-OCH₃-Zymosan. O eixo das ordenadas mostra o tempo em horas e o eixo das abcissas apresenta a espessura em mm. Os animais A, B, C e D estão apresentados em azul, vermelho, verde e roxo, respectivamente.

C.3. CELECOXIBE – ZYMOSAN

Para o celecoxibe, notou-se uma diminuição do edema após 9 horas apenas para o animal C. Após 2 horas o edema aumentou para o animal B, mantendo a espessura até 3 horas após. Após 5 horas diminuiu o edema para o animal B e aumentou para o animal D, diminuindo após 7 horas. E, após 11 horas diminuiu para todos os animais A, B e C. A Tabela 3.5.31 apresenta esses dados, apresentando a espessura da pata de cada animal do grupo.

Tabela 3.5.31. Variação da espessura (mm) da pata para o grupo Celecoxibe

Animal	Logo após	1h	2h	3h	5h	7h	9h	11h
A	1	1	1	1	1	1	1	0
B	1	1	1,5	1,5	1	1	1	0,5
C	1	1	1	1	1	1	0,5	0,5
D	1	1	1	1	1,5	1	1	1

Na figura 3.5.31 estão apresentadas as medidas das espessuras durante intervalo de tempo em que foi medido o edema para cada animal.

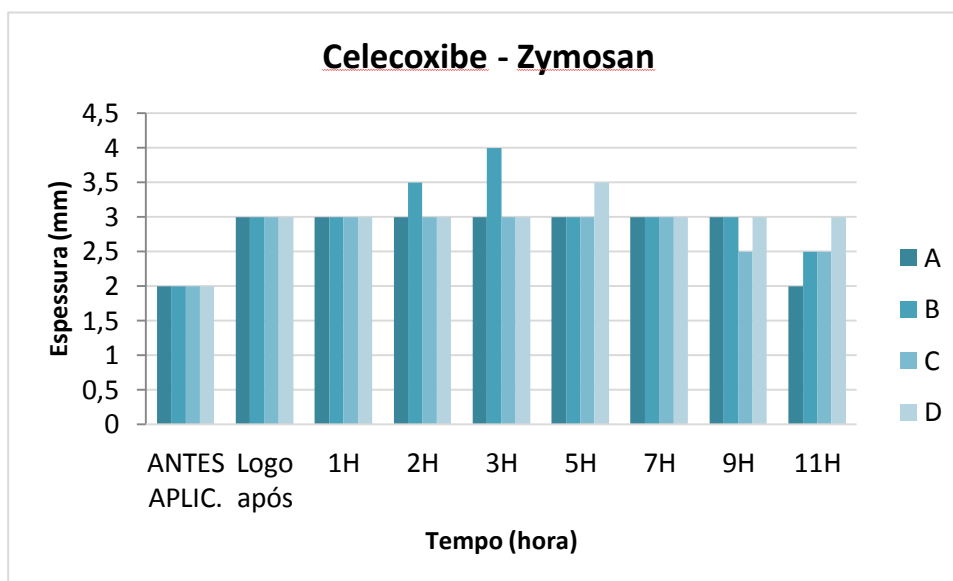


Figura 3.5.31. Espessura da pata dos animais do grupo Celecoxibe-Zymosan. O eixo das ordenadas mostra o tempo em horas e o eixo das abscissas apresenta a espessura em mm. Os animais A, B, C e D estão apresentados em tons de azul, do tom mais escuro para o tom mais claro, respectivamente.

C.4. 6Br – ZYMOSAN

O composto 6Br começou a diminuir o edema após 1 hora da aplicação, para apenas o animal B. Após 2 horas o edema diminuiu para os animais A e C e aumentou para o animal B. Após 3 horas o edema aumentou para o animal A e diminuiu para o animal B. Após 5 horas aumentou para todos os animais. Após 7 horas diminuiu para os animais A e D e aumentou para o animal B. Após 9 horas diminuiu para os animais A e B. E, após 11 horas aumentou para o animal B. A Tabela 3.5.32 apresenta esses valores.

Animal	Logo após	1h	2h	3h	5h	7h	9h	11h
A	1	1	0,5	1	2	1,5	1	1
B	1	0,5	1	0,5	1	1,5	0,5	1
C	1	1	0,5	0,5	1	1	1	1
D	1	1	1	1	2	1	1	1

Na figura 3.5.32 estão apresentadas as medidas das espessuras durante intervalo de tempo em que foi medido o edema para cada animal.

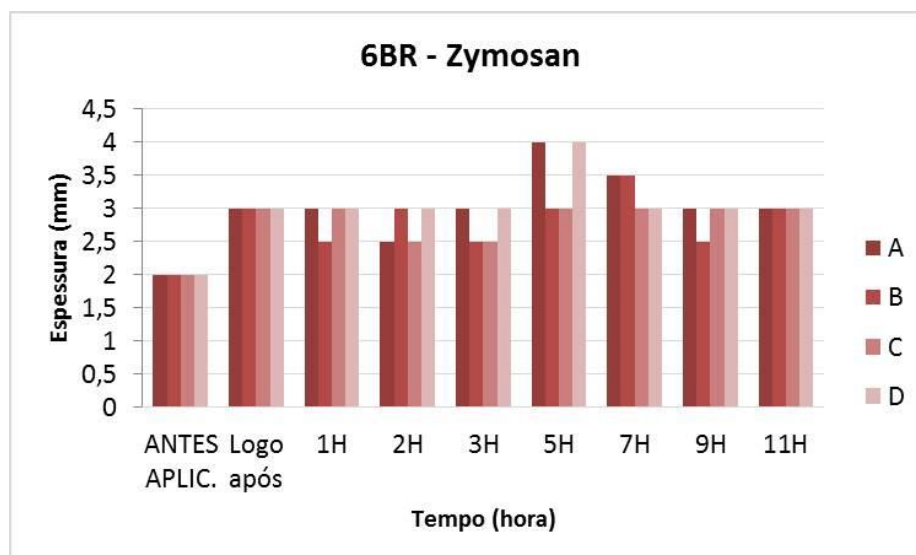


Figura 3.5.32. Espessura da pata dos animais do grupo 6Br-Zymosan. O eixo das ordenadas mostra o tempo em horas e o eixo das abcissas apresenta a espessura em mm. Os animais A, B, C e D estão apresentados em tons de vermelho, do tom mais escuro para o tom mais claro, respectivamente.

C.5. 10-OCH₃ – ZYMOSAN

Para o composto 10-OCH₃ foi observado que o edema diminuiu após 1 hora da aplicação do zymosan para todos os animais. Após 2 horas diminuiu para o animal A e aumentou para o animal D. Após 3 horas o edema aumentou para o animal A. A pós 5 horas teve aumento do edema para os animais B e C. Após 7 horas o edema diminuiu para todos os animais e permaneceu até após 11 horas, exceto para o animal B que apresentou aumento após 9 horas. Esses dados estão apresentados na Tabela 3.5.33.

Tabela 3.5.33. Variação da espessura (mm) da pata para o grupo 10-OCH₃

Animal	Logo após	1h	2h	3h	5h	7h	9h	11h
A	2	1	0,5	2	1	0,5	1	1
B	1,5	1	1	1	2	1	1	1
C	1,5	1	1	1	1,5	1	1	1
D	1	1	2	2	2	1	1	1

Na figura 3.5.33 estão apresentadas as medidas das espessuras durante intervalo de tempo em que foi medido o edema para cada animal.

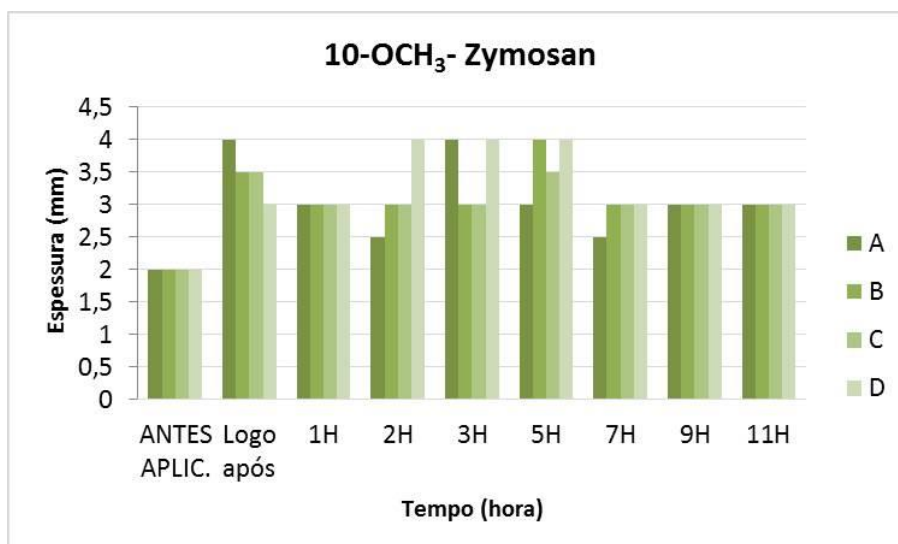


Figura 3.5.33. Espessura da pata dos animais do grupo 10-OCH₃-Zymosan. O eixo das ordenadas mostra o tempo em horas e o eixo das abcissas apresenta a espessura em mm. Os animais A, B, C e D estão apresentados em tons de verde, do tom mais escuro para o tom mais claro, respectivamente.

3.5.2.2. TEMPERATURA

Para a análise da temperatura foi considerada a variação da temperatura da pata esquerda (na qual foi aplicado o agente inflamatório), sendo os resultados apresentados pela diferença entre a medida da pata antes e após os tratamentos. Esses resultados estão apresentados em tabelas, para cada animal de cada grupo.

Os valores obtidos num determinado período foram comparados com aqueles obtidos para o período anterior. Por exemplo, as medidas determinadas para 2 horas após a aplicação dos agentes inflamatórios foram comparadas com aquelas obtidas após 1 hora, sendo observado se diminuiu ou aumentou a temperatura para esse período em relação ao anterior.

Os valores negativos mostram que a temperatura da pata no período é menor que a temperatura inicial (antes da aplicação do agente inflamatório).

A. CONTROLE-PBS

Para o grupo controle PBS, a temperatura da pata esquerda aumentou após 1 hora e diminuiu para os animais A e B após 2 horas. Após 3 horas diminuiu para todos os animais. No entanto, aumentou após 5 horas, diminuindo novamente após 9 e 11 horas. Esses dados estão apresentados na Tabela 3.5.34.

Animal	1h	2h	3h	5h	7h	9h	11h
A	4,0	3,9	0,8	2,9	3,8	3,5	1,3
B	5,2	4,6	1,4	2,9	4,7	3,0	0,4
C	2,3	6,4	1,9	4,8	5,8	2,8	0,8

A figura 3.5.34 apresenta as medidas das temperaturas para cada animal.

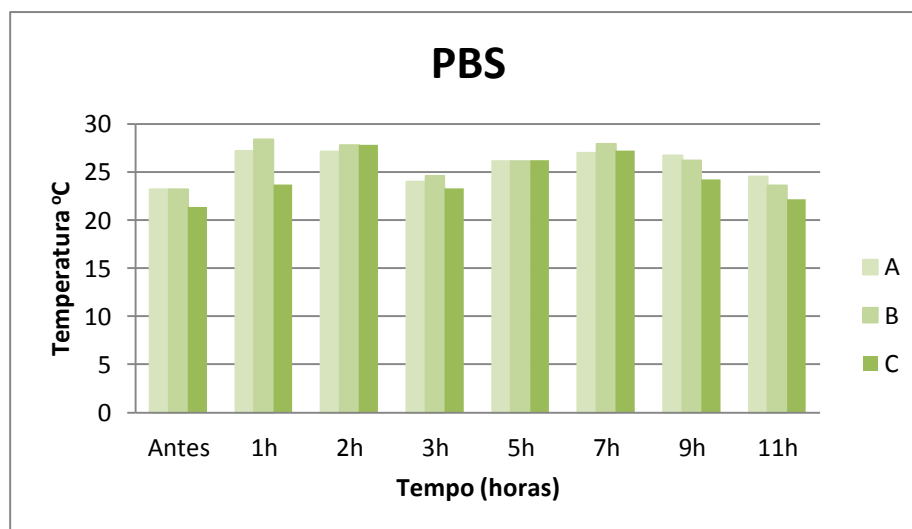


Figura 3.5.34. Temperatura da pata dos animais do grupo controle-PBS. O eixo das ordenadas mostra o tempo em horas e o eixo das abcissas apresenta temperatura em °C. Os animais A, B e C estão apresentados em tons de verde, do tom mais claro para o tom mais escuro, respectivamente.

B. GRUPOS COM CARRAGENINA

B.1. CONTROLE-CARRAGENINA

O grupo controle Carragenina apresentou diminuição da temperatura da pata esquerda após 1 hora da aplicação da carragenina para o animal C. No entanto, a temperatura aumentou após 2 horas para os animais A e C, e diminuiu para o animal B. Após 5 horas a temperatura diminuiu para todos os animais e aumentou após 7 horas para o animal A. Após 9 e 11 horas a temperatura diminuiu para todos os animais, conforme apresentado na Tabela 3.5.35.

Animal	1h	2h	3h	5h	7h	9h	11h
A	1,4	1,6	-3,3	-3,3	1,9	-3,7	-0,4
B	1,3	0,1	-3,7	-2,6	-1,6	-4,8	-2,7
C	-2,4	7,7	2,8	0,4	0,9	0,5	-0,9

A figura 3.5.35 apresenta as medidas das temperaturas para cada animal.

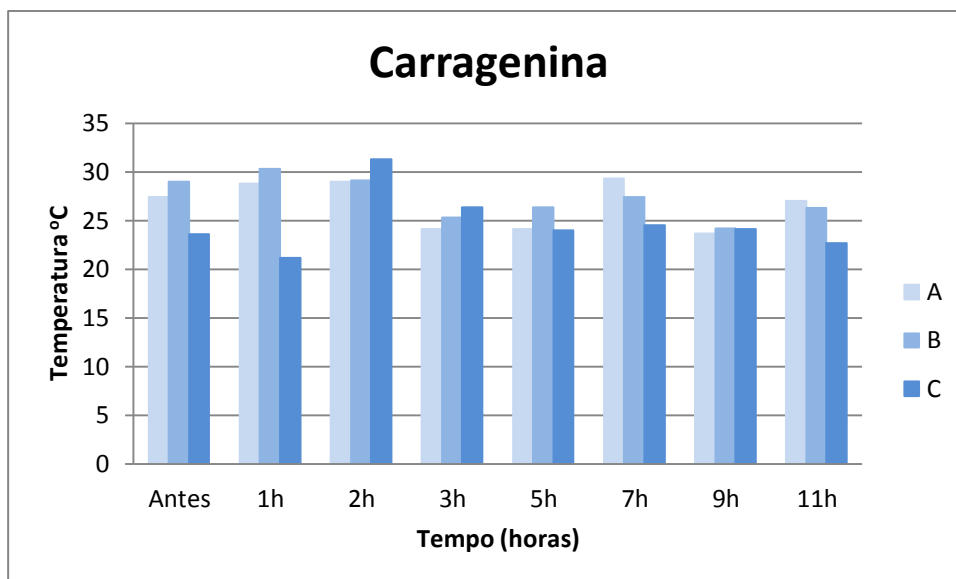


Figura 3.5.35. Temperatura da pata dos animais do grupo controle-Carragenina. O eixo das ordenadas mostra o tempo em horas e o eixo das abcissas apresenta temperatura em °C. Os animais A, B e C estão apresentados em tons de azul, do tom mais claro para o tom mais escuro, respectivamente.

B.2. 5-OCH₃- CARRAGENINA

A temperatura da pata esquerda para o grupo 5-OCH₃-Carragenina diminuiu após 1 hora para o animal C somente. No entanto, após 2 horas a temperatura aumentou em relação ao período anterior para todos os animais. Após 3 horas diminuiu para os Animais A, B e D, e aumentou para o animal C. Após 5 horas aumentou para os animais A, B e D e permaneceu a mesma para o animal C. Após 7 horas aumentou para os animais A, B e C e diminuiu para os animais D. Após 9 horas diminuiu para todos os animais, porém após 11 horas aumentou para os animais B,C e D. A Tabela 3.5.36 apresenta esses dados.

Animal	1h	2h	3h	5h	7h	9h	11h
A	0,9	3,6	1,9	5,7	5,8	4,7	3,8
B	2,9	4,4	1,3	2,3	3,9	4,7	7,8
C	-0,4	1,1	3	3	3,7	1,2	1,4
D	8	5,8	5,6	4,9	4,6	3,6	7,6

A figura 3.5.36 apresenta as medidas das temperaturas para cada animal.

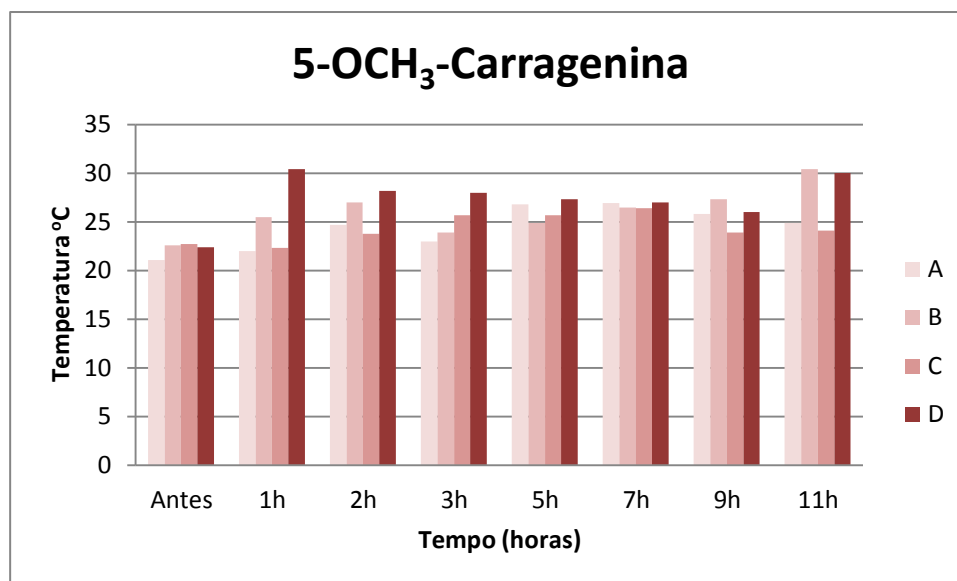


Figura 3.5.36. Temperatura da pata dos animais do grupo 5-OCH₃-Carragenina. O eixo das ordenadas mostra o tempo em horas e o eixo das abcissas apresenta temperatura em °C. Os animais A, B, C e D estão apresentados em tons de vermelho, do tom mais claro para o tom mais escuro, respectivamente.

B.3. CELECOXIBE- CARRAGENINA

Para este grupo foi observado que após 1 e 2 horas a temperatura da pata esquerda aumentou para todos os animais. Após 3, 5 e 7 horas a temperatura diminuiu para todos os animais em relação ao período anterior, exceto para o animal B, para o qual a temperatura aumentou após 5 horas. No entanto, após 9 horas a temperatura aumentou para o animal D. E, após 11 horas aumentou para os animais A e B, e diminuiu para o animal D. A Tabela 3.5.37 apresenta esses dados.

Animal	1h	2h	3h	5h	7h	9h	11h
A	4,1	7,6	6,5	5,7	4,4	2,1	4,7
B	4,1	6	2,4	5,3	3,5	3,4	5,7
C	2,6	7,9	7,5	2,1	5,2	3,8	2,4
D	5,6	6,5	3,4	4,4	3,3	4,1	2

A figura 3.5.37 apresenta as medidas das temperaturas para cada animal.

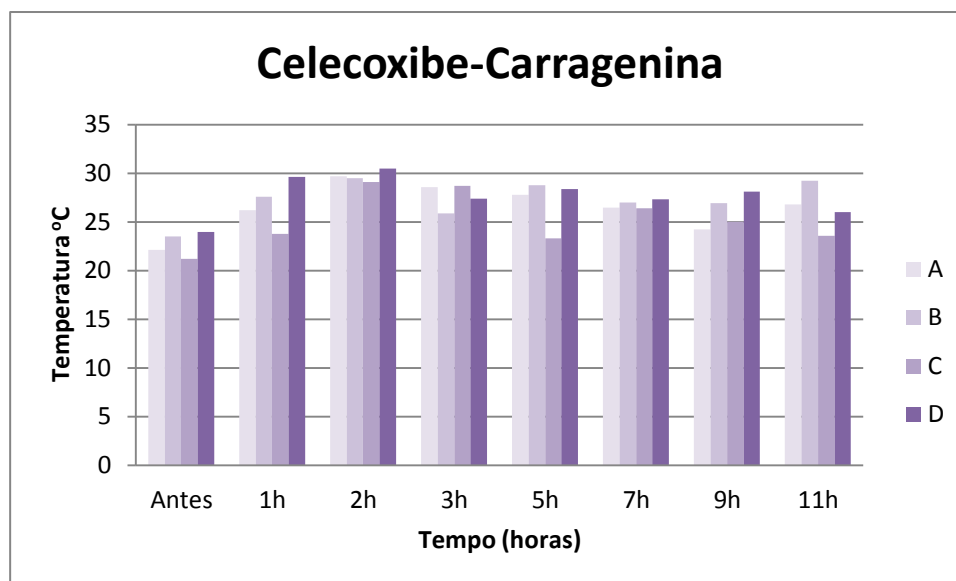


Figura 3.5.37. Temperatura da pata dos animais do grupo Celecoxibe-Carragenina. O eixo das ordenadas mostra o tempo em horas e o eixo das abcissas apresenta temperatura em °C. Os animais A, B, C e D estão apresentados em tons de roxo, do tom mais claro para o tom mais escuro, respectivamente.

B.4. 6Br- CARRAGENINA

A temperatura da pata esquerda aumentou após 1 e 2 horas para todos os animais do grupo, diminuindo após 3 horas da aplicação da carragenina. No entanto, após 5 horas aumentou para os animais A e C. Após 7 horas a temperatura aumentou para os animais B e D, e diminuiu para os animais A e C. Após 9 horas diminuiu para os animais A, B e D, e aumentou para o animal C. E, após 11 horas diminuiu para os animais A e C, e aumentou para os animais B e D. Na Tabela 3.5.38 estão apresentados os dados citados.

Tabela 3.5.38. Variação da temperatura (°C) para a pata esquerda do grupo 6Br-Carragenina

Animal	1h	2h	3h	5h	7h	9h	11h
A	3,6	4,5	3,4	6	4,3	3	2
B	3,1	5,9	3,5	3,4	4,9	4,2	6,1
C	1,6	5,6	2,5	5	3,5	5,1	2,5
D	2,1	3,7	3,4	3,4	3,7	2	5,5

A figura 3.5.38 apresenta as medidas das temperaturas para cada animal.

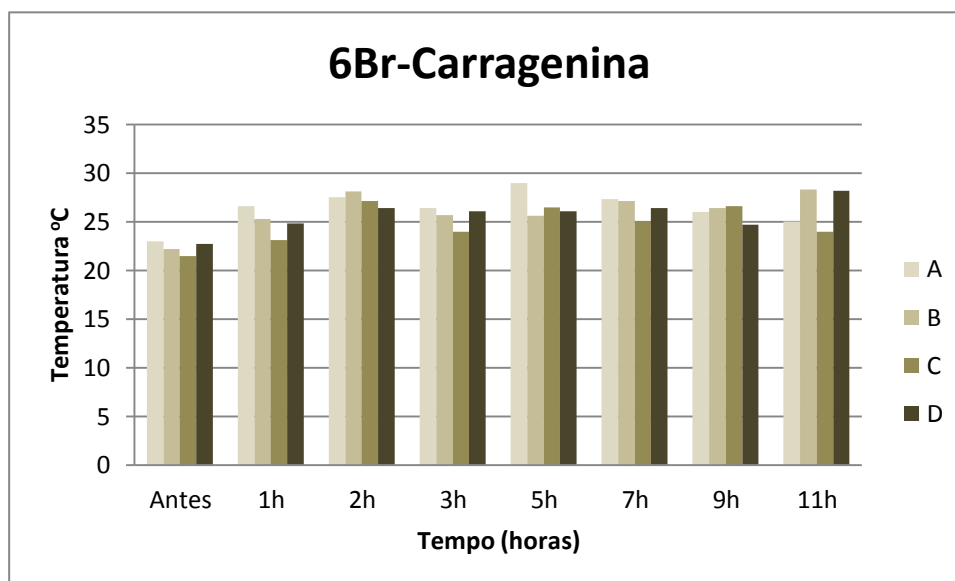


Figura 3.5.38. Temperatura da pata dos animais do grupo 6Br-Carragenina. O eixo das ordenadas mostra o tempo em horas e o eixo das abcissas apresenta temperatura em °C. Os animais A, B, C e D estão apresentados em tons de marrom, do tom mais claro para o tom mais escuro, respectivamente.

B.5. 10-OCH₃- CARRAGENINA

Para o grupo 10-OCH₃-Carragenina, a temperatura da pata esquerda aumentou após 1 e 2 horas, diminuindo após 3 horas para todos os animais. Após 5 horas aumentou para todos os animais, diminuindo após 7 horas para o animal B, aumentando para os animais A, C e D. Após 9 horas a temperatura diminuiu para os animais A e C, e aumentou para os animais B e D. E, após 11 horas apenas diminuiu para o animal B. Essa variação está apresentada na Tabela 3.5.39.

Animal	1h	2h	3h	5h	7h	9h	11h
A	2,9	4,8	4,1	4,9	6,2	4,5	6,3
B	2,8	5,0	1,9	5,0	3,3	4,0	2,8
C	2,8	3,4	-0,1	3,6	4,4	1,8	4,2
D	4,4	5,9	3,9	2,5	3,9	6,4	7,9

A figura 3.5.39 apresenta as medidas das temperaturas para cada animal.

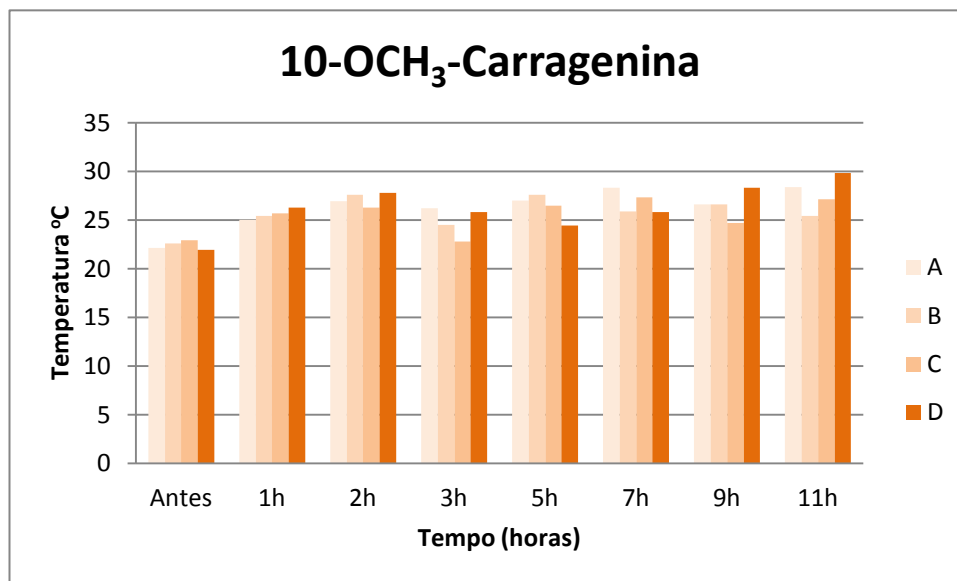


Figura 3.5.39. Temperatura da pata dos animais do grupo 10-OCH₃-Carragenina. O eixo das ordenadas mostra o tempo em horas e o eixo das abcissas apresenta temperatura em °C. Os animais A, B, C e D estão apresentados em tons de laranja, do tom mais claro para o tom mais escuro, respectivamente.

C. GRUPOS COM ZYMOSAN

C.1. CONTROLE-ZYMOSAN

Para o grupo controle Zymosan foi observado que a temperatura da pata esquerda aumentou após 1 e 2 horas, diminuindo após 3 horas para todos os animais. Após 5 horas diminuiu apenas para o animal A, aumentando após 7 horas para todos os animais. Após 9 horas diminuiu para os animais A e C, e aumentou para o animal B. Após 11 horas diminuiu para todos os animais. A Tabela 3.5.40 apresenta esses dados.

Animal	1h	2h	3h	5h	7h	9h	11h
A	8,7	6,5	5,9	1,3	6,7	4,4	0,3
B	9,1	8,7	4	7	7	7,9	0,1
C	2,7	7,3	1,1	4,7	5	3,5	1,8

A figura 3.5.40 apresenta as medidas das temperaturas para cada animal.

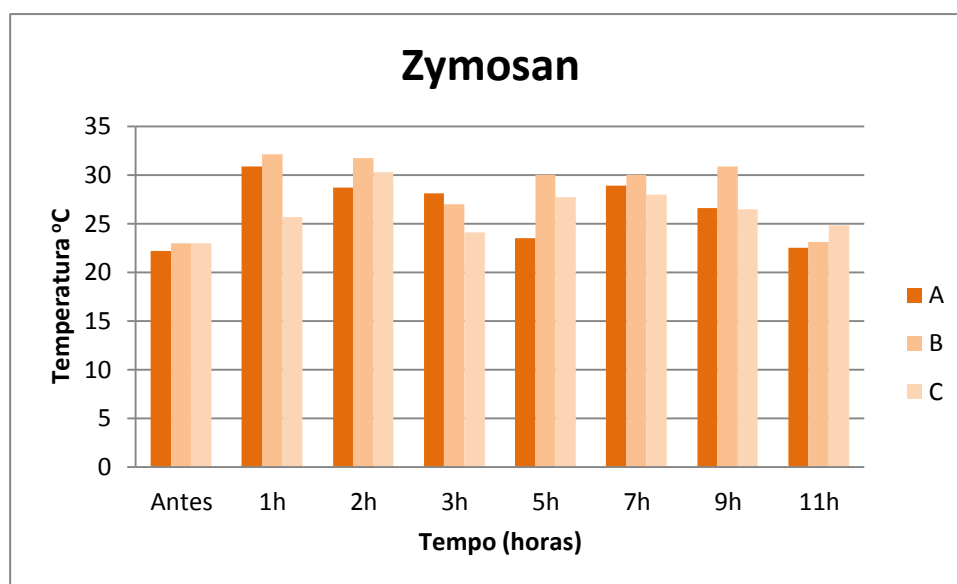


Figura 3.5.40. Temperatura da pata dos animais do grupo Controle-Zymosan. O eixo das ordenadas mostra o tempo em horas e o eixo das abcissas apresenta temperatura em °C. Os animais A, B, C e D estão apresentados em tons de laranja, do tom mais escuro para o tom mais claro, respectivamente.

C.2. 5OCH₃- ZYMOSAN

A temperatura da pata para esse grupo aumentou após 1 hora da aplicação do zymosan e diminuiu após 2 horas apenas para os animais A e C. Após 3 horas aumentou para os animais A, B e C e diminuiu para o animal D. Após 5 horas aumentou para todos os animais, diminuindo após 7 horas para os animais A, B e D e aumentando para o animal C. Após 9 horas a temperatura diminuiu para os animais B, C e D. E, após 11 horas diminuiu apenas para o animal A, e aumentou para os outros animais. Essa variação está apresentada na Tabela 3.5.41.

Animal	1h	2h	3h	5h	7h	9h	11h
A	3,2	1,7	2,5	6,4	5,9	5,9	5,1
B	2,8	2,8	2,2	3,7	5,5	2,3	4,5
C	1,9	1,4	2,5	6	8,1	0,7	2,9
D	1,6	2,7	1,6	9,3	6,6	1,9	3,7

A figura 3.5.41 apresenta as medidas das temperaturas para cada animal.

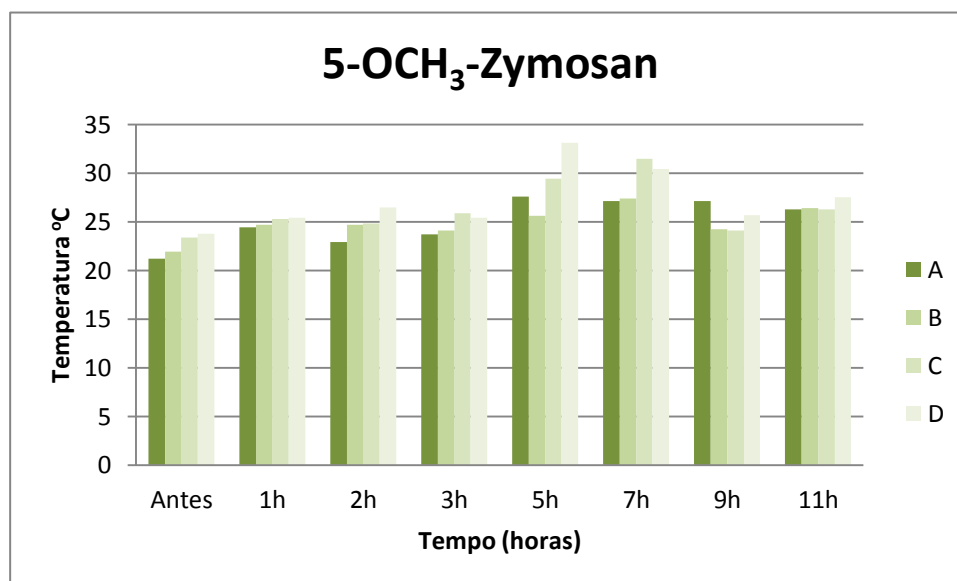


Figura 3.5.41. Temperatura da pata dos animais do grupo 5-OCH₃-Zymosan. O eixo das ordenadas mostra o tempo em horas e o eixo das abcissas apresenta temperatura em °C. Os animais A, B, C e D estão apresentados em tons de verde, do tom mais escuro para o tom mais claro, respectivamente.

C.3. CELECOXIBE- ZYMOSAN

Para este grupo a temperatura aumentou após 1 hora da aplicação, diminuindo após 2 horas apenas para o animal A. Após 3 horas diminuiu para os animais B, C e D e aumentou para o animal A. Após 5 e 7 horas aumentou para todos os animais, exceto para o animal D, para o qual a temperatura diminuiu após 7 horas. Após 9 horas diminuiu para todos os animais. E, após 11 horas apenas aumentou para o animal B. Esses dados estão apresentados na Tabela 3.5.42.

Animal	1h	2h	3h	5h	7h	9h	11h
A	5,8	2,7	5,1	5,8	8,2	2,8	2,3
B	8,1	8,9	5,2	7,3	8,2	4,0	4,3
C	1,7	4,9	3,6	5,4	5,7	4,7	3,1
D	5,5	7,2	5,2	9,1	6,1	5,5	5,4

A figura 3.5.42 apresenta as medidas das temperaturas para cada animal.

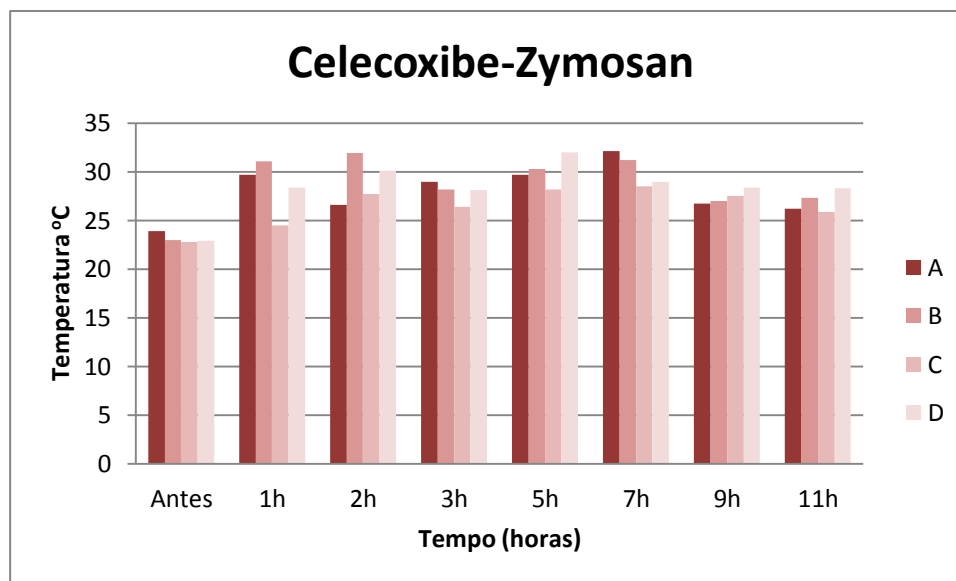


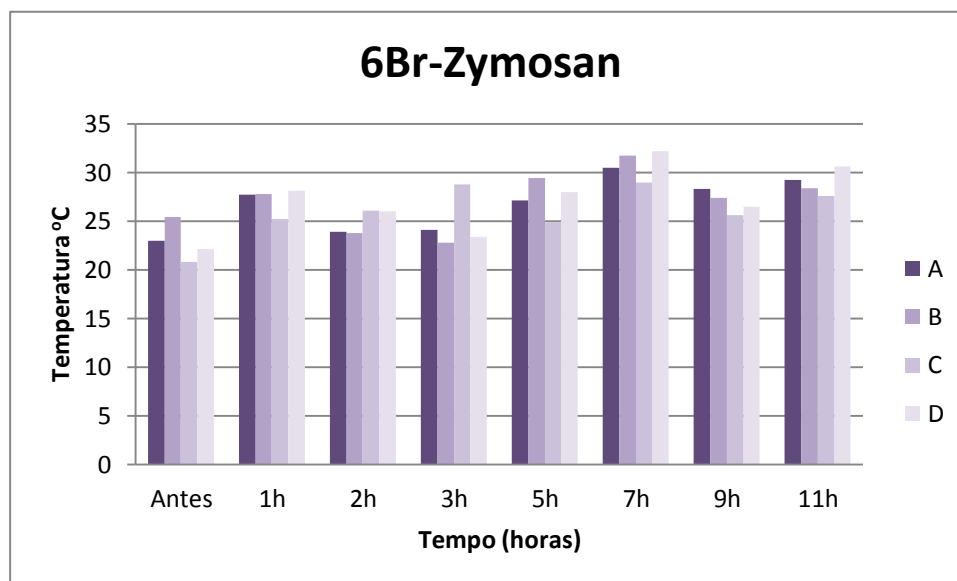
Figura 3.5.42. Temperatura da pata dos animais do grupo Celecoxibe-Zymosan. O eixo das ordenadas mostra o tempo em horas e o eixo das abcissas apresenta temperatura em °C. Os animais A, B, C e D estão apresentados em tons de vermelho, do tom mais escuro para o tom mais claro, respectivamente.

C.4. 6BR- ZYMOSAN

Foi possível observar que a temperatura aumentou após 1 hora e diminuiu para os animais A, B e D após 2 horas. Neste período, e após 3 horas o animal B apresentou temperatura menor que a inicial. Após 3 horas, a temperatura aumentou para os animais A e C e diminuiu para o animal D. Após 5 horas apenas diminuiu para o animal C e aumentou para os outros animais. Após 7 horas também aumentou para todos os animais. Após 9 horas diminuiu para todos os animais. E, após 11 horas aumentou novamente para todos os animais. A Tabela 3.5.43 apresenta essa variação.

Animal	1h	2h	3h	5h	7h	9h	11h
A	4,7	0,9	1,1	4,1	7,5	5,3	6,2
B	2,4	-1,6	-2,6	4	6,3	2	3
C	4,4	5,3	8	4,1	8,2	4,8	6,8
D	6	3,9	1,3	5,9	10,1	4,4	8,5

A figura 3.5.43 apresenta as medidas das temperaturas para cada animal.



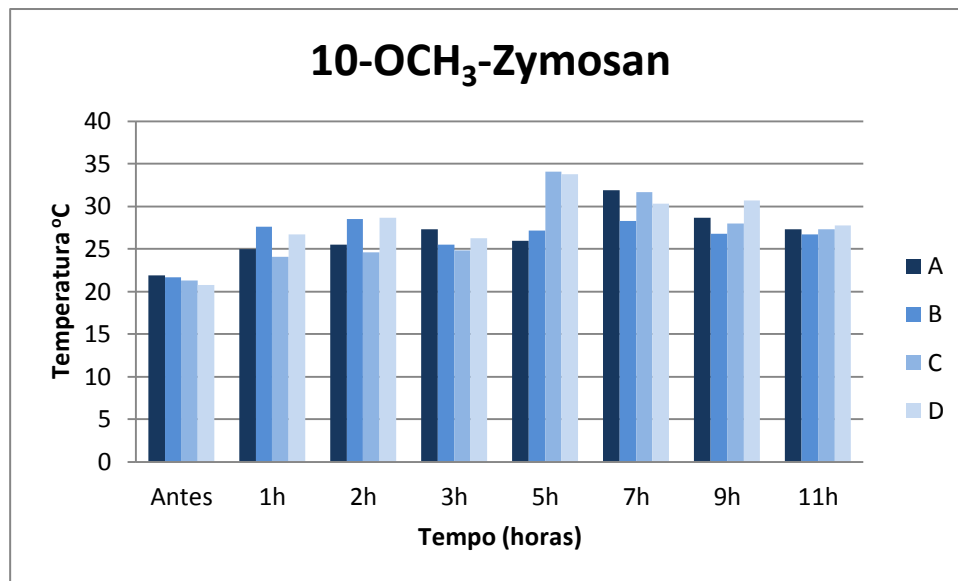
3.5.43. Temperatura da pata dos animais do grupo 6Br-Zymosan. O eixo das ordenadas mostra o tempo em horas e o eixo das abcissas apresenta temperatura em °C. Os animais A, B, C e D estão apresentados em tons de roxo, do tom mais escuro para o tom mais claro, respectivamente.

C.5. 10-OCH₃- ZYMOSAN

Para o grupo 10-OCH₃-Zymosan a temperatura aumentou após 1 e 2 horas da aplicação do zymosan. Após 3 horas diminuiu para os animais B e D e aumentou para os animais A e C. Após 5 horas diminuiu para apenas o animal A e aumentou para os demais. Após 7 horas diminuiu apenas para o animal C e aumentou para os demais. Após 9 horas aumentou para o animal D e diminuiu para os demais. Após 11 horas diminuiu para todos os animais. Esses dados estão apresentados na Tabela 3.5.44.

Animal	1h	2h	3h	5h	7h	9h	11h
A	3,1	3,6	5,4	4,1	10	6,8	5,4
B	5,9	6,8	3,8	5,5	6,6	5,1	5,0
C	2,8	3,3	3,5	12,8	10,4	6,7	6,0
D	5,9	7,9	5,5	13	9,5	9,9	7,0

A figura 3.5.44 apresenta as medidas das temperaturas para cada animal.



3.5.44. Temperatura da pata dos animais do grupo 10-OCH₃-Zymosan. O eixo das ordenadas mostra o tempo em horas e o eixo das abcissas apresenta temperatura em °C. Os animais A, B, C e D estão apresentados em tons de azul, do tom mais escuro para o tom mais claro, respectivamente.

APÊNDICE 3.6

Nesta seção são apresentadas as imagens obtidas para o Experimento II com a câmera termográfica.

3.6.1. EXPERIMENTO II

3.6.1.1 PBS

3.6.1.1.1 ANIMAL A

3.6.1.1.2 ANIMAL B

3.6.1.1.3 ANIMAL C

3.6.1.2 CARRAGENINA

3.6.1.2.1 ANIMAL A

3.6.1.2.2 ANIMAL B

3.6.1.2.3 ANIMAL C

3.6.1.3 5-OCH₃-CARRAGENINA

3.6.1.3.1 ANIMAL A

3.6.1.3.2 ANIMAL B

3.6.1.3.3 ANIMAL C

3.6.1.3.4 ANIMAL D

3.6.1.4 CELECOXIB-CARRAGENINA

3.6.1.4.1 ANIMAL A

3.6.1.4.2 ANIMAL B

3.6.1.4.3 ANIMAL C

3.6.1.4.4 ANIMAL D

3.6.1.5 6Br-CARRAGENINA

3.6.1.5.1 ANIMAL A

3.6.1.5.2 ANIMAL B

3.6.1.5.3 ANIMAL C

3.6.1.5.4 ANIMAL D

3.6.1.6 10-OCH₃-CARRAGENINA

3.6.1.6.1 ANIMAL A

3.6.1.6.2 ANIMAL B

3.6.1.6.3 ANIMAL C

3.6.1.6.4 ANIMAL D

3.6.1.7 ZYMOSAN

3.6.1.7.1 ANIMAL A

3.6.1.7.2 ANIMAL B

3.6.1.7.3 ANIMAL C

3.6.1.8 5-OCH₃-ZYMOSAN

3.6.1.8.1 ANIMAL A

3.6.1.8.2 ANIMAL B

3.6.1.8.3 ANIMAL C

3.6.1.8.4 ANIMAL D

3.6.1.9 CELECOXIB-ZYMOSAN

3.6.1.9.1 ANIMAL A

3.6.1.9.2 ANIMAL B

3.6.1.9.3 ANIMAL C

3.6.1.9.4 ANIMAL D

3.6.1.10 6Br-ZYMOSAN

3.6.1.10.1 ANIMAL A

3.6.1.10.2 ANIMAL B

3.6.1.10.3 ANIMAL C

3.6.1.10.4 ANIMAL D

3.6.1.11 10-OCH₃-ZYMOSAN

3.6.1.11.1 ANIMAL A

3.6.1.11.2 ANIMAL B

3.6.1.11.3 ANIMAL C

3.6.1.11.4 ANIMAL D

3.6.1.2 EXPERIMENTO II

3.6.1.1 PBS

3.6.1.1.1 ANIMAL A

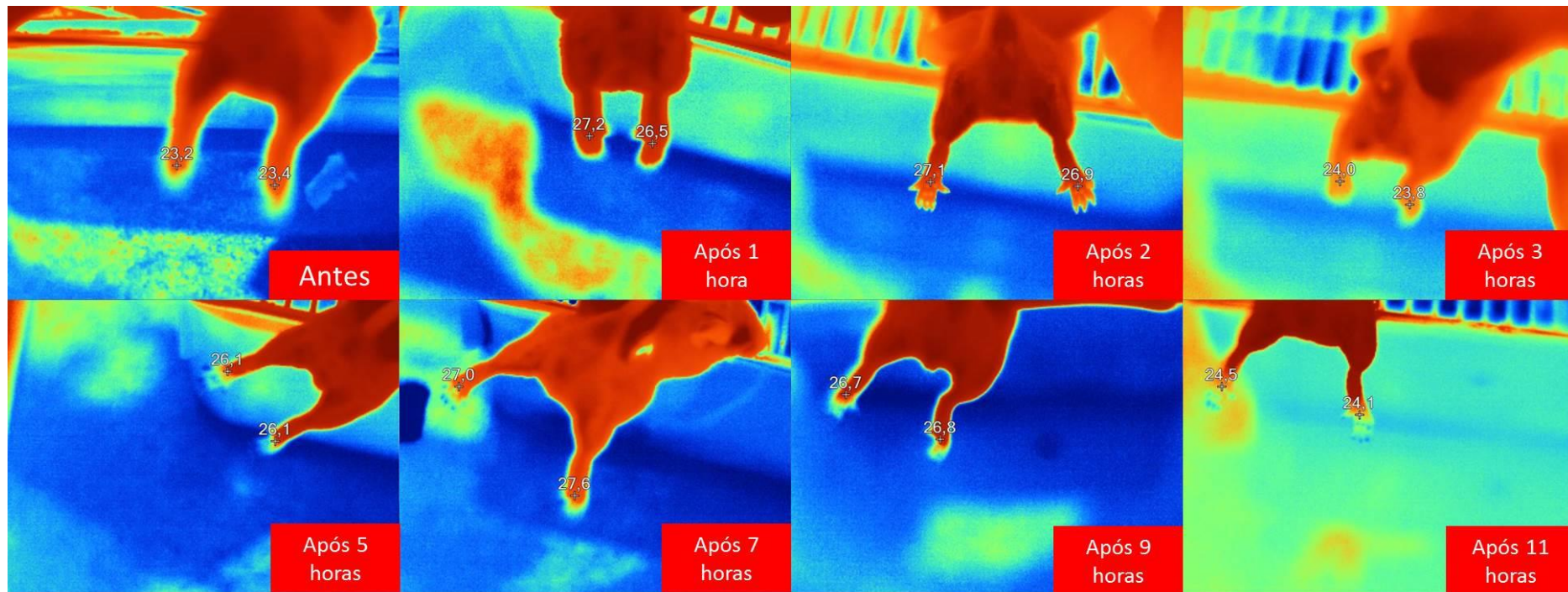


Figura 3.6.1. Temperatura em °C das patas esquerda e direita do animal A do grupo controle PBS. Estão apresentados os períodos antes e após a aplicação do PBS, identificando a temperatura para cada pata.

3.6.1.1.2 ANIMAL B

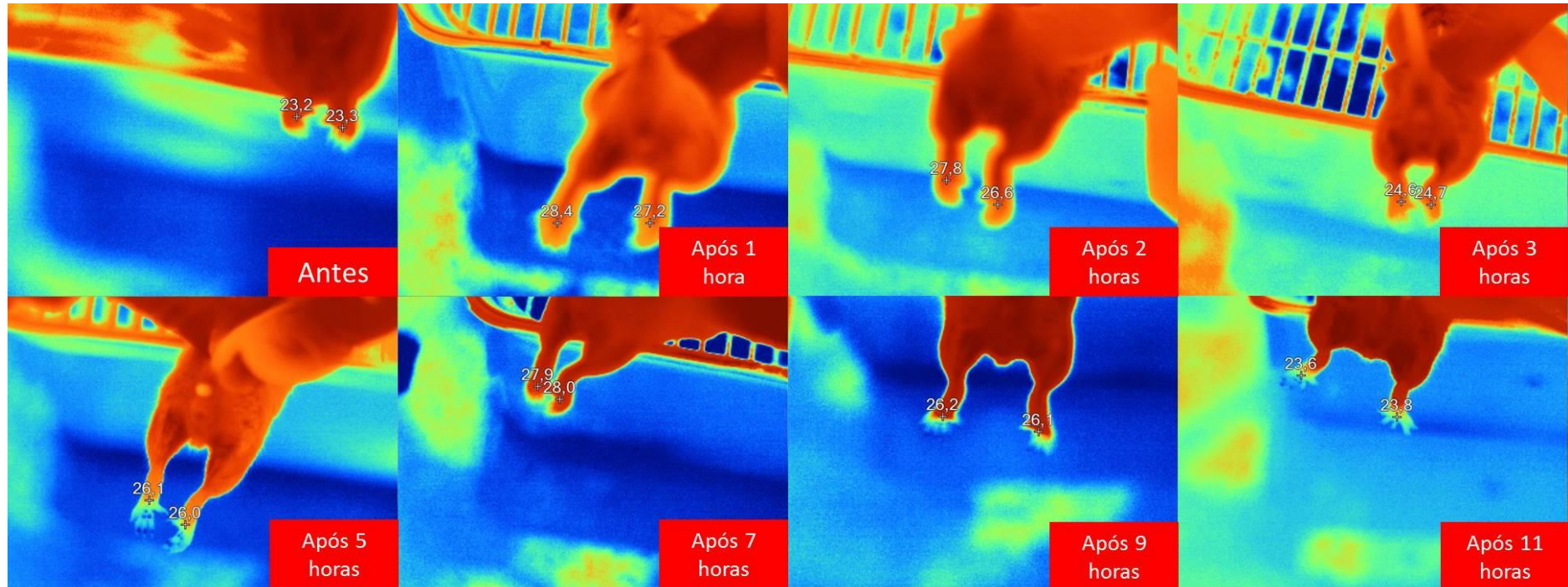


Figura 3.6.2. Temperatura em °C das patas esquerda e direita do animal B do grupo controle PBS. Estão apresentados os períodos antes e após a aplicação do PBS, identificando a temperatura para cada pata.

3.6.1.1.3 ANIMAL C

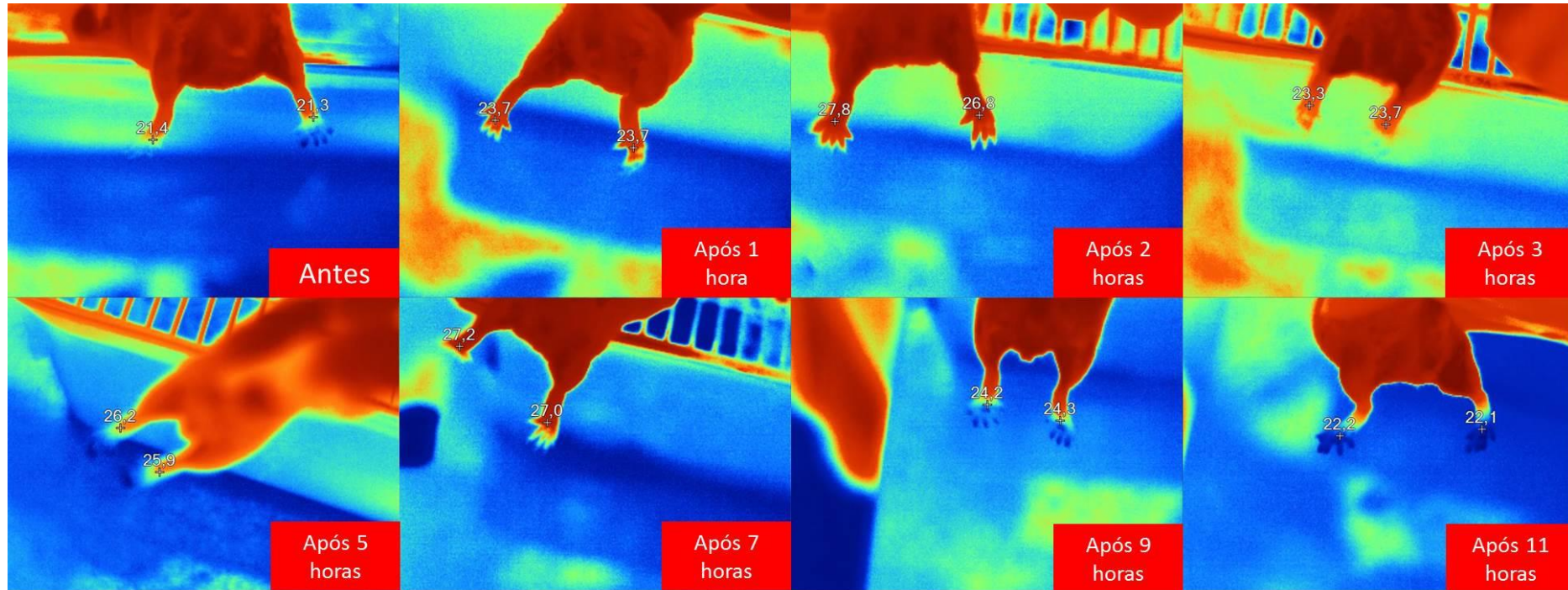


Figura 3.6.3. Temperatura em °C das patas esquerda e direita do animal C do grupo controle PBS. Estão apresentados os períodos antes e após a aplicação do PBS, identificando a temperatura para cada pata.

3.6.1.2 CARRAGENINA

3.6.1.2.1 ANIMAL A

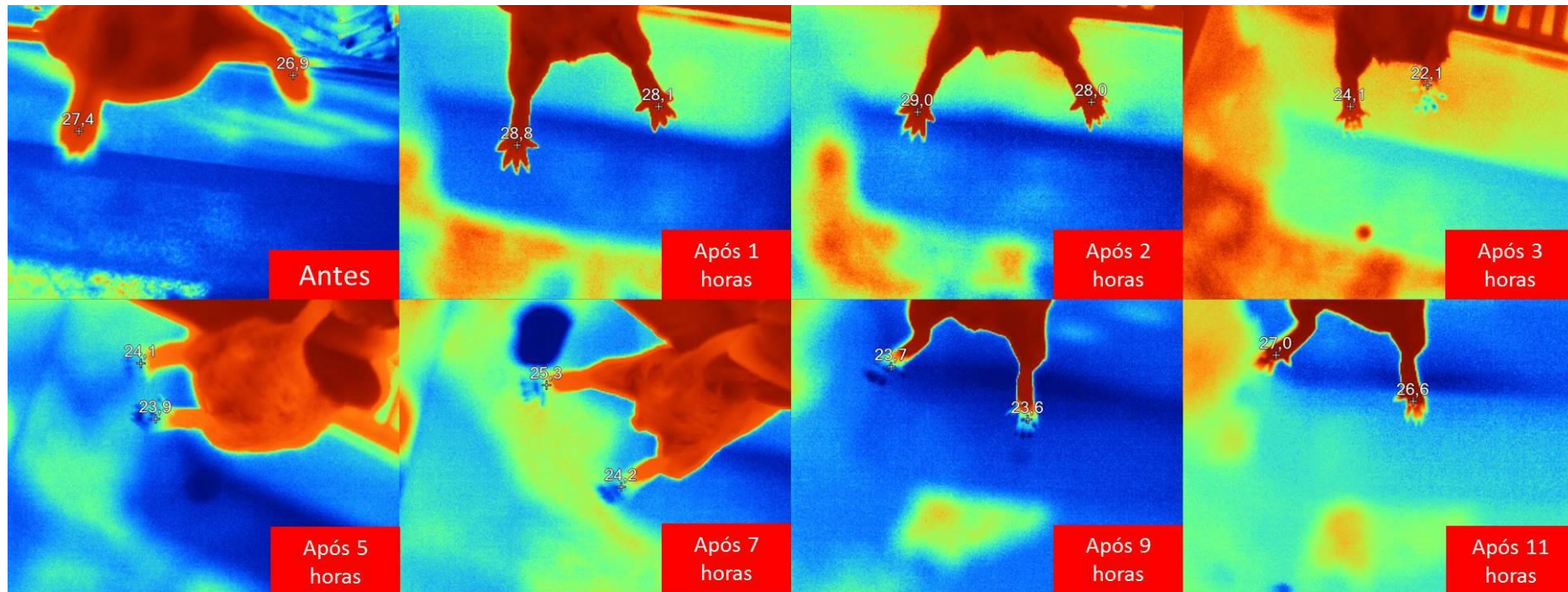


Figura 3.6.4. Temperatura em °C das patas esquerda e direita do animal A do grupo controle Carragenina. Estão apresentados os períodos antes e após a aplicação da Carragenina, identificando a temperatura para cada pata.

3.6.1.2.2 ANIMAL B

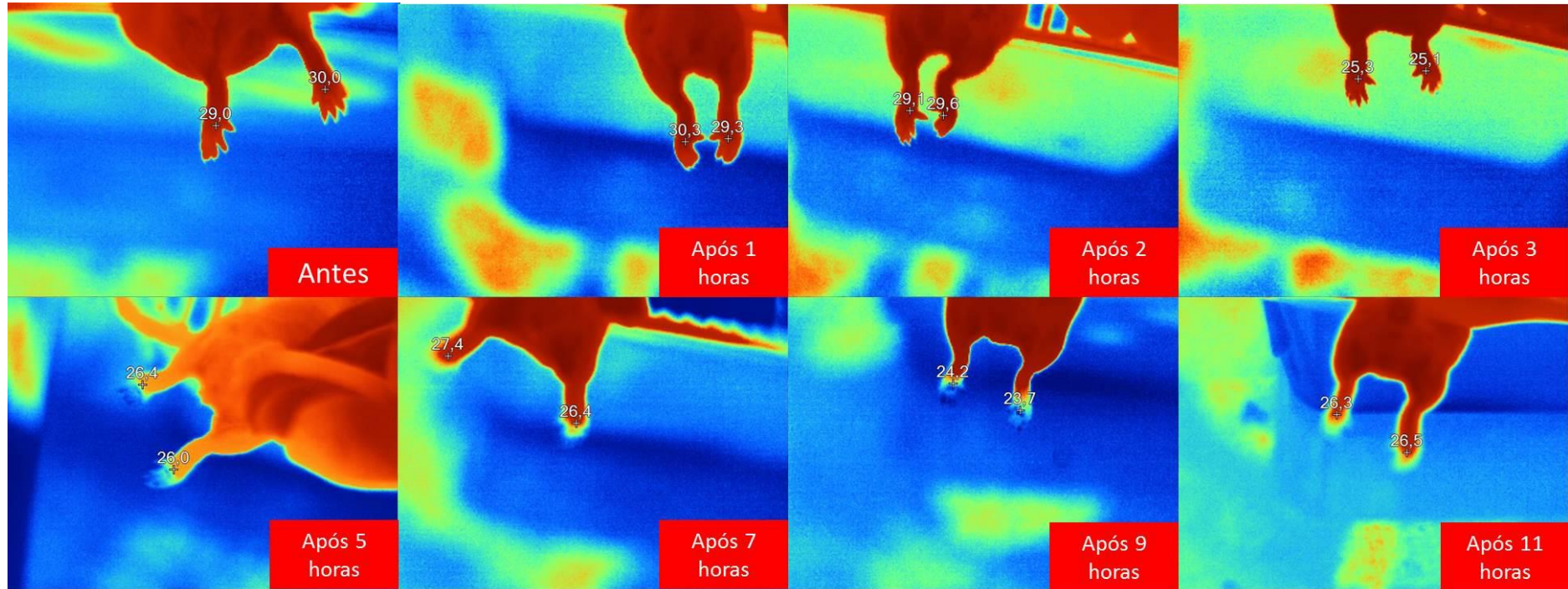


Figura 3.6.5. Temperatura em °C das patas esquerda e direita do animal B do grupo controle Carragenina. Estão apresentados os períodos antes e após a aplicação da Carragenina, identificando a temperatura para cada pata.

3.6.1.2.3 ANIMAL C

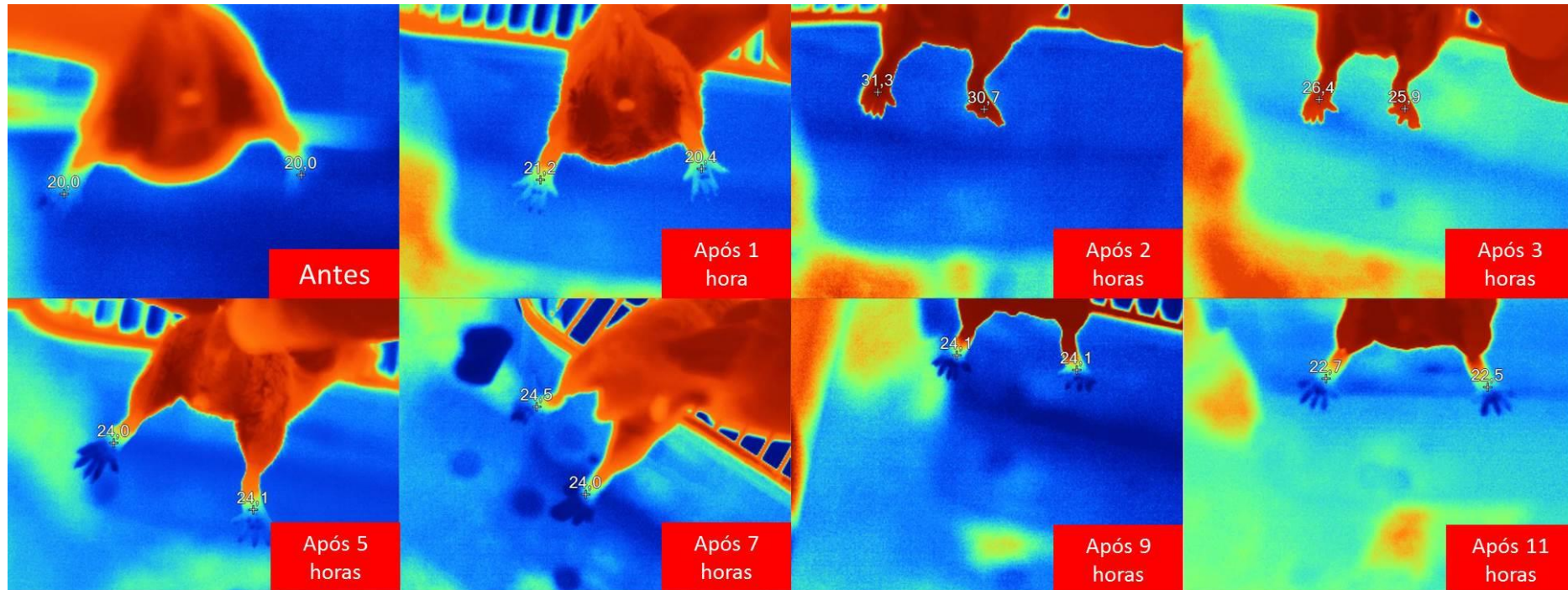


Figura 3.6.6. Temperatura em °C das patas esquerda e direita do animal C do grupo controle Carragenina. Estão apresentados os períodos antes e após a aplicação da Carragenina, identificando a temperatura para cada pata.

3.6.1.3 5-OCH₃-CARRAGENINA

3.6.1.3.1 ANIMAL A

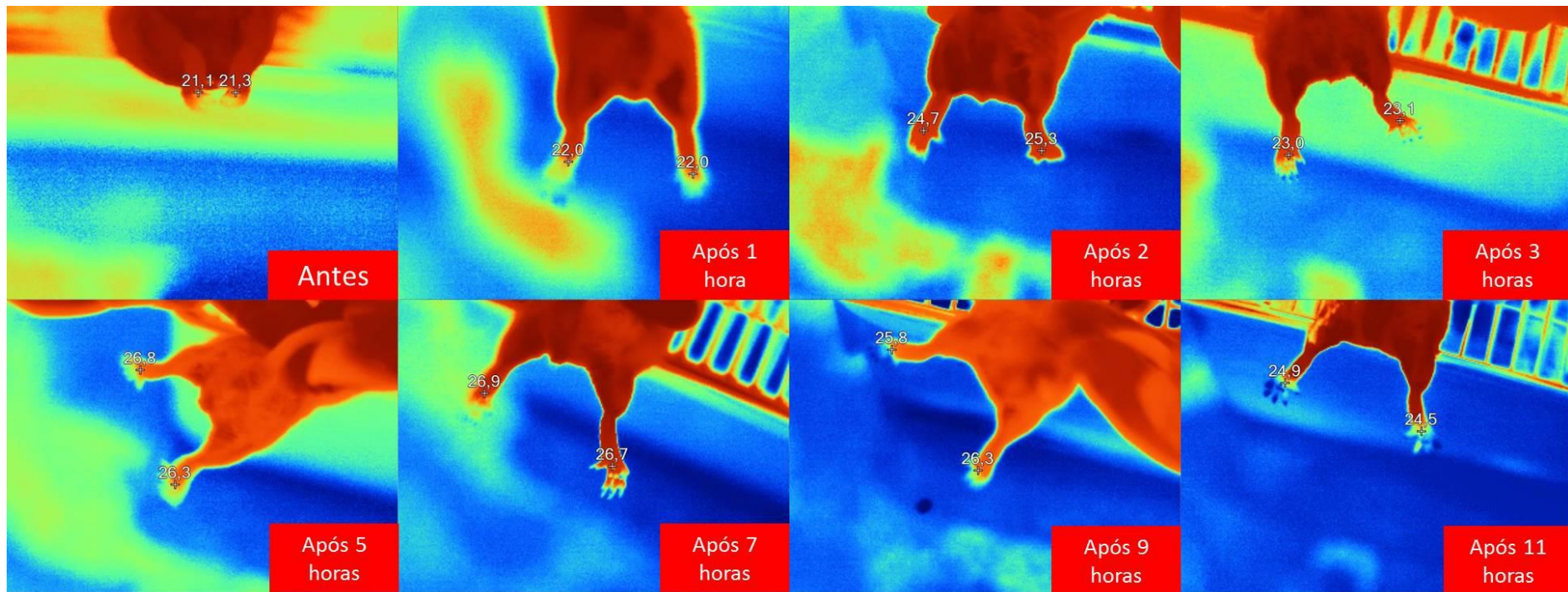


Figura 3.6.7. Temperatura em °C das patas esquerda e direita do animal A do grupo 5-OCH₃-Carragenina. Estão apresentados os períodos antes e após a aplicação da Carragenina, identificando a temperatura para cada pata.

3.6.1.3.2 ANIMAL B

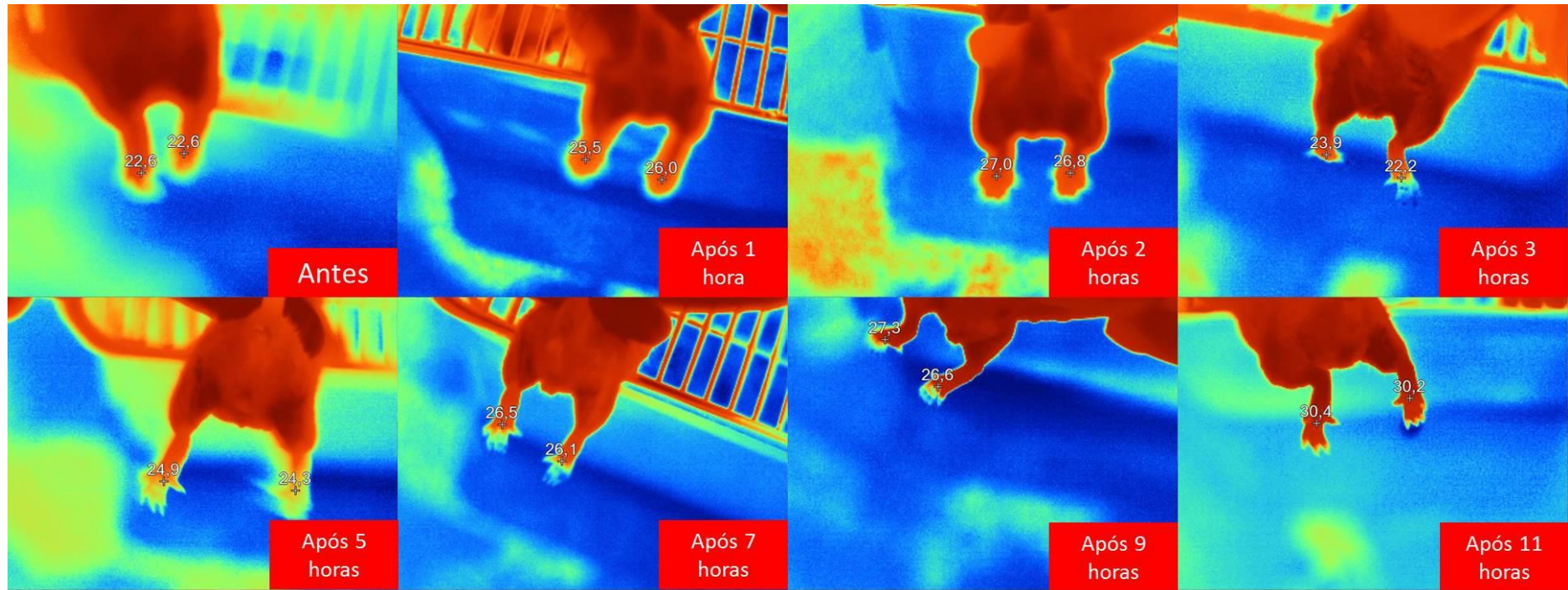


Figura 3.6.8. Temperatura em °C das patas esquerda e direita do animal B do grupo 5-OCH₃-Carragenina. Estão apresentados os períodos antes e após a aplicação da Carragenina, identificando a temperatura para cada pata.

3.6.1.3.3 ANIMAL C

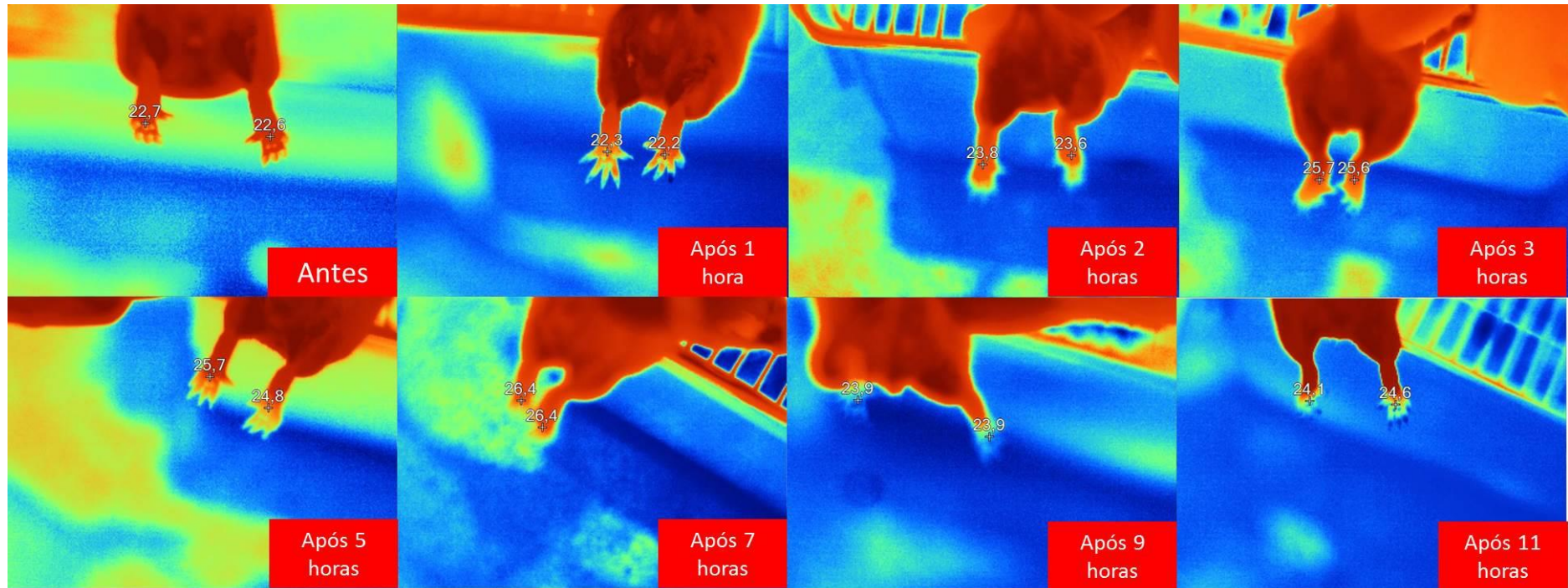


Figura 3.6.9. Temperatura em °C das patas esquerda e direita do animal C do grupo 5-OCH₃-Carragenina. Estão apresentados os períodos antes e após a aplicação da Carragenina, identificando a temperatura para cada pata.

3.6.1.3.4 ANIMAL D

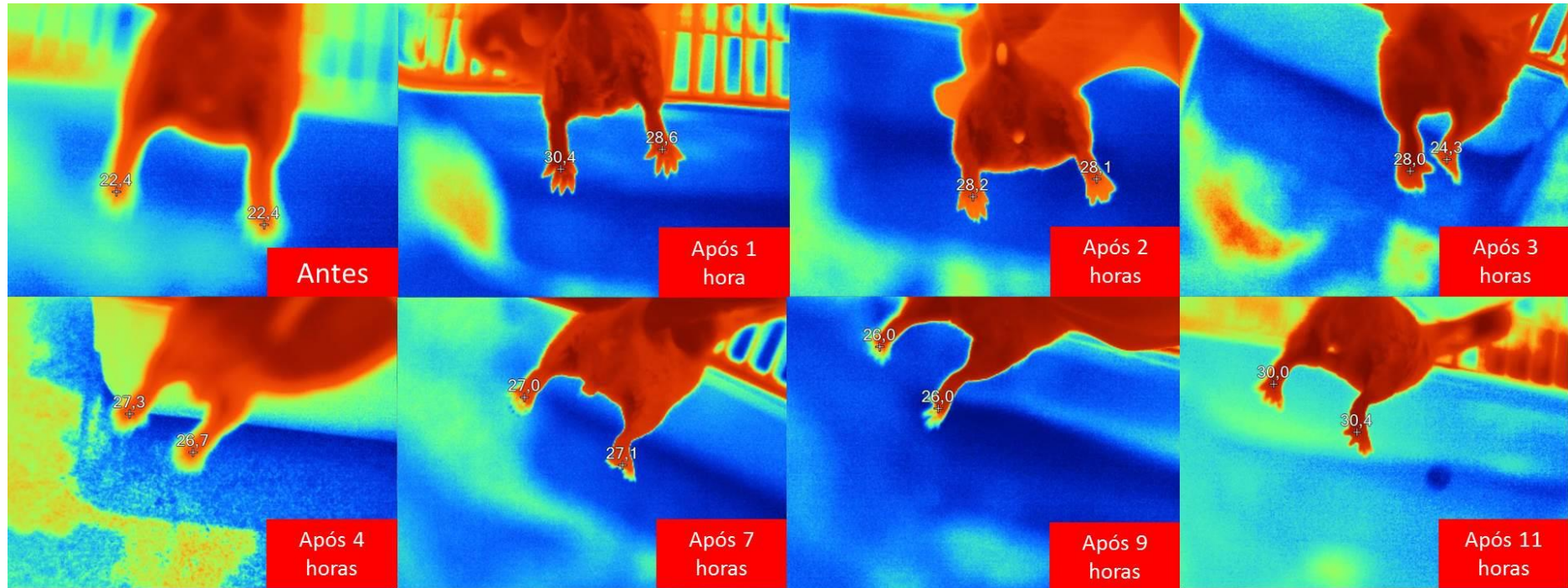


Figura 3.6.10. Temperatura em °C das patas esquerda e direita do animal D do grupo 5-OCH₃-Carragenina. Estão apresentados os períodos antes e após a aplicação da Carragenina, identificando a temperatura para cada pata.

3.6.1.4 CELECOXIB-CARRAGENINA

3.6.1.4.1 ANIMAL A

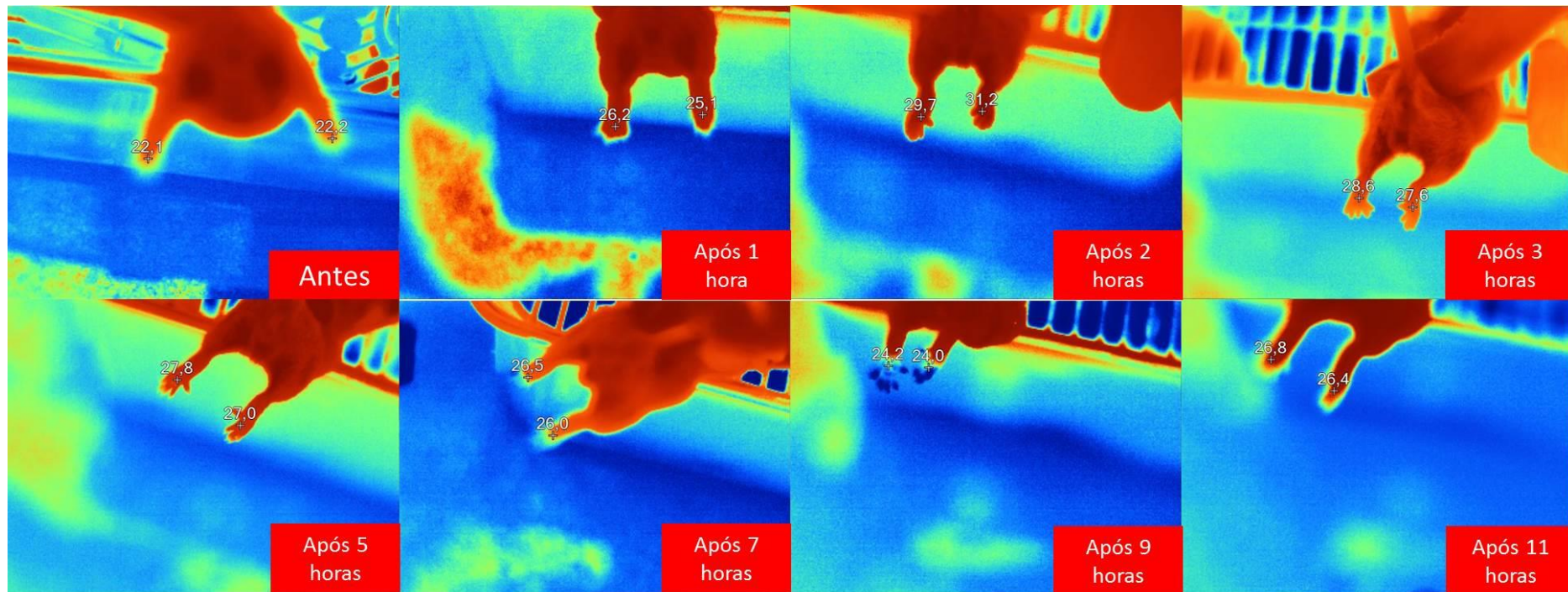


Figura 3.6.11. Temperatura em °C das patas esquerda e direita do animal A do grupo Celecoxib-Carragenina. Estão apresentados os períodos antes e após a aplicação da Carragenina, identificando a temperatura para cada pata.

3.6.1.4.2 ANIMAL B

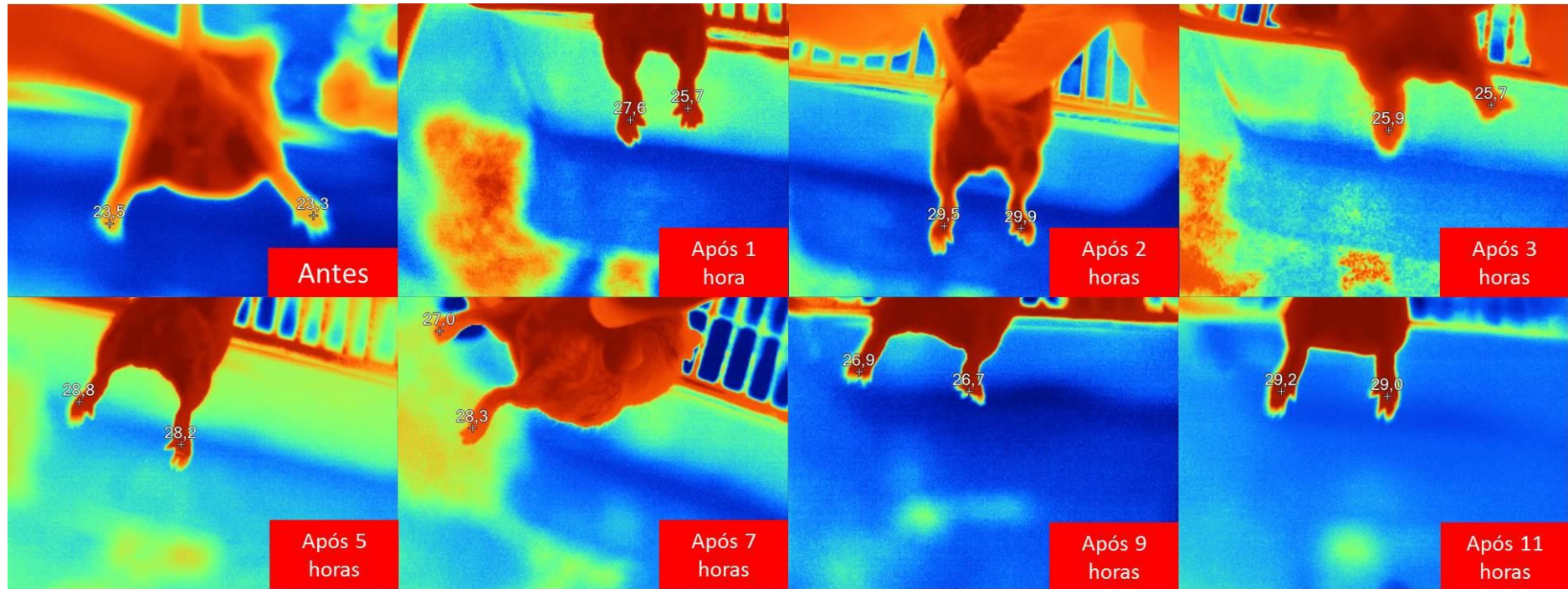


Figura 3.6.12. Temperatura em °C das patas esquerda e direita do animal B do grupo Celecoxib-Carragenina. Estão apresentados os períodos antes e após a aplicação da Carragenina, identificando a temperatura para cada pata.

3.6.1.4.3 ANIMAL C

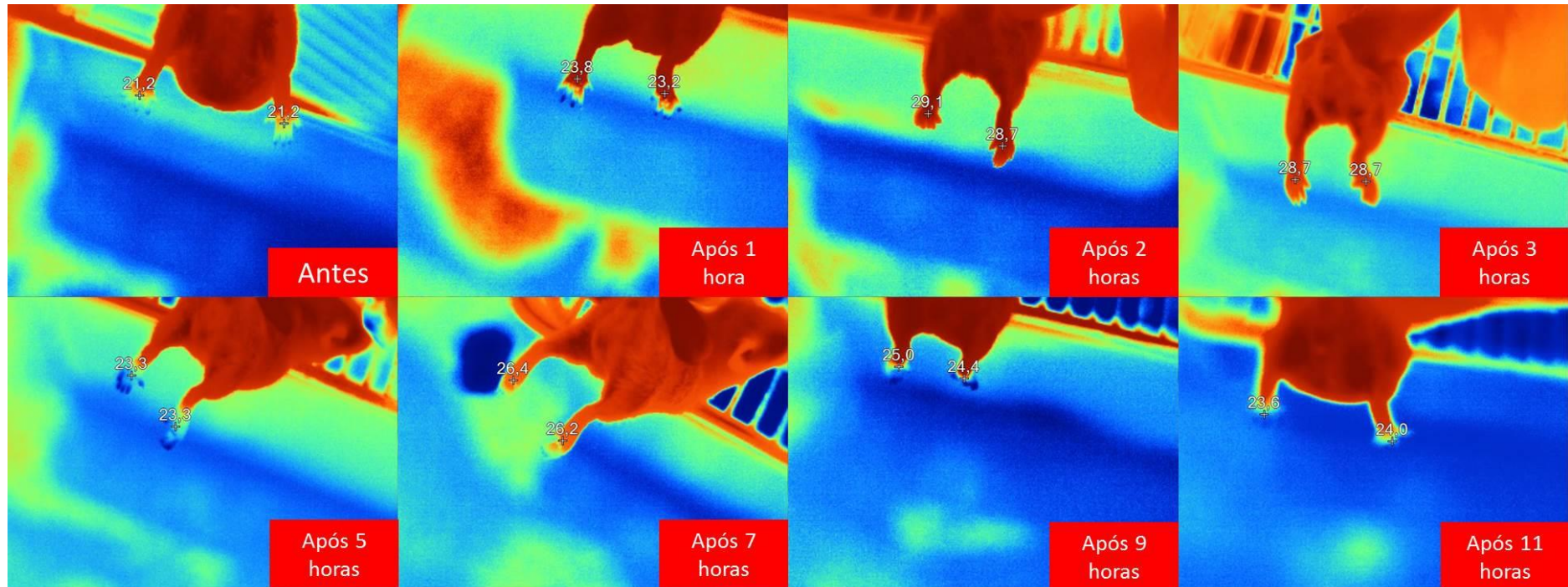


Figura 3.6.13. Temperatura em °C das patas esquerda e direita do animal C do grupo Celecoxib-Carragenina. Estão apresentados os períodos antes e após a aplicação da Carragenina, identificando a temperatura para cada pata.

3.6.1.4.4 ANIMAL D

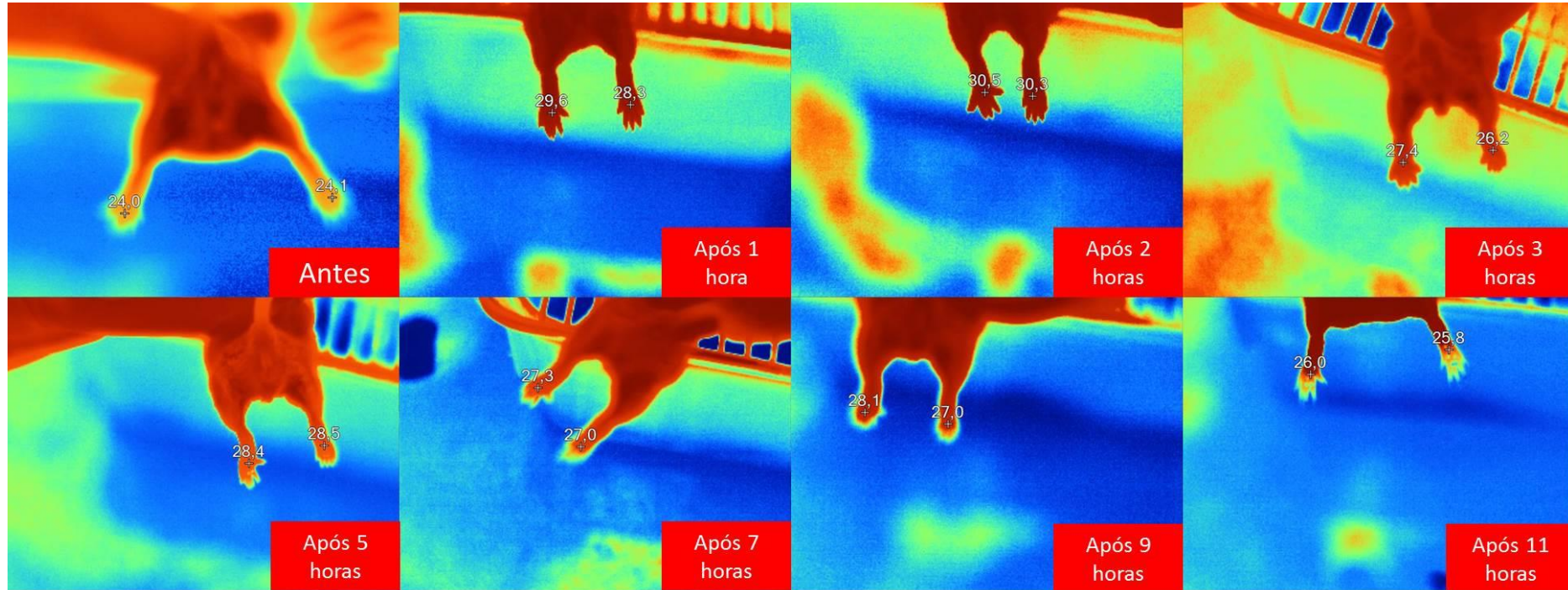


Figura 3.6.14. Temperatura em °C das patas esquerda e direita do animal D do grupo Celecoxib-Carragenina. Estão apresentados os períodos antes e após a aplicação da Carragenina, identificando a temperatura para cada pata.

3.6.1.5 6BR-CARRAGENINA

3.6.1.5.1 ANIMAL A

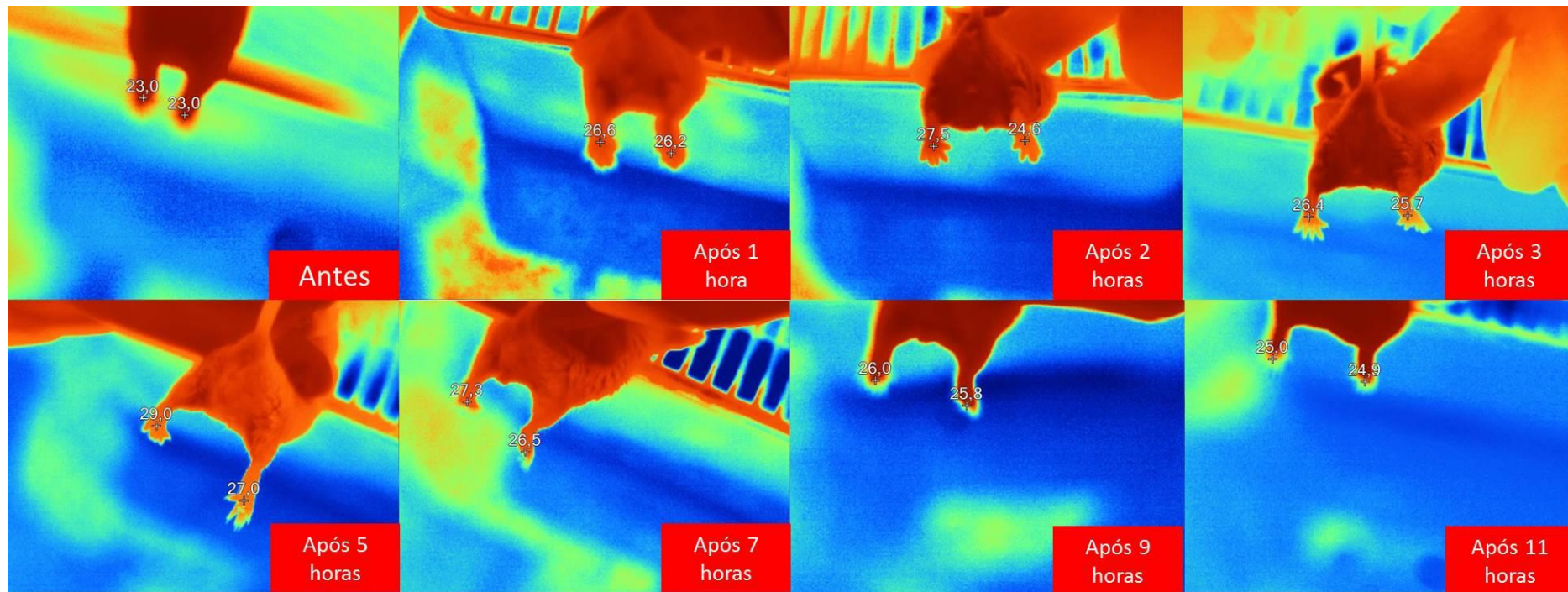


Figura 3.6.15. Temperatura em °C das patas esquerda e direita do animal A do grupo 6Br-Carragenina. Estão apresentados os períodos antes e após a aplicação da Carragenina, identificando a temperatura para cada pata.

3.6.1.5.2 ANIMAL B

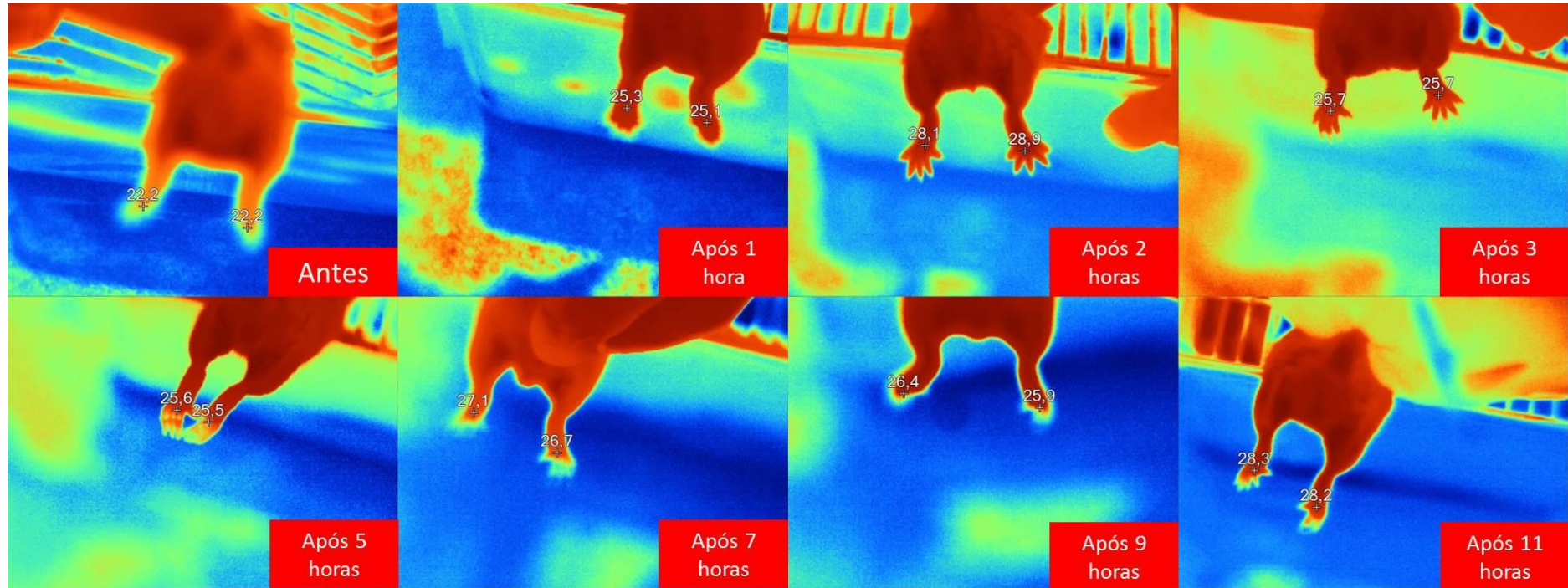


Figura 3.6.16. Temperatura em °C das patas esquerda e direita do animal B do grupo 6Br-Carragenina. Estão apresentados os períodos antes e após a aplicação da Carragenina, identificando a temperatura para cada pata.

3.6.1.5.3 ANIMAL C

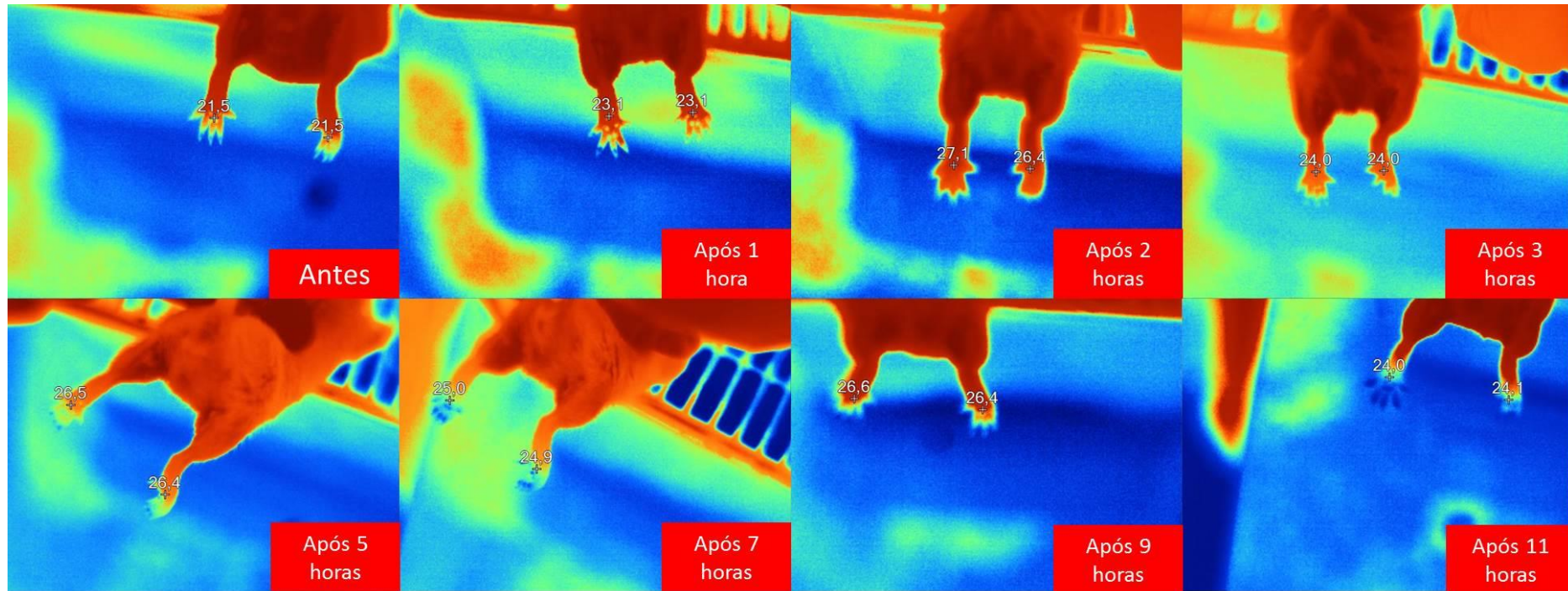


Figura 3.6.17. Temperatura em °C das patas esquerda e direita do animal C do grupo 6Br-Carragenina. Estão apresentados os períodos antes e após a aplicação da Carragenina, identificando a temperatura para cada pata.

3.6.1.5.4 ANIMAL D

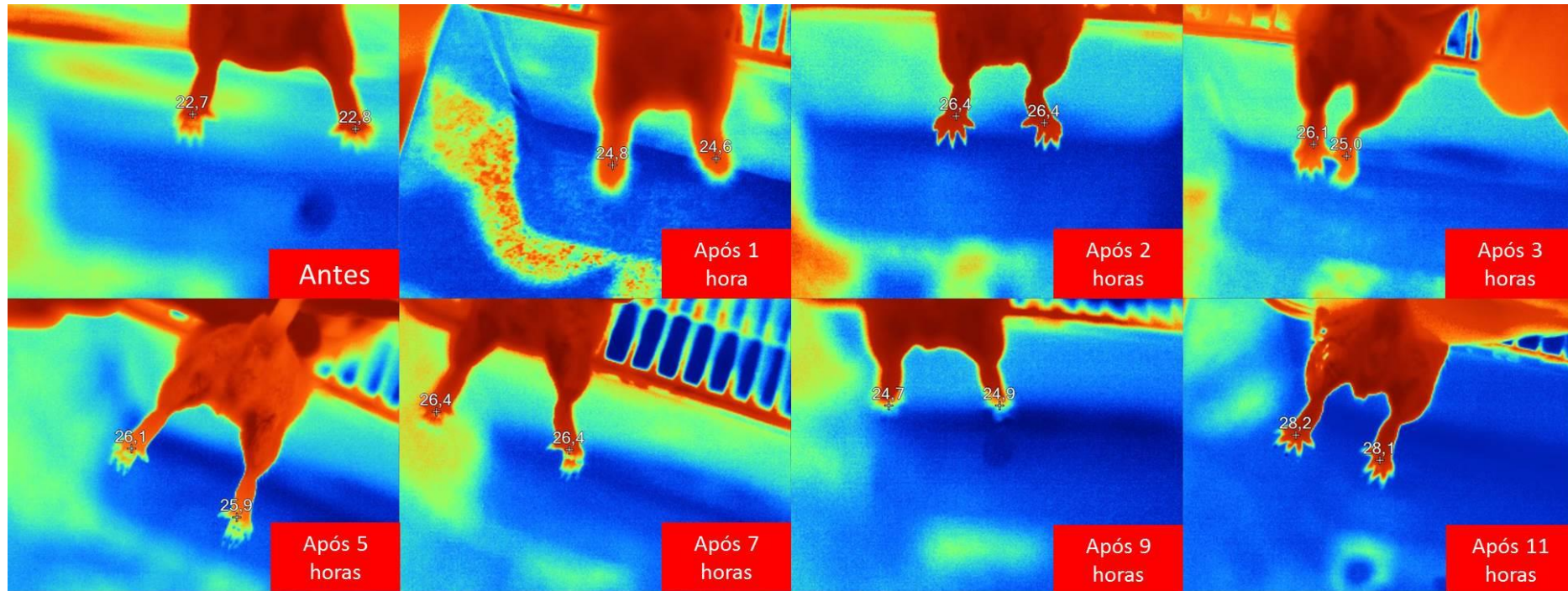


Figura 3.6.18. Temperatura em °C das patas esquerda e direita do animal D do grupo 6Br-Carragenina. Estão apresentados os períodos antes e após a aplicação da Carragenina, identificando a temperatura para cada pata.

3.6.1.6 10-OCH₃-CARRAGENINA

3.6.1.6.1 ANIMAL A

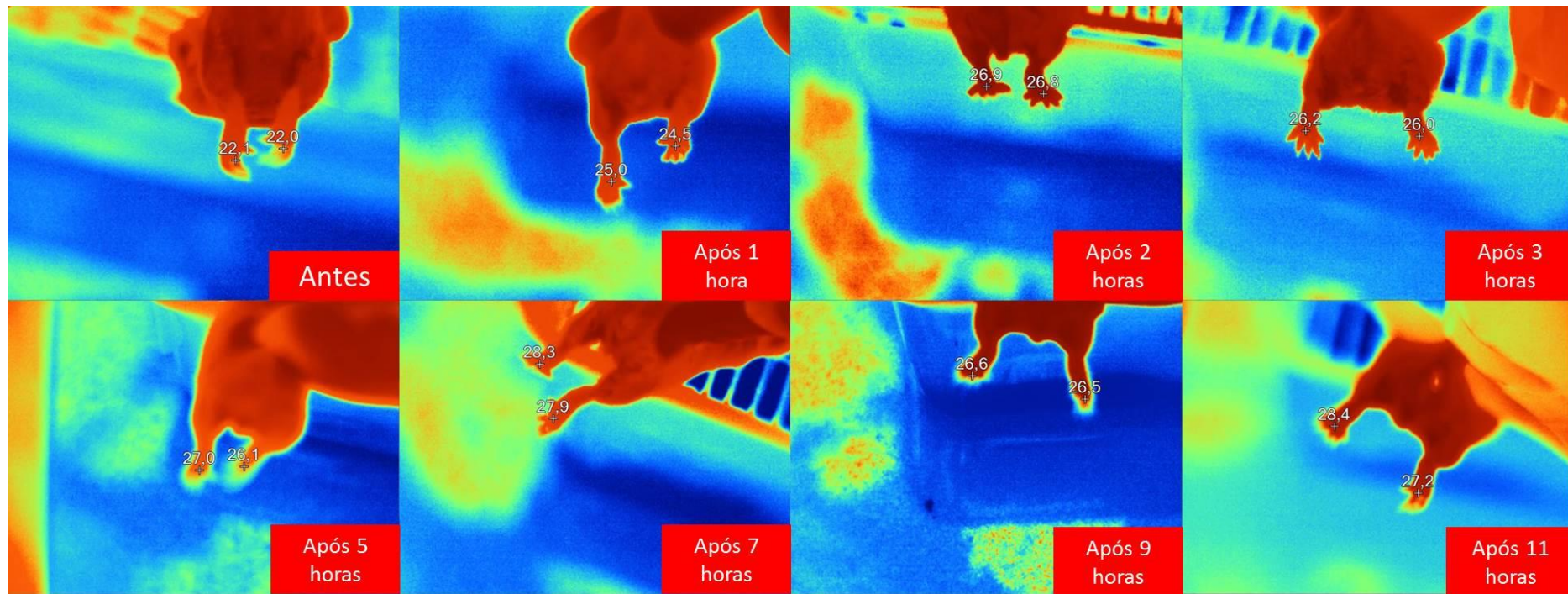


Figura 3.6.19. Temperatura em °C das patas esquerda e direita do animal A do grupo 10-OCH₃-Carragenina. Estão apresentados os períodos antes e após a aplicação da Carragenina, identificando a temperatura para cada pata.

3.6.1.6.2 ANIMAL B

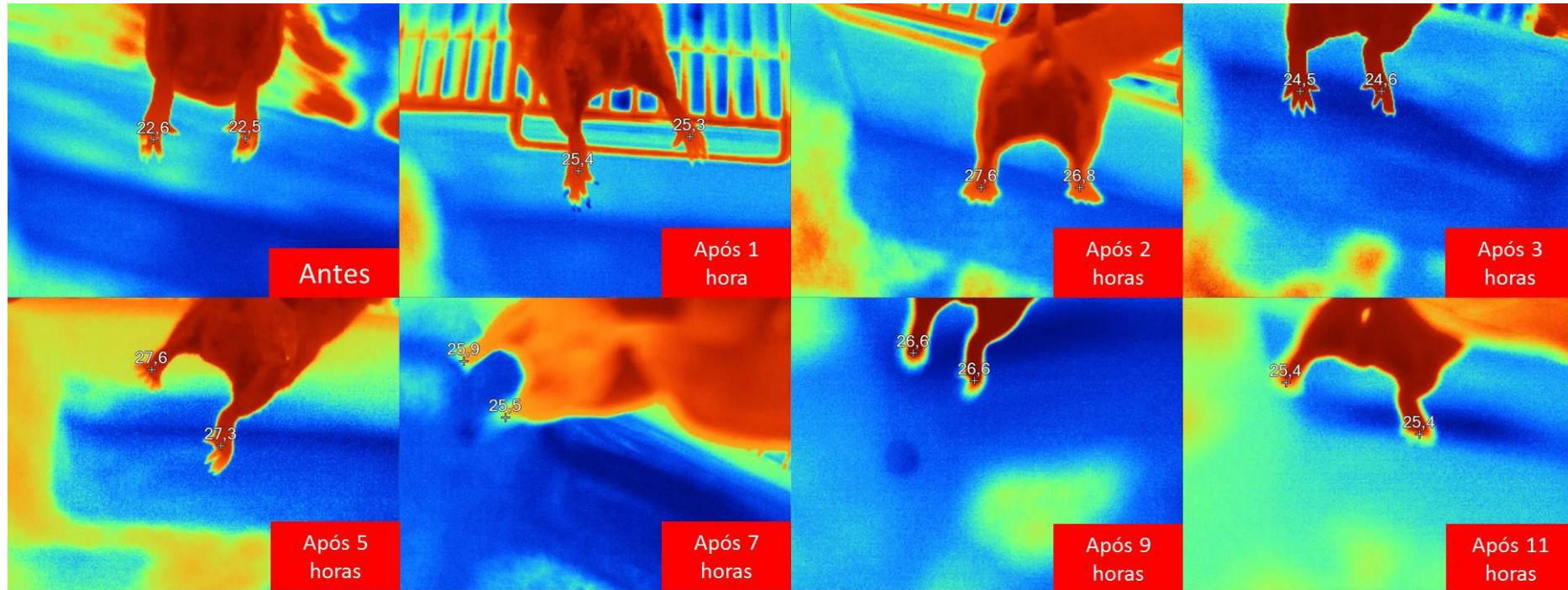


Figura 3.6.20. Temperatura em °C das patas esquerda e direita do animal B do grupo 10-OCH₃-Carragenina. Estão apresentados os períodos antes e após a aplicação da Carragenina, identificando a temperatura para cada pata.

3.6.1.6.3 ANIMAL C

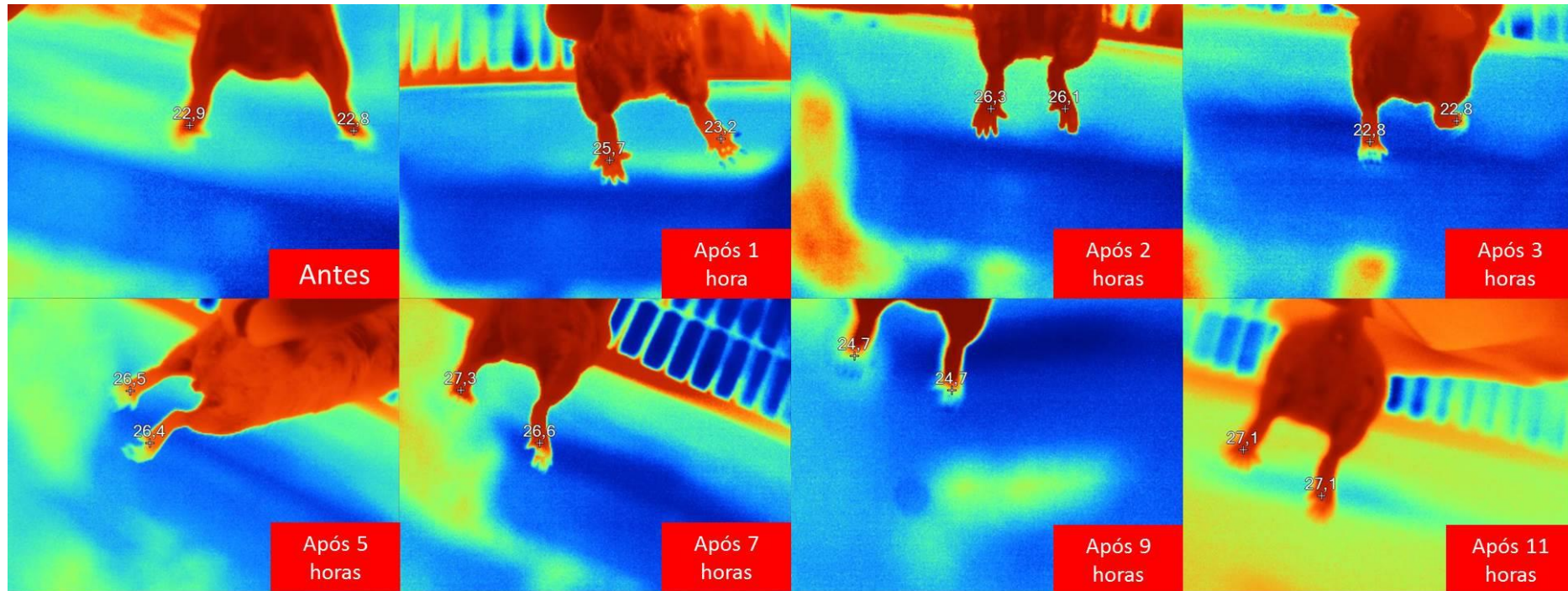


Figura 3.6.21. Temperatura em °C das patas esquerda e direita do animal C do grupo 10-OCH₃-Carragenina. Estão apresentados os períodos antes e após a aplicação da Carragenina, identificando a temperatura para cada pata.

3.6.1.6.4 ANIMAL D

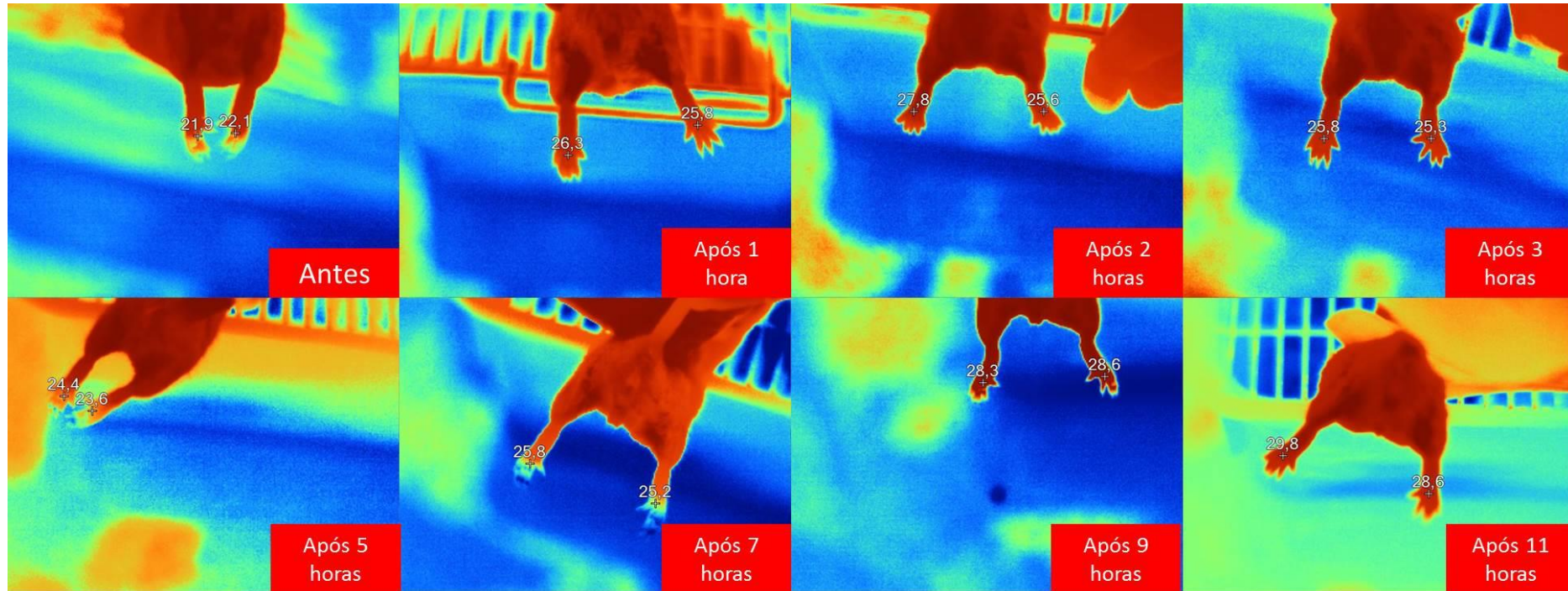


Figura 3.6.22. Temperatura em °C das patas esquerda e direita do animal D do grupo 10-OCH₃-Carragenina. Estão apresentados os períodos antes e após a aplicação do Carragenina, identificando a temperatura para cada pata.

3.6.1.7 ZYMOSAN

3.6.1.7.1 ANIMAL A

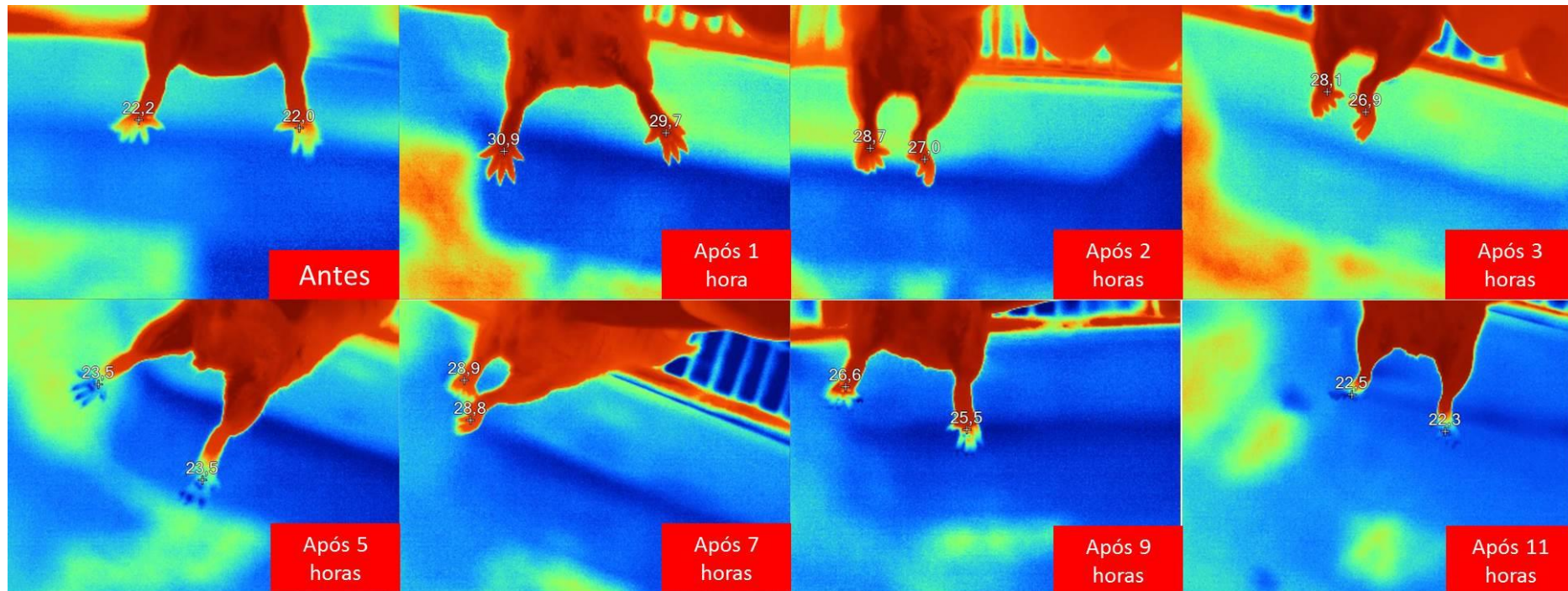


Figura 3.6.23. Temperatura em °C das patas esquerda e direita do animal A do grupo controle Zymosan. Estão apresentados os períodos antes e após a aplicação do Zymosan, identificando a temperatura para cada pata.

3.6.1.7.2 ANIMAL B

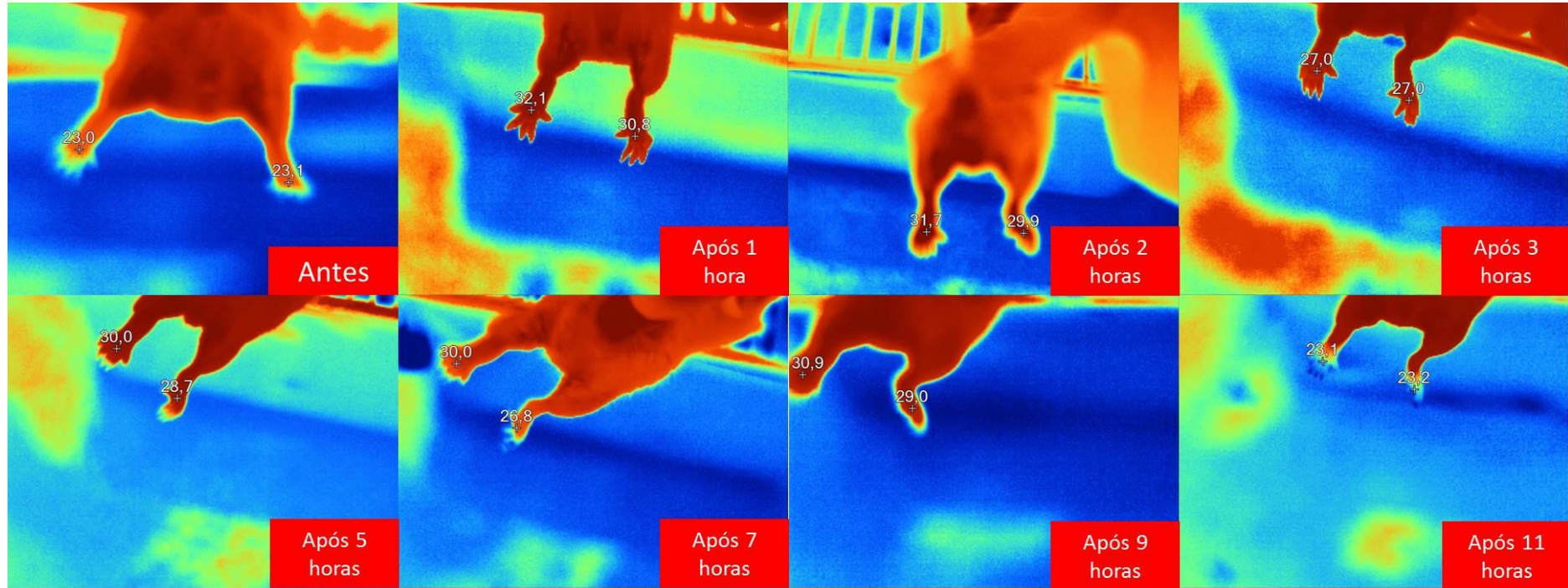


Figura 3.6.24. Temperatura em °C das patas esquerda e direita do animal B do grupo controle Zymosan. Estão apresentados os períodos antes e após a aplicação do Zymosan, identificando a temperatura para cada pata.

3.6.1.7.3 ANIMAL C

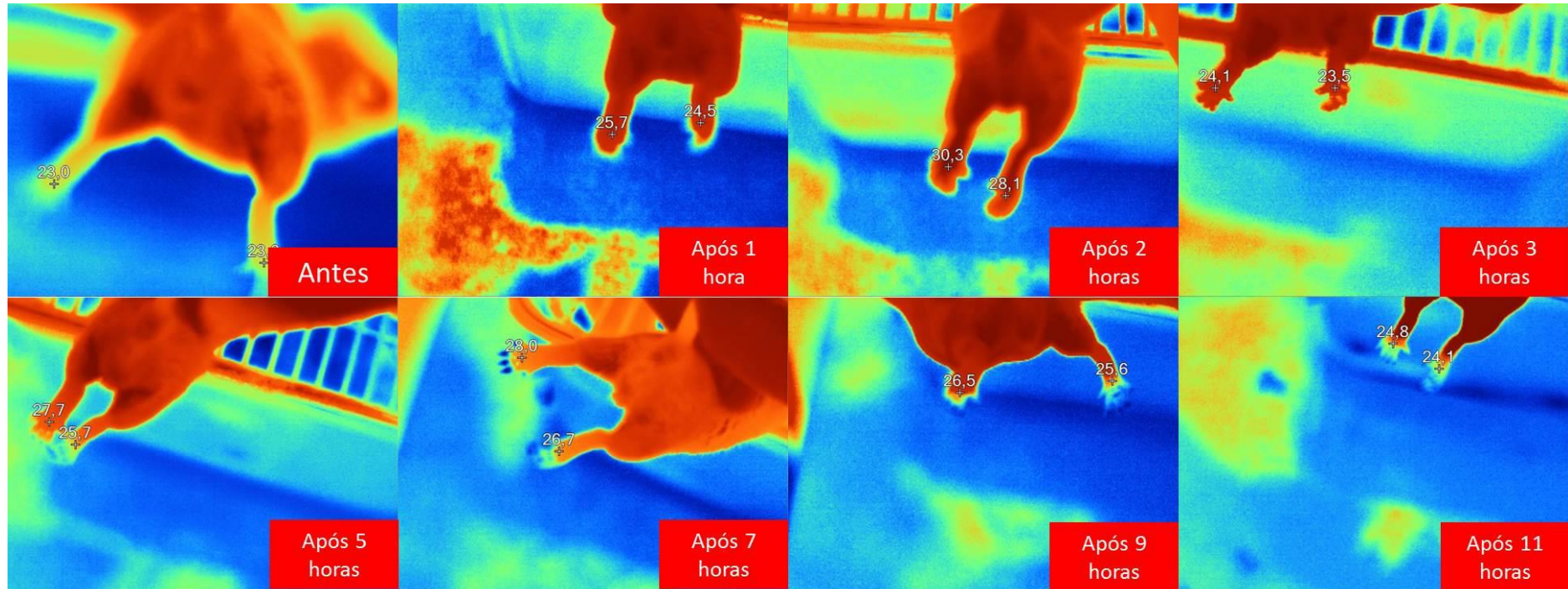


Figura 3.6.25. Temperatura em °C das patas esquerda e direita do animal C do grupo controle Zymosan. Estão apresentados os períodos antes e após a aplicação do Zymosan, identificando a temperatura para cada pata.

3.6.1.8 5-OCH₃-ZYMOSAN

3.6.1.8.1 ANIMAL A

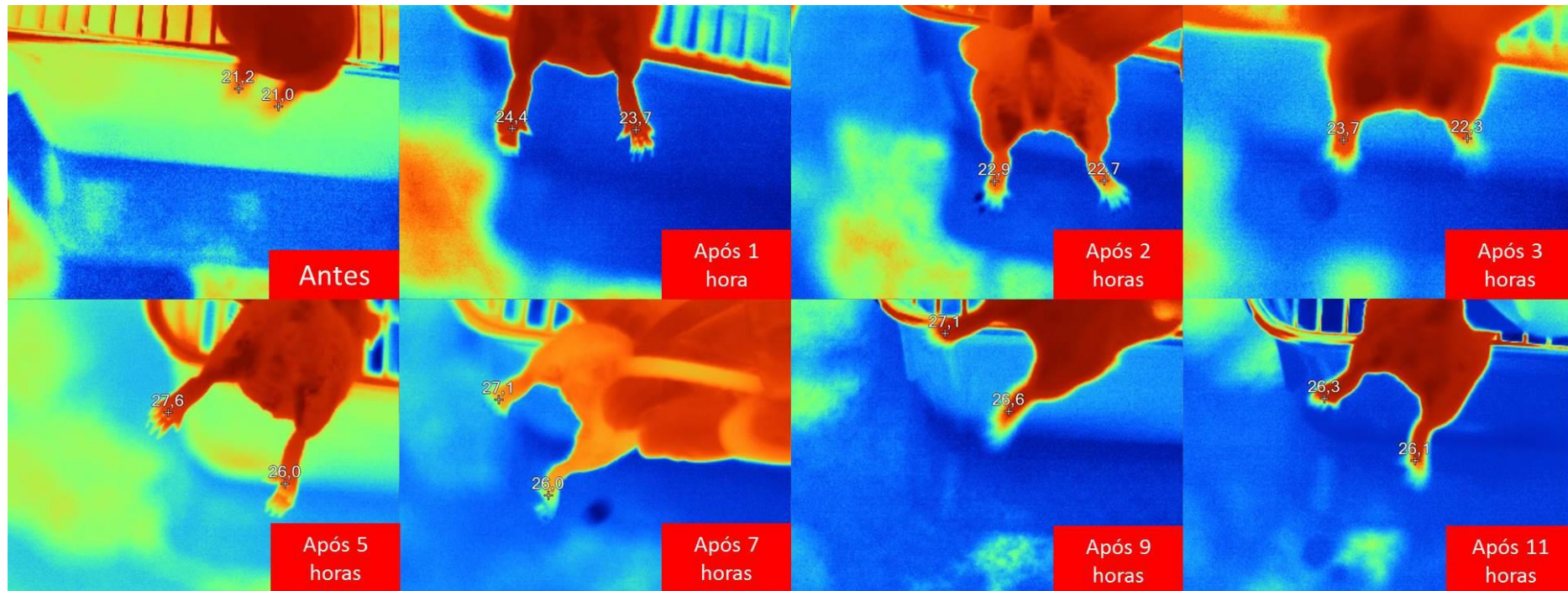


Figura 3.6.26. Temperatura em °C das patas esquerda e direita do animal A do grupo 5-OCH₃-Zymosan. Estão apresentados os períodos antes e após a aplicação do Zymosan, identificando a temperatura para cada pata.

3.6.1.8.2 ANIMAL B

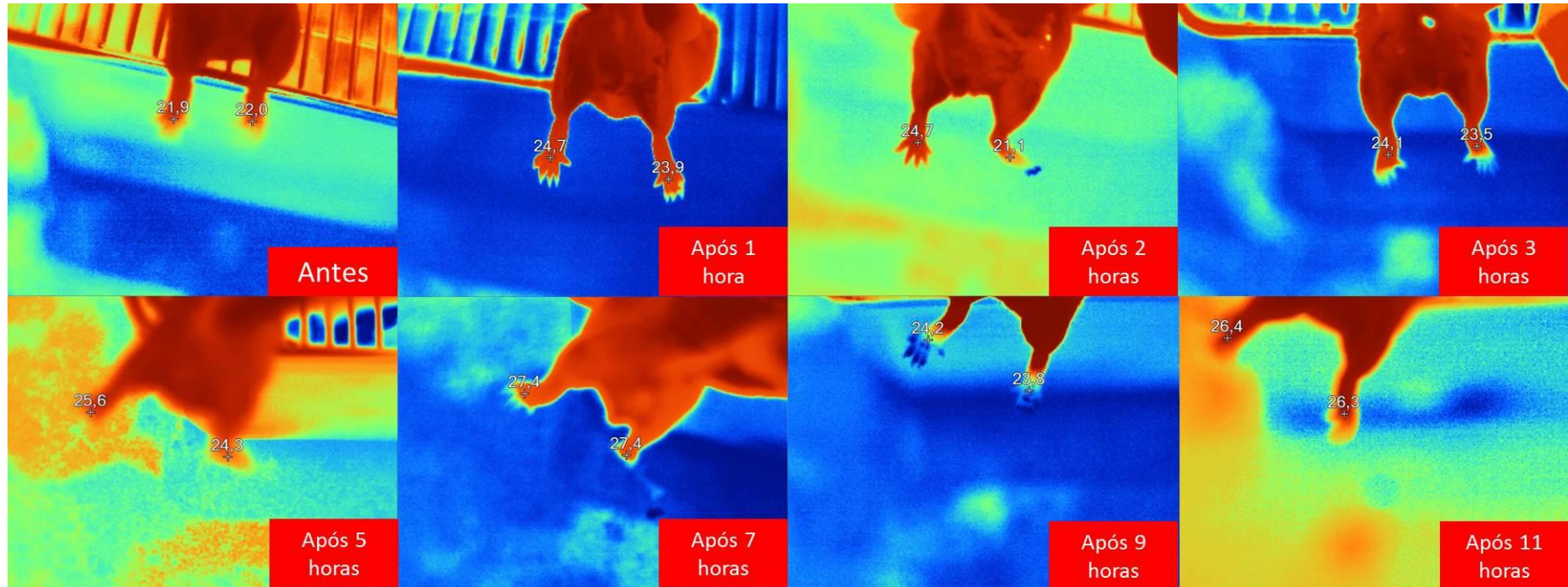


Figura 3.6.27. Temperatura em °C das patas esquerda e direita do animal B do grupo 5-OCH₃-Zymosan. Estão apresentados os períodos antes e após a aplicação do Zymosan, identificando a temperatura para cada pata.

3.6.1.8.3 ANIMAL C

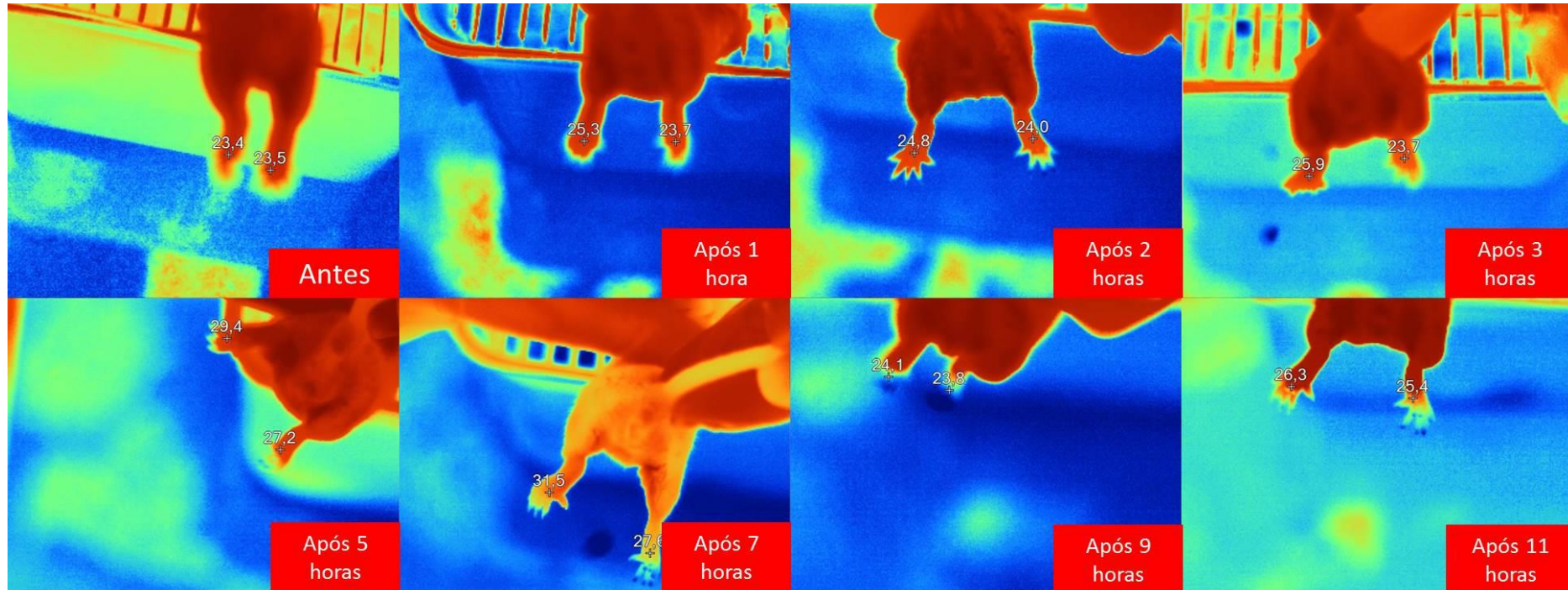


Figura 3.6.28. Temperatura em °C das patas esquerda e direita do animal C do grupo 5-OCH₃-Zymosan. Estão apresentados os períodos antes e após a aplicação do Zymosan, identificando a temperatura para cada pata.

3.6.1.8.4 ANIMAL D

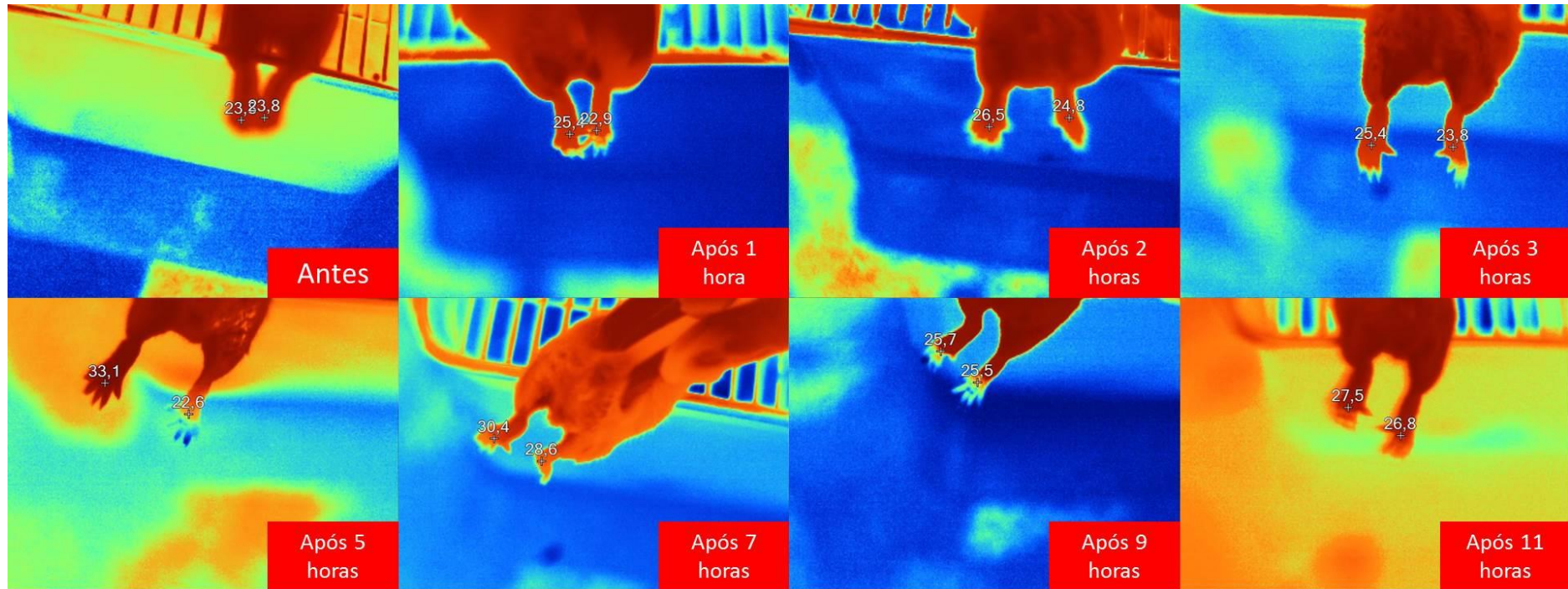


Figura 3.6.29. Temperatura em °C das patas esquerda e direita do animal D do grupo 5-OCH₃-Zyosan. Estão apresentados os períodos antes e após a aplicação do Zyosan, identificando a temperatura para cada pata.

3.6.1.9 CELECOXIB-ZYMOSAN

3.6.1.9.1 ANIMAL A

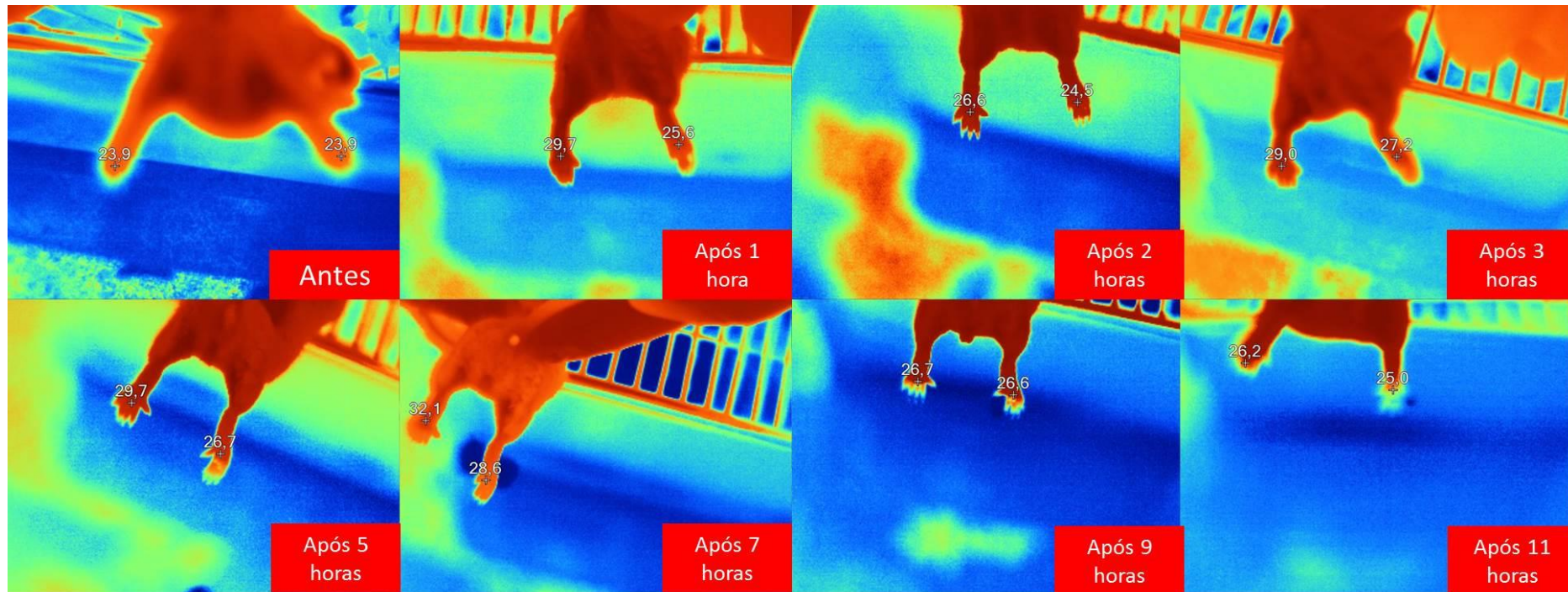


Figura 3.6.30. Temperatura em °C das patas esquerda e direita do animal A do grupo Celecoxib-Zymosan. Estão apresentados os períodos antes e após a aplicação do Zymosan, identificando a temperatura para cada pata.

3.6.1.9.2 ANIMAL B

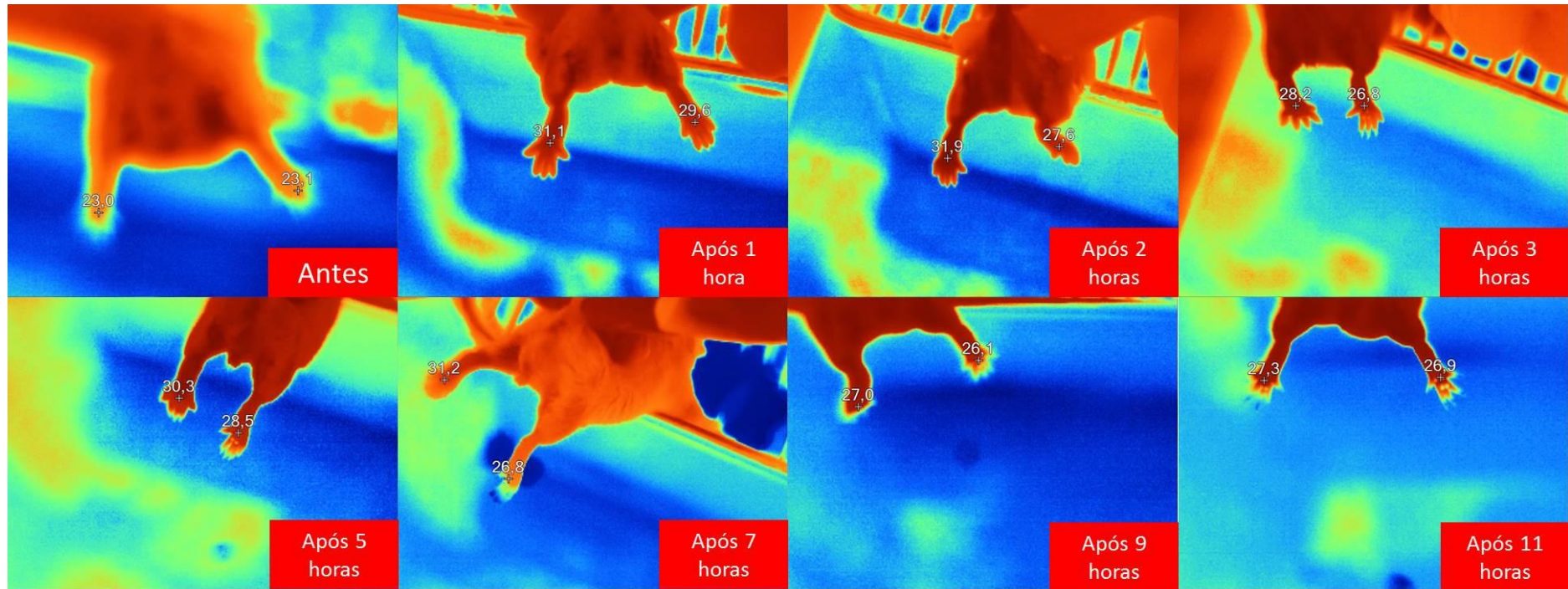


Figura 3.6.31. Temperatura em °C das patas esquerda e direita do animal B do grupo Celecoxib-Zymosan. Estão apresentados os períodos antes e após a aplicação do Zymosan, identificando a temperatura para cada pata.

3.6.1.9.3 ANIMAL C

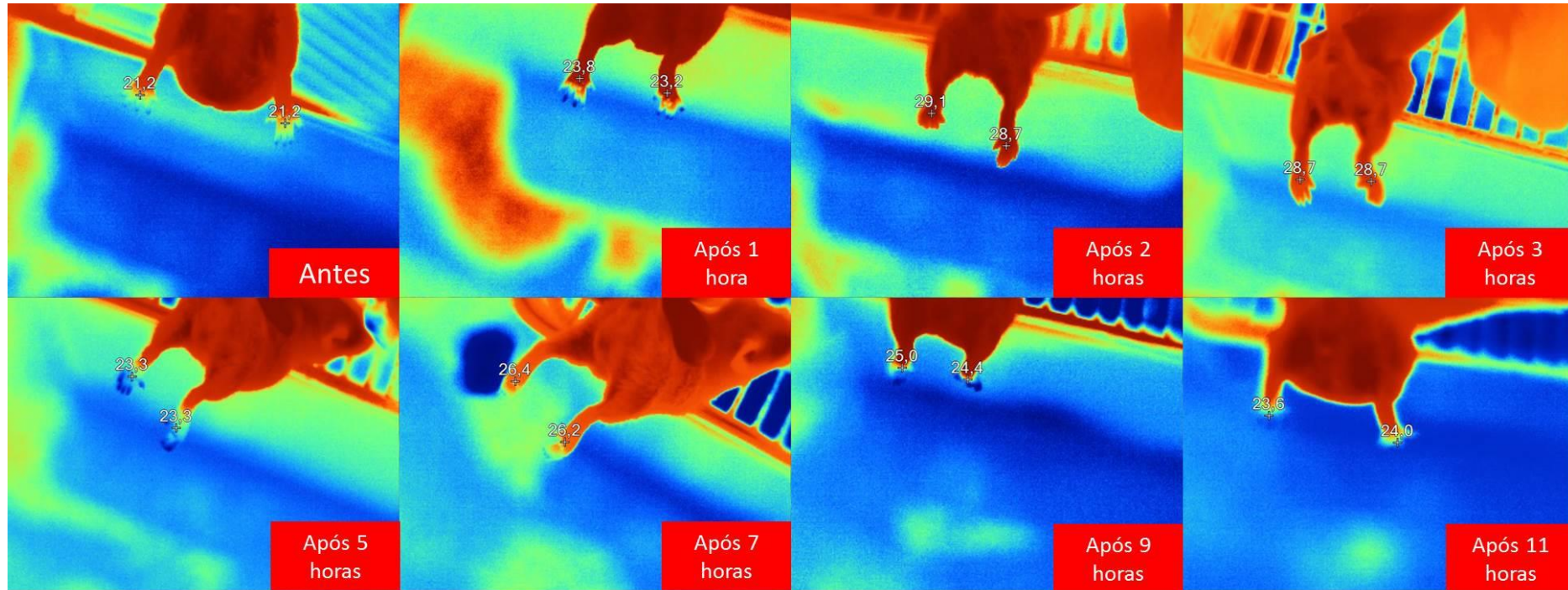


Figura 3.6.32. Temperatura em °C das patas esquerda e direita do animal C do grupo Celecoxib-Zymosan. Estão apresentados os períodos antes e após a aplicação do Zymosan, identificando a temperatura para cada pata.

3.6.1.9.4 ANIMAL D

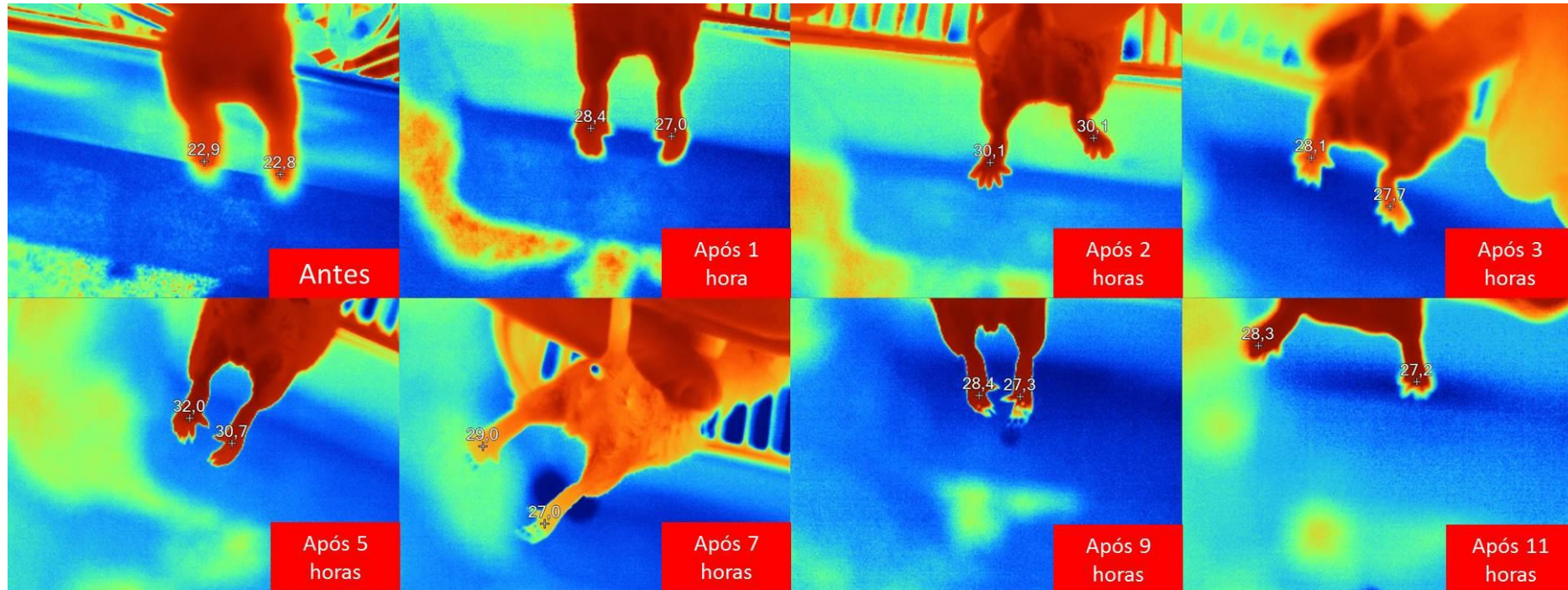


Figura 3.6.33. Temperatura em °C das patas esquerda e direita do animal D do grupo Celecoxib-Zymosan. Estão apresentados os períodos antes e após a aplicação do Zymosan, identificando a temperatura para cada pata.

3.6.1.10 6BR-ZYMOSAN

3.6.1.10.1 ANIMAL A

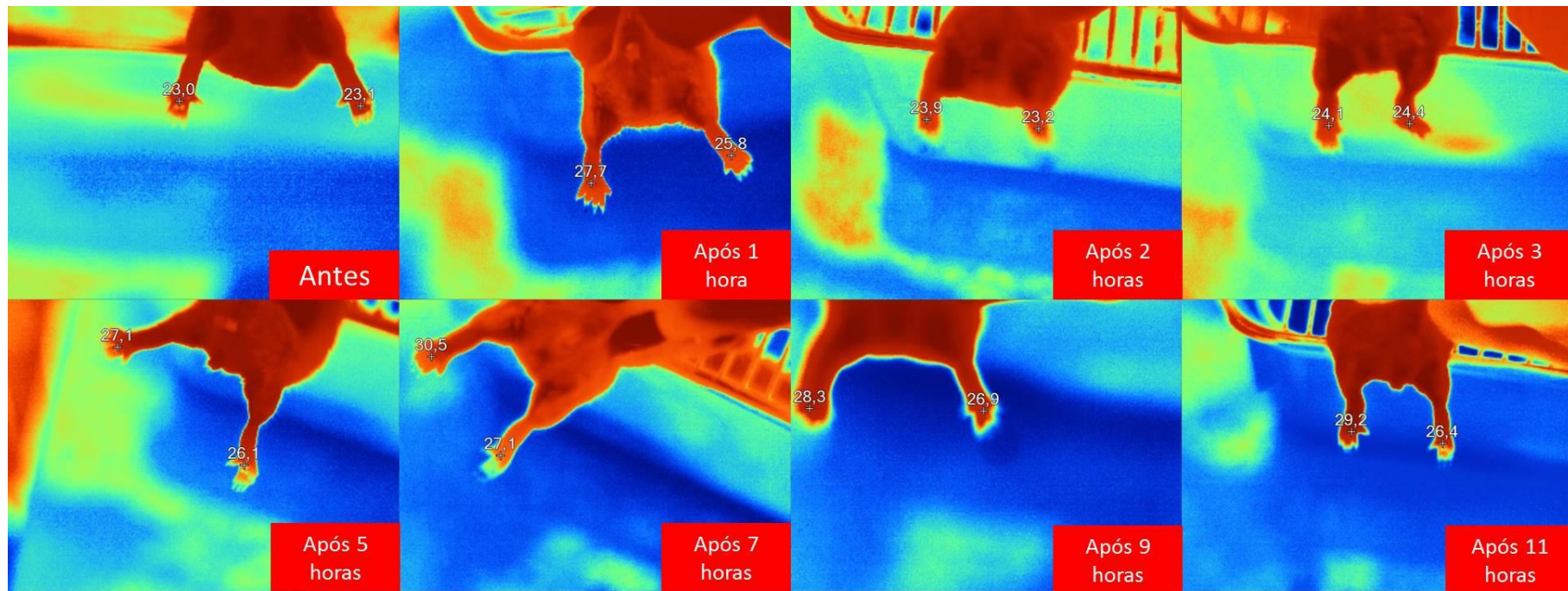


Figura 3.6.34. Temperatura em °C das patas esquerda e direita do animal A do grupo 6Br-Zymosan. Estão apresentados os períodos antes e após a aplicação do Zymosan, identificando a temperatura para cada pata.

3.6.1.10.2 ANIMAL B

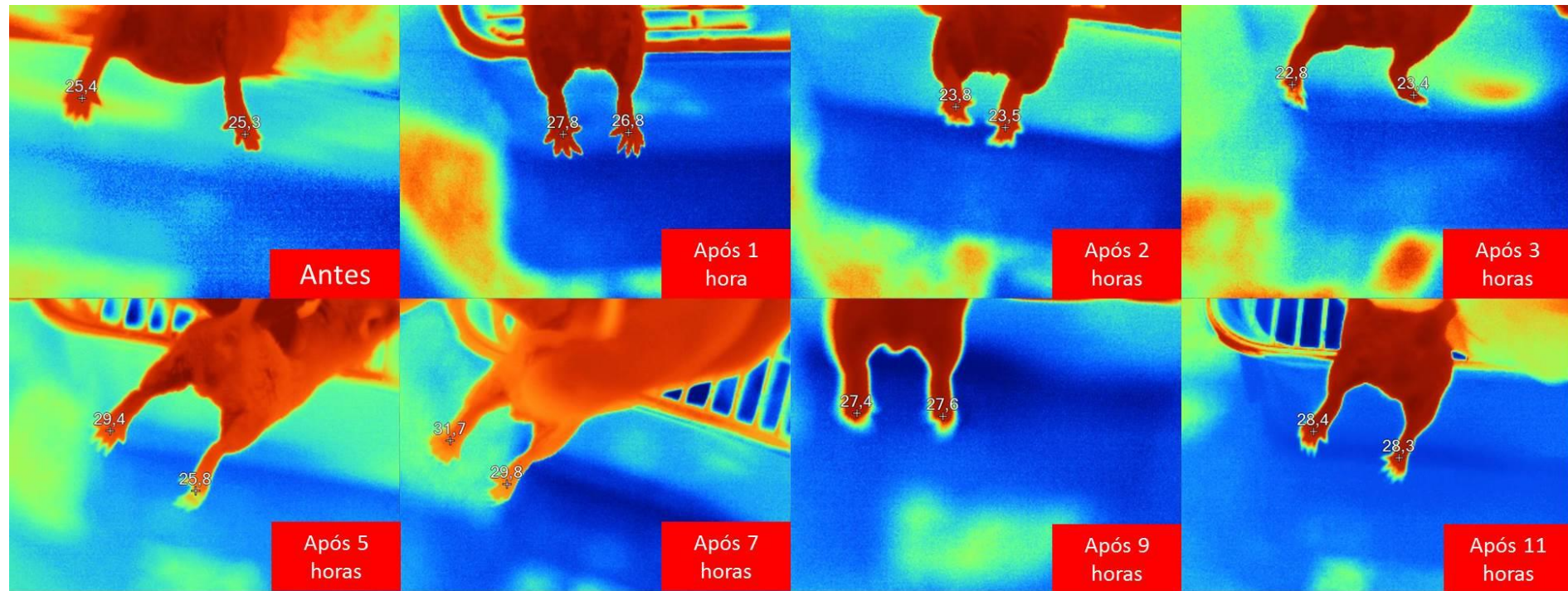


Figura 3.6.35. Temperatura em °C das patas esquerda e direita do animal B do grupo 6Br-Zymosan. Estão apresentados os períodos antes e após a aplicação do Zymosan, identificando a temperatura para cada pata.

3.6.1.10.3 ANIMAL C

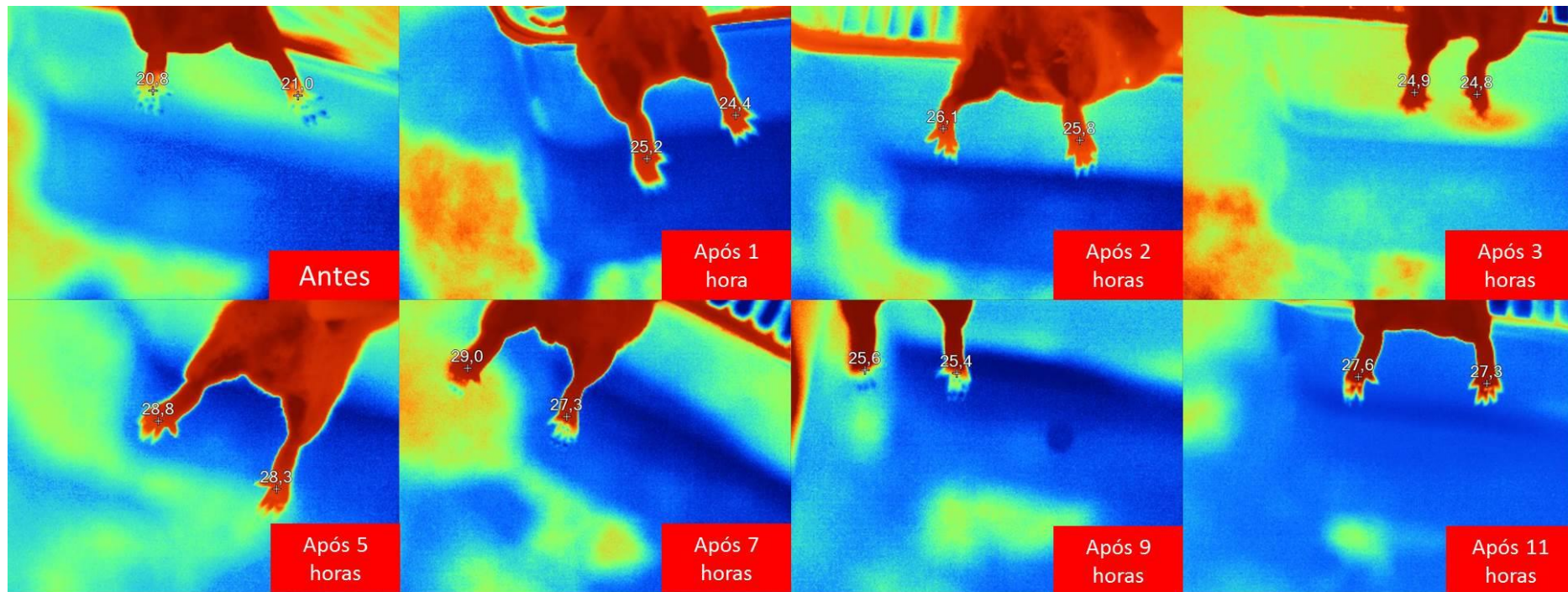


Figura 3.6.36. Temperatura em °C das patas esquerda e direita do animal C do grupo 6Br-Zymosan. Estão apresentados os períodos antes e após a aplicação do Zymosan, identificando a temperatura para cada pata.

3.6.1.10.4 ANIMAL D

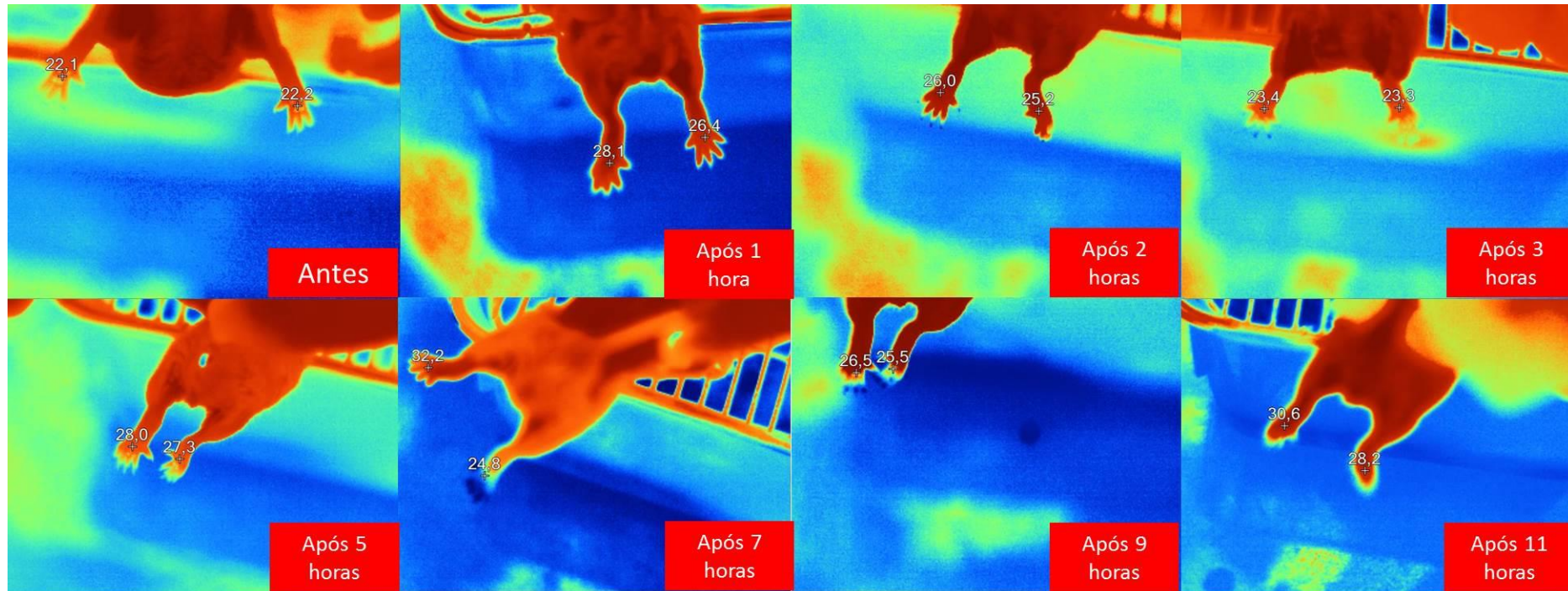


Figura 3.6.37. Temperatura em °C das patas esquerda e direita do animal D do grupo 6Br-Zymosan. Estão apresentados os períodos antes e após a aplicação do Zymosan, identificando a temperatura para cada pata.

3.6.1.11 10-OCH₃-ZYMOSAN

3.6.1.11.1 ANIMAL A

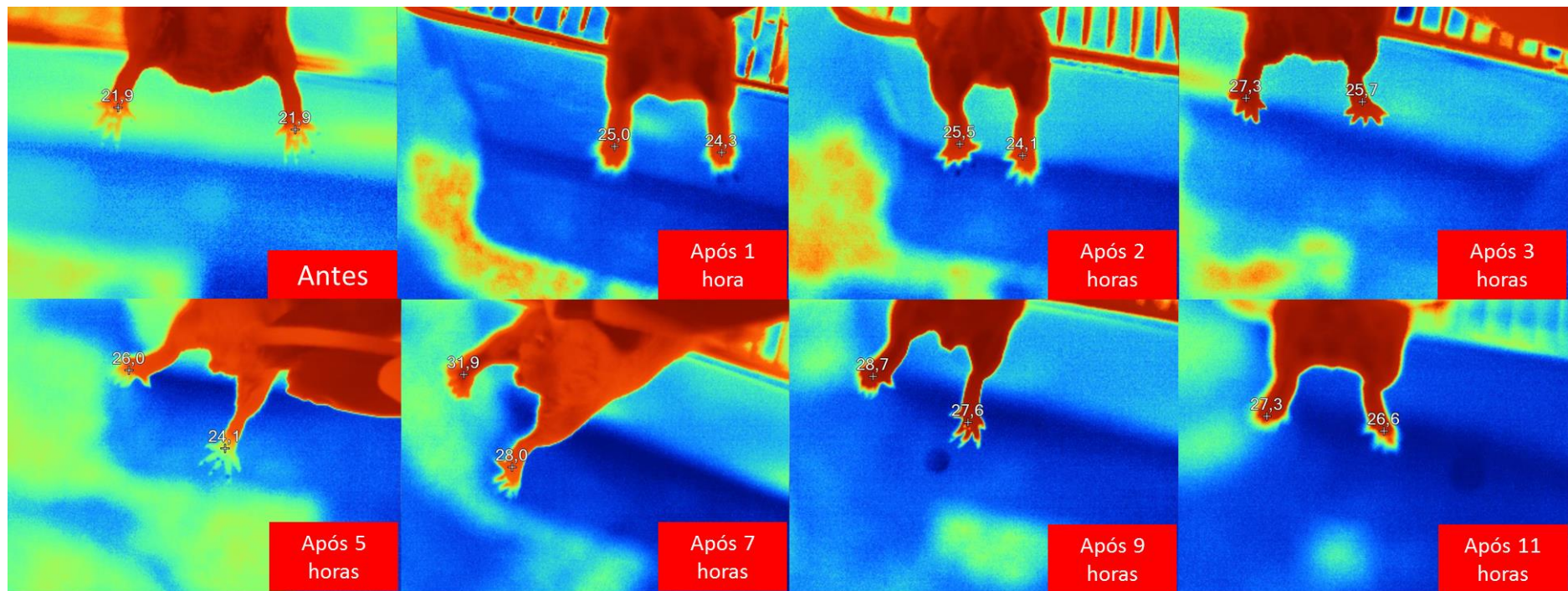


Figura 3.6.38. Temperatura em °C das patas esquerda e direita do animal A do grupo 10-OCH₃-Zymosan. Estão apresentados os períodos antes e após a aplicação do Zymosan, identificando a temperatura para cada pata.

3.6.1.11.2 ANIMAL B

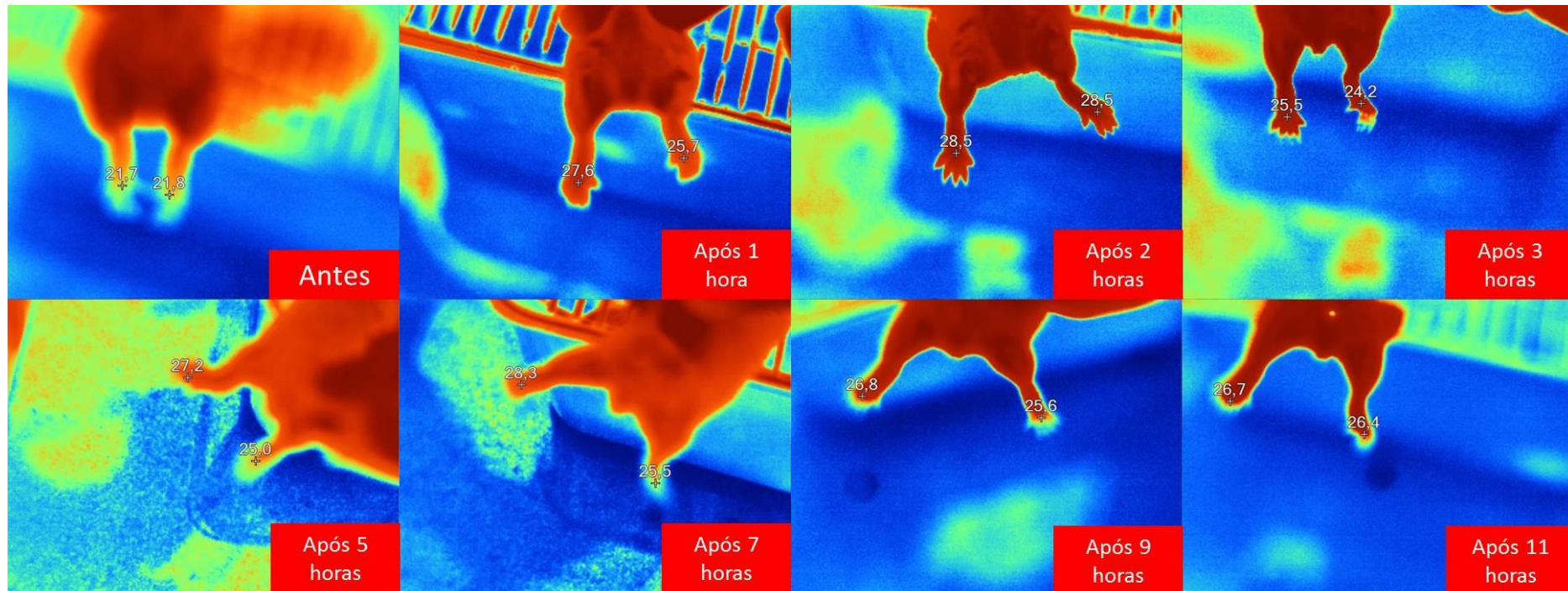


Figura 3.6.39. Temperatura em °C das patas esquerda e direita do animal B do grupo 10-OCH₃-Zymosan. Estão apresentados os períodos antes e após a aplicação do Zymosan, identificando a temperatura para cada pata.

3.6.1.11.3 ANIMAL C

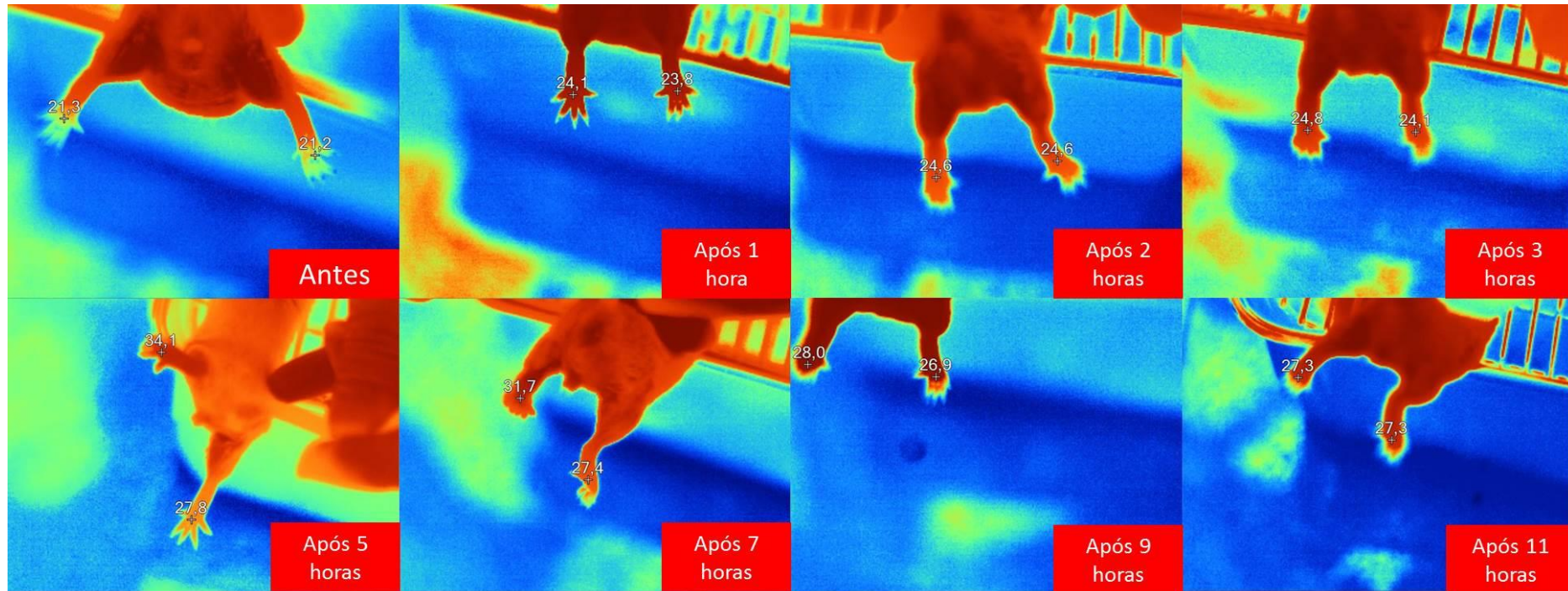


Figura 3.6.40. Temperatura em °C das patas esquerda e direita do animal C do grupo 10-OCH₃-Zymosan. Estão apresentados os períodos antes e após a aplicação do Zymosan, identificando a temperatura para cada pata.

3.6.1.11.4 ANIMAL D

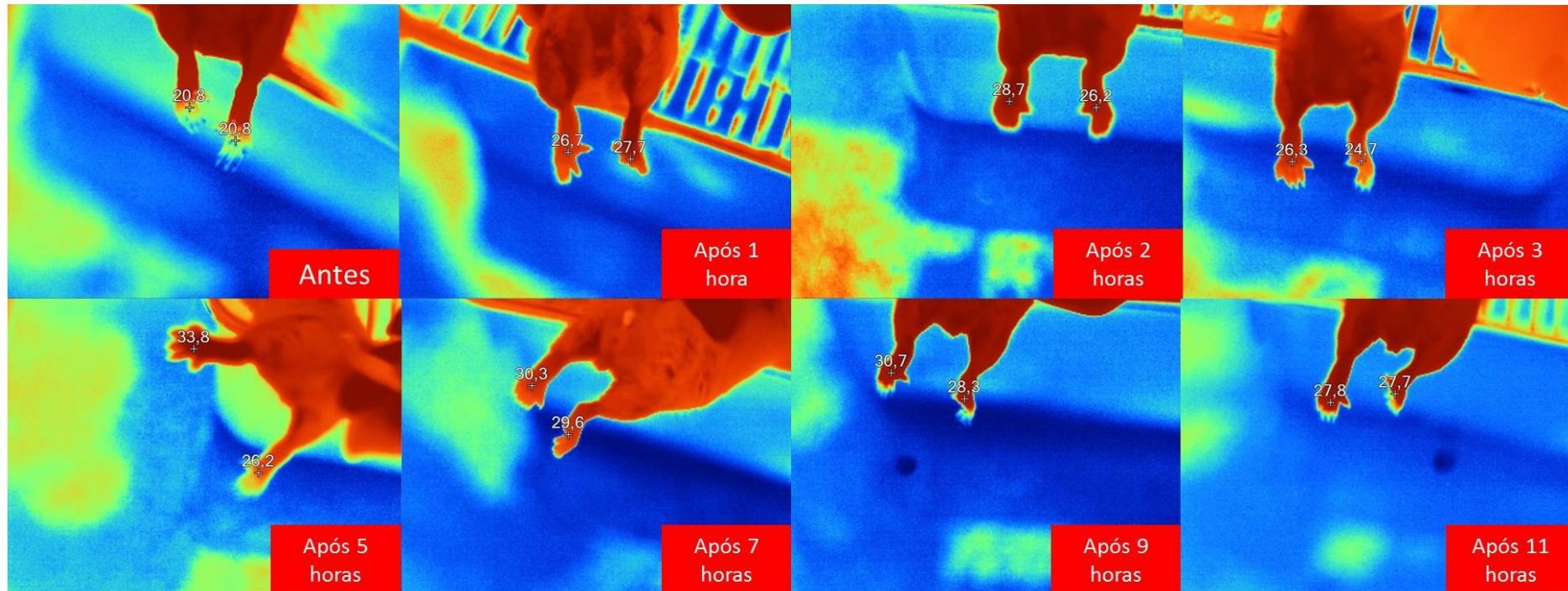


Figura 3.6.41. Temperatura em °C das patas esquerda e direita do animal D do grupo 10-OCH₃-Zymosan. Estão apresentados os períodos antes e após a aplicação do Zymosan, identificando a temperatura para cada pata.