



CENTRO UNIVERSITÁRIO FAMETRO
CURSO DE FARMÁCIA

WELLINGTON LIMA RIBEIRO

**AVALIAÇÃO COMPARATIVA DA SELETIVIDADE DE ANTIINFLAMATÓRIOS
POR ISOFORMAS DA CICLOOXIGENASE POR MEIO DE DOCKING
MOLECULAR**

FORTALEZA

2020

WELLINGTON LIMA RIBEIRO

AVALIAÇÃO COMPARATIVA DA SELETIVIDADE DE ANTIINFLAMATÓRIOS POR
ISOFORMAS DA CICLOOXIGENASE POR MEIO DE DOCKING MOLECULAR

Trabalho de pesquisa desenvolvido para a disciplina de Trabalho de Conclusão de Curso II, do curso de Farmácia do Centro Universitário Fametro (Unifametro) como requisito para obtenção do título de Bacharel em Farmácia, sob a orientação do prof. Me Moisés Maia Neto.

FORTALEZA

2020

WELLINGTON LIMA RIBEIRO

AVALIAÇÃO COMPARATIVA DA SELETIVIDADE DE ANTIINFLAMATÓRIOS POR
ISOFORMAS DA CICLOOXIGENASE POR MEIO DE DOCKING MOLECULAR

Trabalho de pesquisa desenvolvido para a disciplina de Trabalho de Conclusão de Curso II, do curso de Farmácia do Centro Universitário Fametro (Unifametro) como requisito para obtenção do título de Bacharel em Farmácia, sob a orientação do prof. Me Moisés Maia Neto.

BANCA EXAMINADORA

Prof^o. Me Moisés Maia Neto
Orientador – UNIFAMETRO

Prof^a. Dr. Suzana Barbosa Bezerra
Membro I - UNIFAMETRO

Prof^o. Ms. Felipe Rodrigues Magalhães Aguiar
Membro II - UNIFAMETRO

Dedico ao meu Pai e minha Mãe

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por todas as oportunidades em meu caminho.

AVALIAÇÃO COMPARATIVA DA SELETIVIDADE DE ANTIINFLAMATÓRIOS POR ISOFORMAS DA CICLOOXIGENASE POR MEIO DE DOCKING MOLECULAR

Wellington Lima Ribeiro¹

Moisés Maia Neto²

RESUMO

Os anti-inflamatórios não esteroides estão entre os medicamentos mais comumente usados no mundo. O presente estudo trata-se de uma pesquisa básica e teórica, de caráter exploratório, de natureza observacional e abordagem quantitativa com procedimento experimental “in silico”. O objetivo geral foi comparar a afinidade e seletividade de antiinflamatórios pelas isoformas de ciclooxigenase através de cálculos computacionais. Foi realizada a análise de correlação linear entre os valores experimentais de inibição de cada isoforma, e os valores de energia livre determinados in silico pelo método de docking molecular. Através do programa ADT foram retiradas as moléculas de água, cadeias proteicas desnecessárias, bem como os ligantes complexados. Foram adicionados os hidrogênios polares (essenciais para as interações hidrofílicas) e salvo o arquivo nomeado como cox1.pdb e cox2.pdb. Os arquivos cox*.pdb. foram então utilizados para os cálculos de DM utilizando-se o software GROMACS. Nele foi utilizado o campo de força CHARMM36 all-atom force field, o modelo de solvatação tip3p, preparada a célula unitária em formato cúbico e ao final gerado o arquivo cox*_solv.gro. Em sequência foram adicionados íons sódio ou cloreto para equilíbrio de cargas através do arquivo de parâmetros íons.mdp (com o parâmetro coulombtype = cutt-off e nstlist= 10) e após o comando genion o arquivo cox*_solv_íons.gro foi visualizado no Pymol para conferência. Como resultados os dados de razão cox-2/cox-1 relacionados ao método de docking flexível mostram que os 22 compostos com resultados acima de 1,0, e que assim deveriam identificar compostos cox-2 seletivos, 6 apresentam de fato esta seletividade de acordo com os dados experimentais e apenas 3 são na realidade cox-1 seletivos. Podemos então apontar uma melhor tendência do método flexível em promover a triagem de ligantes úteis quando comparado ao método rígido.

Palavras-chave: *Antiinflamatorios, Ciclooxigenase, Seletividade, Docking molecular*

¹ Graduando do curso de Farmácia do Centro Universitário Fаметro– UNIFAMETRO. Email: @gmail.com

² Prof^a. Orientador do curso de Farmácia do Centro Universitário Fаметro– UNIFAMETRO. Email: moises.neto@professor.unifametro.edu.br

SUMÁRIO

| | |
|--|-----------|
| 1. INTRODUÇÃO | 8 |
| 2. METODOLOGIA..... | 14 |
| 2.1 Hardware empregado no estudo: | 14 |
| 2.2 Softwares empregados no estudo:..... | 14 |
| 2.3 Critérios de seleção, obtenção e preparo da molécula alvo: | 15 |
| 2.4 Seleção, obtenção e preparo dos ligantes: | 17 |
| 2.5 Cálculo de afinidade por Docking Molecular:..... | 19 |
| 2.6 Análise de dados..... | 20 |
| 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO | 21 |
| 3.1 Determinação dos resíduos de aminoácido no sítio de interação | 21 |
| 3.2 Resultados do docking molecular:..... | 22 |
| 4. ANÁLISE ESTATÍSTICA | 9 |
| CONSIDERAÇÕES FINAIS | 12 |
| REFERÊNCIAS..... | 13 |

1. INTRODUÇÃO

No Brasil os medicamentos da classe de anti-inflamatórios podem ser adquiridos nas farmácias sem grades obstáculos, até mesmo aqueles que possam ocasionar toxicidade e outros eventos adversos aos seus usuários. Sua utilização geralmente é para o tratamento da dor, febre e demais lesões e são utilizados por grande parte da população (SILVA et al., 2019).

No entanto, seu uso crônico está associado a diversos efeitos colaterais, em particular aqueles envolvendo o sistema gastrointestinal, como destacado pela retirada relativamente recente de certos agentes seletivos da ciclooxigenase 1 (COX-1), ciclooxigenase 2 (COX-2) criando subgrupos de anti-inflamatórios seletivos e não seletivos para COX-2 (DANTAS, 2019).

O tamanho do mercado global de anti-inflamatórios deve chegar a nove bilhões de dólares nos próximos 5 anos, por conta do aumento dos investimentos no desenvolvimento de produtos biológicos para o tratamento de doenças inflamatórias autoimunes. Os medicamentos anti-inflamatórios ajudam a reduzir a inflamação no corpo e a tratar problemas de saúde como artrite, asma, artrite reumatoide, sinusite e outros (SILVA et al., 2019).

Os anti-inflamatórios não esteroides (AINEs) são os medicamentos mais prescritos em todo o mundo. Estima-se que 30 milhões de pessoas por dia em todo o mundo realizem a utilização de AINEs. Essas drogas são utilizadas por seus efeitos de analgesia, anti-inflamatório e antipirético (SILVA et al., 2019).

A inibição da enzima ciclooxigenase (COX), que participa da biossíntese das prostaglandinas (PGs) e do tromboxano (TX), é o mecanismo de ação dos AINEs. Prostaglandinas e Tromboxanos são mediadores importantes de febre, dor e inflamação, que tem um papel importante na fisiopatologia de várias doenças. Os AINEs afetam a síntese e a ação de mediadores inflamatórios, incluindo PGs, peptídeos derivados da cascata de coagulação, interleucina (IL) -2, IL-6 e fator de necrose tumoral (TNF) (SYLVESTER, 2019).

O ácido araquidônico existe principalmente como fosfatidilcolina esterificada e formas de fosfolípidios de fosfatidiletanolamina nas membranas. É liberado da membrana celular pela fosfolipase A2 (PLA2), que é a etapa geral de limitação da taxa de eicosanóides. Existem duas isoformas de PLA2 classificadas como secretora e citoplasmática (MONTEIRO et al., 2008).

Esta existência de múltiplas isoformas permite várias respostas biológicas para diferentes tecidos. As isoformas de PLA2 podem ser estimuladas por TNF- α , fator estimulador de colônia de granulócitos-macrófagos, interferon (IFN) e vários fatores de crescimento, como proteína quinase ativada por mitogênio (MAPK) e fosfoquinase C. As enzimas COX convertem ácido araquidônico em PGs, prostaciclina e TXs. O primeiro membro desta cascata começa com a formação de PGG2 e depois PGH2. PGH2 é convertido em várias isoformas de PG, como PGE2, PGD2, PGF2 α , PGI2 ou TXA2 por meio de isomerases específicas de tecido. Em outra via, o ácido araquidônico é convertido em leucotrienos por três formas de lipoxigenases (SYLVESTER, 2019). Vários tipos de órgãos produzem leucotrienos, incluindo mastócitos, glóbulos brancos (leucócitos, que dão aos compostos seus nomes), cérebro, pulmão, baço e coração. (MONTEIRO et al., 2008).

A COX-1 desempenha um papel importante nos estágios iniciais do desenvolvimento da lesão no modelo de nocaute apoE da aterosclerose, por exemplo e atua prevenindo a formação de lesões grosseiras em face de lesão vascular contínua e inflamação. Apesar da inibição da prostaciclina, a inibição da COX-2 não tem efeito no desenvolvimento da lesão ou nas interações entre as plaquetas e a parede dos vasos (SYLVESTER, 2019).

As PGs foram encontradas em muitas regiões do cérebro. Os AINEs têm efeitos antipiréticos e analgésicos em humanos e animais. Acredita-se que essas atividades sejam o resultado da inibição da formação de PG no sistema nervoso central (SNC). A maior parte da COX-1 está na microglia, embora também tenha sido encontrada no hipocampo e nos neurônios corticais cerebrais, embora seja claro que a COX-3 é expressa abundantemente no córtex cerebral, sua atividade enzimática ainda não foi elucidada. Em contraste com a maioria dos tecidos, a COX-2 induzível também é expressa constitutivamente nas seções cervicais lombares da medula espinhal e várias regiões do cérebro, como o córtex cerebral, hipocampo e

amígdala em populações discretas de neurônios, mas não na glia. A expressão da COX-1 no nível espinal não é ampla e está localizada no citoplasma das células gliais (MONTEIRO et al., 2008).

Acredita-se que os AINEs retardem o início da doença de Alzheimer, pois a inibição da COX-2 interfere com a cascata β -amiloide que medeia a supressão da memória e da plasticidade sináptica. De acordo com os dados, os inibidores seletivos de COX-2 podem ter efeitos protetores contra a doença de Alzheimer, reduzindo a resposta de PGE2 nas sinapses devido à inibição de COX-2 (SANDOVAL et al., 2017).

Dessa forma, todo medicamento, inclusive os AINES, para ser comercializado deve passar por um processo de longo prazo que custa bilhões. Em 2019 o custo era de estimado em US \$ 2,6 bilhões e essa probabilidade de falha de descoberta e desenvolvimento de medicamentos é alta, podendo chegar a 90% dos medicamentos que entram em testes clínicos, não obtendo assim a aprovação para chegar ao mercado (SYLVESTER, 2019).

Aproximadamente 75% do custo é devido a falhas que acontecem ao longo da descoberta e design de drogas. Em experimentos de triagem de alto rendimento mais rápidos, que podem testar milhares de moléculas com automação robótica, o trabalho humano associado à triagem de compostos não é mais necessário. No entanto, ainda é caro e requer muitos recursos de alvos e ligantes. Esses recursos frequentemente não estão disponíveis em ambientes acadêmicos (SILVA et al., 2019).

Além disso, muitas empresas farmacêuticas estão procurando maneiras de evitar a triagem de ligantes que não têm possibilidade de apresentar sucesso. Portanto, as ferramentas de descoberta de medicamentos auxiliada por computador estão recebendo muita atenção na indústria farmacêutica, utilizando-se dessas tecnologias que são ferramentas poderosas para reduzir o número de ligantes que precisam ser avaliados em ensaios experimentais (SANDOVAL et al., 2017).

O *docking* é um arcabouço atraente para entender as interações biomoleculares de fármacos para o desenho e descoberta de fármacos racionais, bem como no estudo mecanístico, colocando uma molécula (ligante) no local de

ligação preferido da região específica alvo do DNA com proteína (receptor) principalmente de uma maneira não covalente para formar um complexo estável de eficácia potencial e mais especificidade. As informações obtidas com a técnica de *docking* podem ser usadas para sugerir a energia de ligação, energia livre e estabilidade dos complexos. Essa técnica de acoplamento é utilizada para prever os parâmetros de ligação provisórios do complexo ligante-receptor de antemão (MAGALHÃES et al., 2012).

O principal objetivo do *docking* é atingir o complexo ligante-receptor com conformação otimizada e com a intenção de possuir menos energia livre de ligação. A energia livre de ligação prevista líquida é revelada em termos de vários parâmetros, ligação de hidrogênio, eletrostática, energia livre de torção, dispersão e repulsão, dessolvatação, energia interna total e energia do sistema não ligado. Portanto, um bom entendimento da ética geral que governa a energia livre de ligação prevista fornece pistas adicionais sobre a natureza de vários tipos de interações que levam ao *docking* (SANDOVAL et al., 2017).

A aplicação prática do *docking* requer banco de dados para a busca do alvo com o formato do *Protein Data Banking* PDB adequado e uma metodologia para preparar o ligante como um arquivo PDB. Para fazer isso, existem vários softwares disponíveis de onde o ligante pode ser feito no formato PDB. Essas ferramentas fornecem a organização para ligantes com base em sua capacidade de interagir com determinadas proteínas / DNA alvo. O acoplamento molecular de pequenas moléculas a um alvo inclui uma amostragem predefinida de uma possível conformação do ligante no sulco específico do alvo, a fim de estabelecer a conformação otimizada do complexo. Isso pode ser possível usando a função de pontuação do software (MAGALHÃES et al., 2012).

O termo ensaios clínico *in silico* refere-se ao uso de simulação de computador individualizada no desenvolvimento ou avaliação regulatória de um produto medicinal, dispositivo médico ou intervenção médica. Embora a simulação por computador seja amplamente usada para o desenvolvimento e eliminação de riscos de uma série de produtos de missão crítica, como aeronaves civis, usinas nucleares, etc., o desenvolvimento e a avaliação de produtos biomédicos ainda são predominantemente baseados em experiências experimentais em vez de simulações

por computador abordagens. A necessidade de experimentos longos e complexos *in vitro*, em animais e, em seguida, em pacientes durante os testes clínicos eleva os custos de desenvolvimento a níveis insustentáveis, sufocando a inovação e elevando o custo da prestação de cuidados de saúde a níveis sem precedentes.

As ciclooxigenases (COX) ou prostaglandina endoperóxido sintases (PGHS) são as principais enzimas na síntese das prostaglandinas, os principais mediadores da inflamação, dor e aumento da temperatura corporal (hiperpirexia). As prostaglandinas são formadas a partir de seu precursor, o ácido araquidônico. O ácido araquidônico é clivado dos fosfolipídios da membrana celular pela fosfolipase A2. O ácido araquidônico em endoperóxidos instáveis PGG2 e PGH2. Depois disso, PGG2 e PGH2 são metabolizados por sintases em prostaglandinas primárias PGD2, PGE2, PGF2 α , TXA2 (tromboxano A2) e PGI2 (prostaciclina) (BOTTING, 2006).

As prostaglandinas (PGs) são os mediadores lipídicos produzidos pela maioria das células do corpo, exceto pelos glóbulos vermelhos, e liberados sob quase qualquer tipo de estímulo químico ou mecânico. As duas isoformas definitivamente conhecidas de COX, chamadas COX-1 e COX-2, apresentam padrões de expressão distintos e atividades biológicas distintas. A COX-1 é formada em muitas células diferentes para criar prostaglandinas usadas para mensagens básicas de "manutenção" em todo o corpo. A COX-1 é uma proteína expressa constitutivamente, responsável pela produção fisiológica de prostaglandinas. A proteína variante COX-1, denominada COX-3, é sensível à inibição com paracetamol (GOODSELL, 2000).

A COX-2 é formada apenas em células especiais e é usada para sinalizar tanto a dor quanto a inflamação. Esta isoforma também é chamada de isoforma induzível da enzima COX. Em processos inflamatórios, a COX-2 é superexpressa. Os antiinflamatórios não esteroidais (AINEs) são inibidores da COX e previnem a síntese de PG, exibindo ações analgésicas, antipiréticas e antiinflamatórias. No entanto, os AINEs apresentam uma série de efeitos adversos, principalmente por causa de sua inibição da isoforma constitutiva da COX. Os principais efeitos adversos dos AINEs são os efeitos gastrotóxicos (por exemplo, danos da mucosa gástrica, sangramento gástrico e úlceras gastroduodenais), aumento da tendência ao sangramento e retardo do processo de parto (SELINSKY et al., 2001).

Existem dois tipos de inibidores de COX, não seletivos, isto é, inibidores de COX-1 e COX-2, e inibidores de COX-2 predominantemente seletivos, tais como os "coxibs". Uma vez que os inibidores seletivos da COX-2 não inibem a isoforma constitutiva da COX-1, eles não apresentam efeitos adversos gastrointestinais. No entanto, publicações recentes sugeriram que os inibidores da COX-2, como o rofecoxib e o celecoxib, podem ser pró-trombóticos e aumentar o risco de enfarte do miocárdio (BOTTING, 2006).

Conseqüentemente, a síntese de novos AINEs, com potente ação anti-inflamatória, analgésica e antipirética, mas sem efeitos adversos, é altamente desejada. Sintetizamos seis ácidos β -hidroxi- β -arilalpropanóico que são estruturalmente semelhantes aos inibidores COX: ácido p-isobutilfenilacético (ibufenac), ácido 4-bifenilacético (felbinac), ácido α - (4-isobutil-fenil) propanóico (ibuprofeno), ácido α - (6-metoxi-2-naftil) propanóico (naproxeno). Ao introduzir a oxofuncionalidade na posição gama, em relação ao grupo carboxílico no ácido 4- (4'-bifenil) butanóico, pode-se notar um aumento em sua atividade anti-inflamatória (fenbufen). Os ácidos β -hidroxi- β -arilalquilpropanóico pertencem à classe de compostos de ácido aril- ou cicloalquilpropanóico, estruturalmente semelhantes aos NSAIDs comercialmente disponíveis (SELINSKY et al., 2001).

O objetivo geral do presente artigo foi comparar a afinidade e seletividade de anti-inflamatórios pelas isoformas de ciclooxigenase através de cálculos computacionais, e os objetivos específicos foram conceituar o processo inflamatório e a eficiência dos anti-inflamatório; compreender o papel fisiológico das isoformas de ciclooxigenase e analisar a eficiência dos métodos computacionais no desenvolvimento de novas terapias farmacológicas.

A tecnologia faz parte do cotidiano das pessoas e do mundo, e vem tomando conta de todos os setores incluindo a farmacologia. Portanto, como os métodos computacionais podem contribuir e determinar a afinidade e seletividade de anti-inflamatórios pelas isoformas de ciclooxigenase através de cálculos computacionais?

2. METODOLOGIA

O presente estudo trata-se de uma revisão bibliográfica, de caráter exploratório, de natureza observacional e abordagem quantitativa com procedimento experimental “*in silico*”. As simulações computacionais, bem como outros procedimentos prévios a esta estão representados resumidamente através do Workflow construído ao final deste tópico.

2.1 Hardware empregado no estudo:

Os procedimentos de simulação computacional foram realizados em uma estação de trabalho com as seguintes configurações: Processador Intel® Core™ i7-10700K CPU 4.80GHz × 8, 16 Gigabytes de memória RAM DDR4 e GPU dedicada AMD RX580 com 08 Gigabytes de memória de vídeo.

2.2 Softwares empregados no estudo:

O sistema operacional onde as simulações foram realizadas foi o sistema Linux Mint 19.3, com kernel 5.4.0-56-generic, no qual foram instalados os softwares listados na Tabela 1.

Tabela 1: Softwares usados na pesquisa.

| Nome | Versão | Finalidade |
|---------------------|----------|--|
| Avogadro | 1.2.0 | Visualização 3D de ligantes; Inserção de Hidrogênios ionizáveis a pH 7,4; Cálculos de minimização de energia de ligantes por DM; |
| GROMACS | 2019.3 | Cálculo de minimização de energia da proteína por DM; |
| GRACE | 5.1.25 | Visualização gráfica da energia do sistema submetido a DM; |
| AutoDockTools (ADT) | 1.5.7rc1 | Retirada de moléculas de água, cadeias e outros ligantes da proteína-alvo; Obtenção dos arquivos. pdbqt/.gpf/.dlg entre outros usados para o Docking; |
| Raccoon | 1.0 | Conversão do formato de arquivo de listas de ligantes; VS usando o AutoDock4 |
| AutoDockVina (ADV) | 1.1.2 | Realização do Docking Molecular ligante-proteína Obtenção das energias livres para avaliação da afinidade; |
| Pymol | 1.8.4 | Visualização 3D do complexo ligante-proteína e interações; Reposição de aminoácidos perdidos; Obtenção de imagens; |
| Xed | 1.8.3 | Visualização de informações contidas textualmente no arquivo; Desenvolvimento de scripts; |

2.3 Critérios de seleção, obtenção e preparo da molécula alvo:

As biomacromoléculas-alvo são ciclooxigenases nas isoformas 1 e 2 complexadas com ligantes inibidores de sua função enzimática com reconhecida seletividade. As estruturas 3D de ambas proteínas foram obtidas através de um banco de dados mundial de proteínas (*Protein Data Banking*) onde se armazenam mais de 146.000 estruturas macromoleculares biológicas (BERMAN et al, 2000).

Inicialmente foi realizada uma busca de códigos PDB ID úteis presentes no site (www.rcsb.org) utilizando como descritores as palavras: *Rofecoxib and COX-2* e *Flurbiprofen and COX-1*. Aplicou-se filtros para estruturas depositadas nos últimos 10 anos, obtidas por técnica de difração de raios X, com resolução inferior a 3 Angstroms, e que estejam complexadas ao ligante inibidor, a fim de que se determine a localização do sítio ativo das enzimas. As figuras 1 e 2 mostram os dados das macromoléculas selecionadas.

Figura 1. Dados do complexo COX-2 com Rofecoxibe.

The Structure of Vioxx Bound to Human COX-2
pdb_id = 5KIR
Experimental Data Method: X-RAY DIFFRACTION
Resolution: 2.70 Å
Publicação: ORLANDO & MALKOWSKI, 2016.

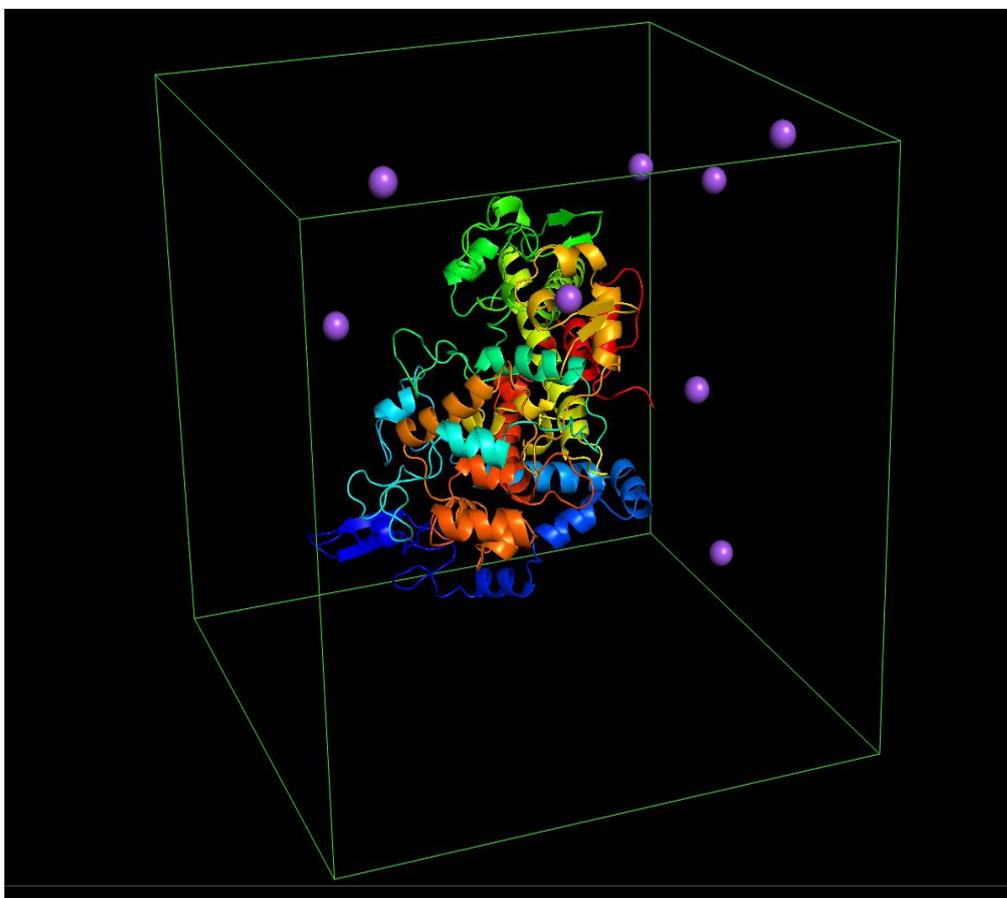
Figura 2. Dados do complexo COX-2 com Flutbiprofen.

Crystal Structure of Cyclooxygenase-1 in Complex with Flurbiprofen:
pdb_id = 3n8z
Experimental Data Method: X-RAY DIFFRACTION
Resolution: 2.90 Å
Publicação: SIDHU et al., 2010.

Através do programa ADT foram retiradas as moléculas de água, cadeias proteicas desnecessárias, bem como os ligantes complexados. Foram adicionados os hidrogênios polares (essenciais para as interações hidrofílicas) e salvo o arquivo nomeado como *cox1.pdb* e *cox2.pdb*.

Os arquivos `cox*.pdb` foram então utilizados para os cálculos de DM utilizando-se o software GROMACS. Nele foi utilizado o campo de força CHARMM36 all-atom force field, o modelo de solvatação tip3p, preparada a célula unitária em formato cúbico e ao final gerado o arquivo `cox*_solv.gro`. Em sequência foram adicionados íons sódio ou cloreto para equilíbrio de cargas através do arquivo de parâmetros `íons.mdp` (com o parâmetro `coulombtype = cutt-off` e `nstlist= 10`) e após o comando `genion` o arquivo `cox*_solv_íons.gro` foi visualizado no Pymol para conferência (Figura 3).

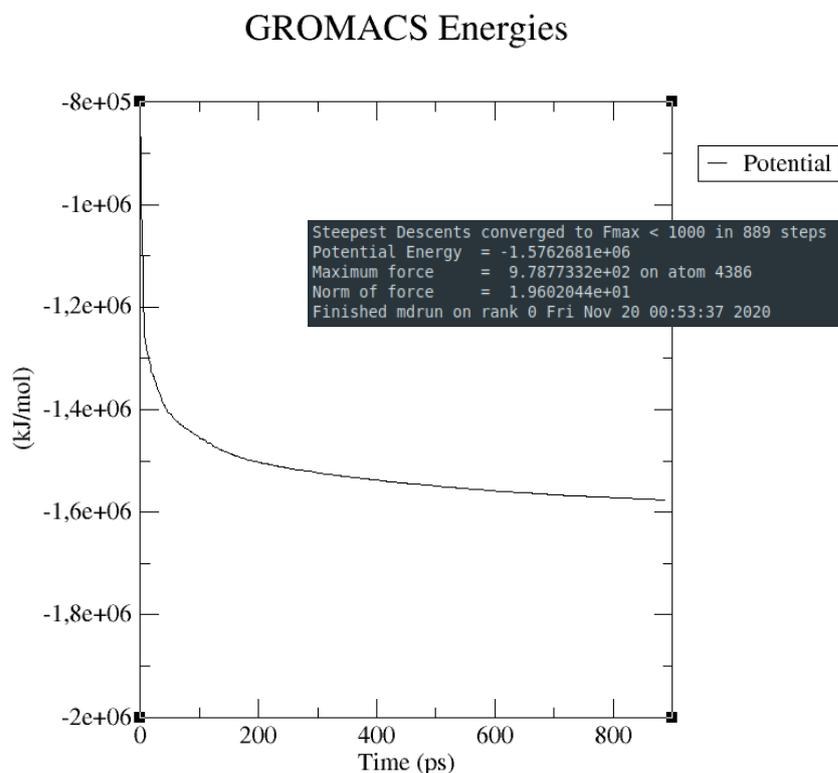
Figura 03. COX-1 e íons sódios, utilizados no equilíbrio de cargas, contidos na célula unitária. As moléculas de solvente foram omitidas nessa visualização.



Um novo arquivo de parâmetros chamado `em.mdp` (com o parâmetro `coulombtype = PME`) é criado no `xed` e só então executados os comandos `gmx grompp` e `gmx mdrun` para o cálculo de minimização de energia, obtendo-se ao final de 889 etapas a energia potencial do sistema (Figura 4) e o arquivo `cox*_em.gro`

contendo a proteína em sua conformação minimizada (ABRAHAM, 2015; LEMKUL, 2018).

Figura 4. Gráfico da energia potencial obtido após a etapa de minimização de energia.



Através do programa Pymol foram abertos os arquivos `cox*_em.gro` e retiradas as moléculas de água (HOH), íons sódio (NA) e outros artefatos gerados no procedimento (como fragmentos de cadeia duplicadas e deslocadas) para só então serem salvos os arquivos `cox*_em.pdb`.

Foi novamente utilizado o programa ADT para desta vez abrir o arquivo `cox*_em.pdb` e estabelecer o "GRID", ou seja, a região do espaço onde as tentativas de encaixe dos ligantes se darão na etapa de Docking Molecular. O arquivo foi salvo como `proteim.pdbqt`, formato de entrada no qual o Docking Molecular pode ser realizado no programa AutoDock Vina.

2.4 Seleção, obtenção e preparo dos ligantes:

O estudo experimental desenvolvido em cultura de células sanguíneas humanas, por Warner e Colaboradores em 1999, foi utilizado como referência para a seleção dos ligantes, tendo em vista sua citação por importantes livros-texto que abordam o tema dos antiinflamatórios (BRUNTON, 2012). No estudo de Warner 45 compostos foram avaliados quanto a concentração inibitória em 50% (IC₅₀) e a concentração inibitória em 80% (IC₈₀) sobre as isoformas COX-1 e COX-2. Foram utilizados dois tipos de ensaio, *Human Whole Blood Assay* (WBA) e *William Harvey Human Modified Whole Blood Assay* (WHMA). Os dados foram posteriormente plotados em uma razão de IC₅₀ de COX-1 por IC₅₀ de COX-2 (em WBA) e IC₅₀ de COX-1 por IC₅₀ de COX-2 (em WHMA), bem como, IC₈₀ de COX-1 por IC₈₀ de COX-2 (em WBA) e ainda IC₈₀ de COX-1 por IC₈₀ de COX-2 (em WHMA). Ao final foi possível gerar um ranking de seletividade pela COX-2 proposto na Tabela 2.

Tabela 2: Concentrações inibitórias, razões e ranking proposto por Warner e colaboradores, 1999.

| Compound | COX-1 | | WBA-COX-2 | | WHMA-COX-2 | | IC ₅₀ ratios | | IC ₈₀ ratios | | Ranking at IC ₈₀ ratios | |
|-----------------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-------------------------|------------|-------------------------|------------|------------------------------------|------------|
| | IC ₅₀ , μM | IC ₈₀ , μM | IC ₅₀ , μM | IC ₈₀ , μM | IC ₅₀ , μM | IC ₈₀ , μM | WBA COX-1 | WHMA COX-1 | WBA COX-1 | WHMA COX-1 | WBA COX-1 | WHMA COX-1 |
| 6MNA | 42 | 130 | 146 | 580 | n.d. | n.d. | 3.5 | n.d. | 4.5 | n.d. | 27 | n.d. |
| Aspirin | 1.7 | 8.0 | >100 | >100 | 7.5 | 30 | >100 | 4.4 | >100 | 3.8 | 34 | 23 |
| Carprofen | 0.087 | 19 | 4.3 | 75 | n.d. | n.d. | 50 | n.d. | 3.9 | n.d. | 25 | n.d. |
| Diclofenac | 0.075 | 1.0 | 0.038 | 0.27 | 0.020 | 0.23 | 0.5 | 0.3 | 0.27 | 0.23 | 10 | 9 |
| Fenoprofen | 3.4 | 23 | 41 | 100 | 5.9 | 24 | 12 | 1.7 | 4.3 | 1.0 | 26 | 18 |
| Flufenamate | 3.0 | 80 | 9.3 | 79 | n.d. | n.d. | 3.1 | n.d. | 1.0 | n.d. | 13 | n.d. |
| Flubiprofen | 0.075 | 1.0 | 5.5 | 24 | 0.77 | 51 | 73 | 10 | 24 | 51 | 31 | 27 |
| Ibuprofen | 7.6 | 58 | 7.2 | 67 | 20 | 150 | 0.9 | 2.6 | 1.2 | 2.6 | 14 | 20 |
| Indomethacin | 0.013 | 0.46 | 1.0 | 5.0 | 0.13 | 2.0 | 80 | 10 | 11 | 4.3 | 29 | 24 |
| Ketoprofen | 0.047 | 1.0 | 2.9 | 22 | 0.24 | 6.0 | 61 | 5.1 | 22 | 6.0 | 31 | 25 |
| Ketorolac | 0.00019 | 0.0034 | 0.086 | 4.0 | 0.075 | 1.0 | 453 | 395 | 1176 | 294 | 33 | 28 |
| Meclofenamate | 0.22 | 3.0 | 0.7 | 8.0 | 0.2 | 1.0 | 3.2 | 0.91 | 2.7 | 0.3 | 22 | 11 |
| Mefenamic acid | 25 | >100 | 2.9 | >100 | 1.3 | >100 | 0.11 | 0.049 | - | - | - | - |
| Naproxen | 9.3 | 110 | 28 | 260 | 35 | 330 | 3.0 | 3.8 | 2.4 | 3.0 | 18 | 22 |
| Niflumic acid | 25 | 77 | 5.4 | 35 | 11 | 74 | 0.22 | 0.43 | 0.45 | 1.0 | 12 | 16 |
| Piroxicam | 2.4 | 15 | 7.9 | 31 | 0.17 | 7.0 | 3.3 | 0.1 | 2.1 | 0.47 | 17 | 13 |
| Sulindac sulphide | 1.9 | 38 | 55 | 100 | 1.21 | 11 | 29 | 0.64 | 2.6 | 0.29 | 20 | 10 |
| Suprofen | 1.1 | 3.0 | 8.7 | 56 | 8.3 | 100 | 7.7 | 7.3 | 19 | 33 | 30 | 26 |
| Tenidap | 0.081 | 5.0 | 2.9 | 13 | n.d. | n.d. | 35.2 | n.d. | 2.6 | n.d. | 21 | n.d. |
| Tolmetin | 0.35 | 5.0 | 0.82 | 43 | 1.3 | 13 | 2.3 | 3.8 | 8.6 | 2.6 | 28 | 21 |
| Tomoxiprol | 7.6 | 35 | 20 | 84 | 0.32 | 13 | 2.7 | 0.042 | 2.4 | 0.37 | 19 | 12 |
| Zomepirac | 0.43 | 2.0 | 0.81 | 6.0 | 0.096 | 2.0 | 1.9 | 0.22 | 3.0 | 1.0 | 23 | 17 |
| Celecoxib | 1.2 | 28 | 0.83 | 6.0 | 0.34 | 3.0 | 0.7 | 0.3 | 0.21 | 0.11 | 8 | 7 |
| Etodolac | 12 | 69 | 2.2 | 8.0 | 0.94 | 3.0 | 0.2 | 0.1 | 0.12 | 0.043 | 6 | 5 |
| Meloxicam | 5.7 | 22 | 2.1 | 7 | 0.23 | 2.0 | 0.37 | 0.040 | 0.32 | 0.091 | 11 | 6 |
| Nimesulide | 10 | 41 | 1.9 | 7.0 | 0.39 | 7.0 | 0.19 | 0.038 | 0.17 | 0.17 | 7 | 8 |
| Diisopropyl fluorophosphate | >100 | >100 | 0.76 | 4.0 | 0.17 | 5.0 | <0.01 | <0.01 | <0.01 | <0.01 | 1= | 1= |
| L745,337 | >100 | >100 | 8.6 | 41 | 1.3 | 17 | <0.01 | <0.01 | <0.01 | <0.01 | 1= | 1= |
| NS398 | 6.9 | 65 | 0.35 | 1.0 | 0.042 | 1.0 | 0.051 | 0.0061 | 0.015 | 0.015 | 5 | 4 |
| Rofecoxib | 63 | >100 | 0.84 | 6.0 | 0.31 | 5.0 | 0.013 | 0.0049 | <0.05 | <0.05 | 4 | 3 |
| SC58125 | >100 | >100 | 2.0 | 10 | n.d. | n.d. | >0.01 | n.d. | <0.01 | n.d. | 1= | n.d. |
| 5-Aminosalicylic acid | 410 | >1000 | 61 | >1000 | n.d. | n.d. | 0.15 | n.d. | - | n.d. | - | n.d. |
| Ampyrone | 55 | 270 | 203 | 1000 | 85 | 670 | 3.7 | 1.5 | 3.7 | 2.5 | 24 | 19 |
| Diflunisal | 113 | 530 | 8.2 | 140 | 134 | 400 | 0.1 | 1.2 | 0.26 | 0.75 | 9 | 14 |
| Nabumetone | 460 | >1000 | >1000 | >1000 | 290 | >1000 | - | - | - | - | - | - |
| Paracetamol | >100 | >100 | 49 | >100 | 64 | >100 | - | - | - | - | - | - |
| Resveratrol | 30 | >100 | 39 | >100 | n.d. | n.d. | 1.3 | n.d. | - | - | - | n.d. |
| Salicin | >100 | >100 | >100 | >100 | n.d. | n.d. | - | n.d. | - | - | - | n.d. |
| Salicylaldehyde | >100 | >100 | >100 | >100 | n.d. | n.d. | - | n.d. | - | - | - | n.d. |
| Sodium salicylate | 4956 | 49000 | 34440 | 101000 | 482 | 45000 | 6.9 | 0.10 | 2.1 | 0.92 | 16 | 15 |
| Sulfasalazine | 3242 | 6400 | 2507 | 8300 | n.d. | n.d. | 0.8 | n.d. | 1.3 | n.d. | 15 | n.d. |
| Sulindac | >100 | >100 | >100 | >100 | 58 | >100 | - | - | - | - | - | - |
| Tamoxifen | 15 | >100 | 95 | >100 | n.d. | n.d. | 6.4 | n.d. | - | - | - | n.d. |
| Ticlopidine | 52 | >100 | 47 | >100 | n.d. | n.d. | 0.9 | n.d. | - | - | - | n.d. |
| Valeryl salicylate | 42 | >100 | 2.3 | >100 | n.d. | n.d. | 0.053 | n.d. | - | n.d. | - | n.d. |

Fonte: WARNER et. Al, 1999.

Os dados obtidos de IC80 pelo método WBA mostram que dos 45 compostos avaliados, os 10 com maior seletividade pela isoforma 2 foram: Diisopropyl fluorophosphate, L745,337, SC58125, Rofecoxib, NS398, Etodolac, Nimesulide, Celecoxib, Diflunisalm, Diclofenac. Do mesmo modo, os dados obtidos pelo método WHMA, mostram um resultado de seletividade muito semelhante, alterando-se apenas o resultado inconclusivo do composto SC58125 e incluindo o Sulindac sulphide em 10^a colocação.

De forma oposta os dados obtidos de IC80 pelo método WBA mostram que dos 45 compostos avaliados, os 10 com maior seletividade pela isoforma 1 foram: aspirina, ceterolaco, cetoprofeno, flurbiprofeno, suprofen, indometacina, tolmetin, 6MNA, fenoprofeno e carprofeno. Já no método WHMA, em função de muitos resultados inconclusivos, a ordem se altera para: ceterolaco, flurbiprofeno, suprofen, cetoprofeno, indometacina, aspirina, naproxeno, tolmetina, ibuprofeno e ampyrone.

Todos os arquivos de ligantes utilizados nos cálculos foram obtidos do banco de estruturas ChemBL pertencente ao National Institutes of Health (NIH). Eles foram obtidos no formato .sdf, e convertidos para o formato .pdb através do programa Avogadro.

2.5 Cálculo de afinidade por Docking Molecular:

No programa ADT os arquivos de todos os 45 ligantes foram abertos e definido o número de pontos de torsão a serem considerados nos cálculos de ancoragem. Em seguida, foi salvo um novo arquivo em formato .pdbqt para ser empregado na etapa seguinte de Docking Molecular.

Antes da realização do Docking foi formatado um arquivo de texto chamado de conf.txt no qual estiveram contidas todas as informações necessárias para que o programa de Docking identifique qual o ligante e qual a proteína alvo, além de estabelecidas as coordenadas do GRID BOX, caixa tridimensional pré-definida no ADT e na qual deve estar contido o sítio catalítico das enzimas.

A afinidade dos diversos ligantes em estudo pelo sítio do alvo enzimático testado foi determinada pelo programa ADV. Para isso funções de score presentes no programa calcularam a energia livre gerada após o ancoramento enzima-ligante

em diferentes conformações do ligante de acordo com os pontos de torção pré-definidos. Quanto maior for a energia livre liberada com a interação do ligante ao sítio catalítico da enzima maior será sua afinidade. De posse das tabelas de energia livre geradas no AutoDock Vina foram selecionados os ligantes de maior afinidade (TROTT, 2010).

Dentre os dados gerados no docking molecular, os mais importantes são os resultados de afinidade, porém, como parâmetro de avaliação e análises dos resultados, deve-se levar em consideração também o RMSD (desvio quadrático médio da raiz), onde valores abaixo de 2 mostra que a ligação entre a proteína e o ligante foi correta (PHILOT, 2010).

2.6 Análise de dados

Foi realizada a análise de correlação linear entre os valores experimentais de inibição de cada isoforma, e os valores de energia livre determinados in silico pelo método de docking molecular. Caso esta correlação mostre-se estatisticamente significativa ($r^2 > 0,3$), poderíamos afirmar que o método computacional demonstrou uma boa capacidade preditiva dos resultados experimentais, e recomendar seu emprego na prospecção de bioatividades de outros ligantes e biomacromoléculas-alvo que possam ser terapeuticamente úteis.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Determinação dos resíduos de aminoácido no sítio de interação

Através do programa UCSF ChimeraX versão 0.91 foram identificados os aminoácidos das ciclooxigenases que estavam envolvidos no sítio de interação com o AINE complexado, ou seja, aqueles que estavam a menos de 4 Ångströms de distância.

Figura 5. Representação 3D da molécula de rofecoxib rodeada pelos resíduos de aminoácidos envolvidos no sítio catalítico da enzima ciclooxigenase 2. Destacados em roxo estão os aminoácidos: ARG513, HIS90, PHE518, GLN192, SER353, TYR355, LEU352, VAL349, LEU531, SER530 e VAL523

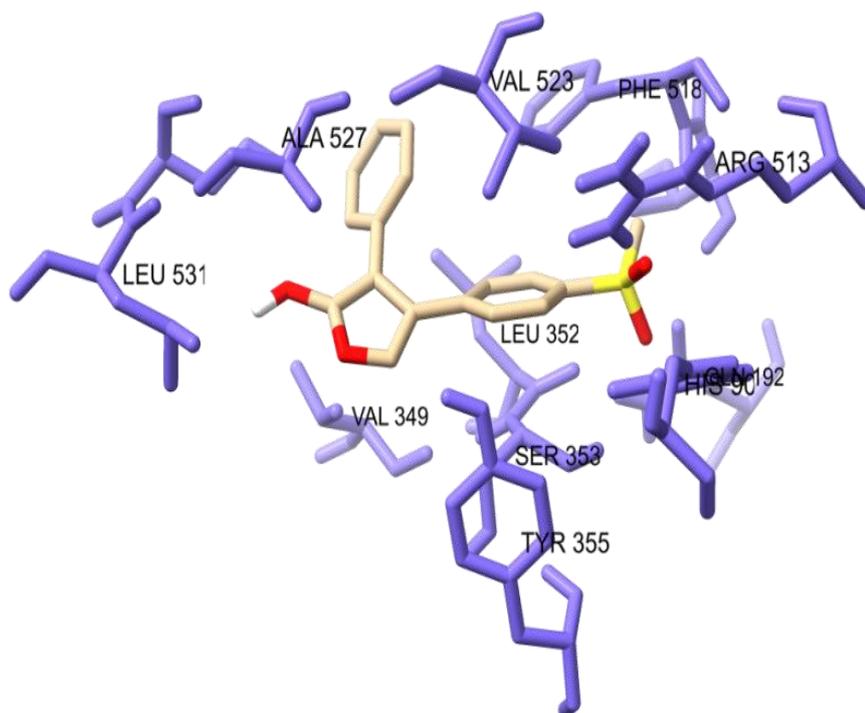
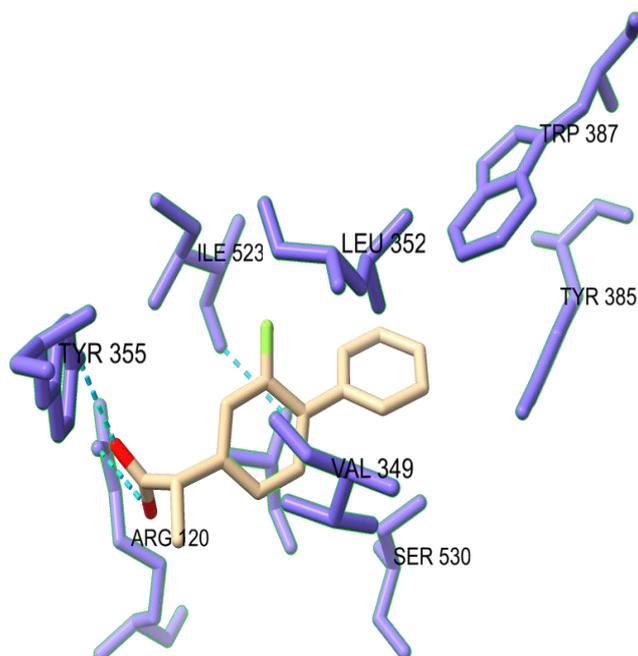


Figura 6: Representação 3D da molécula de flurbiprofeno rodeada pelos resíduos de aminoácidos envolvidos no sítio catalítico da enzima ciclooxigenase 1. Destacados em roxo estão os aminoácidos ARG120, SER530, TYR355, ILE523, LEU352, VAL349, TYR385 e TRP387.



3.2 Resultados do docking molecular:

As simulações de ancoragem molecular, pelos métodos rígido e flexível, dos 45 antiinflamatórios, sobre as duas isoformas da ciclooxigenase, gerou valores de energia livre de interação que estão organizados nas tabelas 3 e 4.

Tabela 3 As simulações de ancoragem 1 de Docking Rígido COX-1

| DOCKING RÍGIDO COX-1 | |
|-----------------------|-------|
| Substância | Valor |
| Piroxicam | -10.1 |
| Sulfasalazine | -9.4 |
| Tomoxiprol | -9.4 |
| Carprofen | -9.2 |
| Flubiprofen | -9.1 |
| Sulindac | -9.1 |
| L745337_Thioflosulide | -9.0 |
| Celexocib | -8.8 |
| Niflumic_acid | -8.7 |
| Naproxen | -8.6 |
| DOCKING RÍGIDO COX-1 | |
| Substância | Valor |
| Flufenamate | -8.5 |

| | |
|-------------------|------|
| Diflunisal | -8.5 |
| Ketoprofen | -8.5 |
| Fenoprofen | -8.3 |
| 6MNA | -8.2 |
| Mefenamic_acid | -8.2 |
| Tenidap | -8.2 |
| Tolmetin | -8.2 |
| Nimesulide | -8.1 |
| Resveratrol | -8.1 |
| Rofecoxib | -7.9 |
| Ketorolac | -7.8 |
| Nabumetone | -7.8 |
| SC58125 | -7.8 |
| Sulindac_sulphide | -7.8 |
| Zomepirac | -7.8 |
| Salicin | -7.7 |
| Suprofen | -7.7 |
| Tamoxifen | -7.7 |
| Amprone | -7.4 |

| | |
|-----------------------------|------|
| Indomethacin | -7.4 |
| Meloxicam | -7.4 |
| Ibuprofen | -7.2 |
| Valeryl_salicylate | -7.1 |
| Aspirin | -6.8 |
| Meclofenamate | -6.8 |
| NS398 | -6.8 |
| Etodolac | -6.6 |
| Diclofenac | -6.4 |
| Paracetamol | -6.4 |
| Sodium_salicylate | -6.4 |
| Ticlopidine | -6.4 |
| 5-Aminosalicylic_acid | -6.3 |
| Salicylaldehyde | -6.1 |
| Diisopropyl_fluorophosphate | -5.5 |

DOCKING FLEXÍVEL COX-1

| Substância | Valor |
|-----------------------|-------|
| Piroxicam | -10.1 |
| Sulfasalazine | -9.8 |
| Celexocib | -9.4 |
| SC58125 | -9.4 |
| Tomoxiprol | -9.4 |
| Carprofen | -9.2 |
| L745337_Thioflosulide | -9.1 |
| Meclofenamate | -9.1 |
| Zomepirac | -8.9 |
| Ketoprofen | -8.8 |
| Mefenamic_acid | -8.8 |
| Sulindac_sulphide | -8.8 |

DOCKING FLEXÍVEL COX-1

| Substância | Valor |
|-------------|-------|
| Flubiprofen | -8.7 |

| | |
|-----------------------------|------|
| Niflumic_acid | -8.7 |
| Rofecoxib | -8.7 |
| Diflunisal | -8.5 |
| Flufenamate | -8.5 |
| Ketorolac | -8.5 |
| Tenidap | -8.5 |
| Meloxicam | -8.4 |
| Nabumetone | -8.4 |
| Naproxen | -8.4 |
| Suprofen | -8.3 |
| Diclofenac | -8.2 |
| Tolmetin | -8.2 |
| Resveratrol | -8.1 |
| Sulindac | -8.1 |
| 6MNA | -8.0 |
| Ticlopidine | -8.0 |
| Fenoprofen | -7.9 |
| Ibuprofen | -7.8 |
| Indomethacin | -7.8 |
| Nimesulide | -7.7 |
| Salicin | -7.7 |
| Tamoxifen | -7.7 |
| Ampyrone | -7.4 |
| NS398 | -7.4 |
| Etodolac | -7.2 |
| Aspirin | -6.9 |
| Valeryl_salicylate | -6.6 |
| Sodium_salicylate | -6.4 |
| Salicylaldehyde | -6.1 |
| Paracetamol | -6.0 |
| 5-Aminosalicylic_acid | -5.8 |
| Diisopropyl_fluorophosphate | -5.0 |

Tabela 4 As simulações de ancoragem molecular r2

DOCKING RÍGIDO COX2

| Substância | Valor |
|----------------|-------|
| SC58125 | -11.0 |
| Sulfasalazine | -10.0 |
| Tomoxiprol | -9.6 |
| Flufenamate | -9.3 |
| Mefenamic_acid | -8.8 |
| Niflumic_acid | -8.8 |
| Carprofen | -8.5 |
| Ketoprofen | -8.4 |
| Tolmetin | -8.4 |
| Sulindac | -8.3 |

DOCKING RÍGIDO COX2

| Substância | Valor |
|------------|-------|
| Ketorolac | -8.2 |
| 6MNA | -8.1 |
| Celexocib | -8.0 |

| | |
|-----------------------|------|
| Diclofenac | -8.0 |
| Nabumetone | -8.0 |
| Nimesulide | -8.0 |
| Diflunisal | -7.9 |
| Indomethacin | -7.9 |
| Suprofen | -7.9 |
| Piroxicam | -7.8 |
| Sulindac_sulphide | -7.8 |
| Resveratrol | -7.7 |
| Flubiprofen | -7.6 |
| Meloxicam | -7.6 |
| Ibuprofen | -7.4 |
| Rofecoxib | -7.4 |
| Tamoxifen | -7.4 |
| Fenoprofen | -7.3 |
| L745337_Thioflosulide | -7.2 |
| Valeryl_salicylate | -7.2 |
| Ampyrone | -7.0 |
| Naproxen | -7.0 |
| Tenidap | -7.0 |

| | | | |
|-----------------------------|------|-------------------|------|
| Aspirin | -6.9 | Sulindac_sulphide | -9.1 |
| Salicin | -6.9 | Mefenamic_acid | -9.0 |
| Meclofenamate | -6.8 | Nabumetone | -8.8 |
| Ticlopidine | -6.8 | Tolmetin | -8.6 |
| Zomepirac | -6.8 | Salicin | -8.5 |
| NS398 | -6.7 | Sulindac | -8.4 |
| Etodolac | -6.6 | Tenidap | -8.4 |
| Paracetamol | -6.4 | NS398 | -8.3 |
| 5-Aminosalicylic_acid | -6.2 | Suprofen | -8.3 |
| Sodium_salicylate | -6.2 | Ketoprofen | -8.2 |
| Salicylaldehyde | -5.7 | Naproxen | -8.2 |
| Diisopropyl_fluorophosphate | -5.6 | Indomethacin | -8.0 |

DOCKING FLEXÍVEL COX2

| Substância | Valor |
|---------------|-------|
| Celexocib | -11.8 |
| Sulfasalazine | -11.5 |
| Ketorolac | -10.2 |
| Tomoxiprol | -9.8 |
| Niflumic_acid | -9.7 |
| Flufenamate | -9.6 |
| Carprofen | -9.5 |
| Diclofenac | -9.4 |
| Resveratrol | -9.4 |
| Diflunisal | -9.2 |
| Fenoprofen | -9.2 |

DOCKING FLEXÍVEL COX2

| Substância | Valor |
|-------------|-------|
| Rofecoxib | -9.2 |
| Tamoxifen | -9.2 |
| Flubiprofen | -9.1 |

| | |
|-----------------------------|------|
| Zomepirac | -8.0 |
| Ampyrone | -7.8 |
| Ibuprofen | -7.7 |
| Meloxicam | -7.7 |
| Piroxicam | -7.7 |
| L745337_Thioflosulide | -7.6 |
| SC58125 | -7.6 |
| Meclofenamate | -7.5 |
| 6MNA | -7.4 |
| Valeryl_salicylate | -7.4 |
| Etodolac | -7.1 |
| Nimesulide | -6.8 |
| Aspirin | -6.5 |
| Paracetamol | -6.4 |
| Ticlopidine | -6.4 |
| 5-Aminosalicylic_acid | -6.2 |
| Sodium_salicylate | -6.2 |
| Diisopropyl_fluorophosphate | -6.0 |
| Salicylaldehyde | -5.5 |

Para análise dos dados os 45 compostos foram distribuídos em 3 grupos de seletividade de acordo com os dados experimentais:

1. **Seletivos COX-1:** Foram considerados seletivos COX-1 aqueles cuja razão entre a $IC_{50}\text{-COX-2}/IC_{50}\text{-COX-1}$ e $IC_{80}\text{-COX-2}/IC_{80}\text{-COX-1}$ em ambos ensaios (WBA e WHMA) forneceu valores acima de 2. O que quer dizer que a concentração necessária para inibir em 50 ou 80% a atividade da COX-2 é maior ou igual ao dobro da necessária para inibir em 50 ou 80% a atividade COX-1.

2. **Seletivos COX-2:** Foram considerados seletivos COX-2 aqueles cuja razão entre a $IC_{50}\text{-COX-2}/IC_{50}\text{-COX-1}$ e $IC_{80}\text{-COX-2}/IC_{80}\text{-COX-1}$ em ambos ensaios (WBA e WHMA) forneceu valores abaixo de 0,5. O que quer dizer que a concentração necessária para inibir em 50% ou 80% a atividade da COX-1 é maior ou igual ao dobro da necessária para inibir em 50% ou 80% da atividade COX-2.

3. Não Seletivos ou Inconclusivos: Foram considerados não seletivos aqueles cuja razão entre a IC_{50} -COX-2/ IC_{50} -COX-1 e IC_{80} -COX-2/ IC_{80} -COX-1 em ambos ensaios (WBA e WHMA) forneceu valores entre 0,5 e 2. Foram considerado inconclusivos aqueles em que um ensaio mostrou maior seletividade por COX-1 (Razão > 2) enquanto o outro mostrou por COX-2 (Razão < 0,5) ou quando a IC de algum dos ensaios não pôde ser determinada (valor n.d.).

O agrupamento resultante está descrito nas tabelas a seguir:

Tabela 5: Razão dos valores de IC_{50} COX-2 (WBA e WHMA)/COX-1. Quanto maior o valor de razão maior será a concentração necessária para inibir 50% da COX-2 em relação a COX-1 e assim maior seletividade pela COX-1:

| GRUPO 1 | Razão IC_{50} COX-2/COX-1 | | MÉDIA |
|--------------|-----------------------------|------|-------|
| | WBA | WHMA | |
| Ketorolac | 453 | 395 | 424 |
| Indomethacin | 80 | 10 | 45 |
| Flubiprofen | 73 | 10 | 41,5 |
| Ketoprofen | 61 | 5,1 | 33,05 |
| Suprofen | 7,7 | 7,3 | 7,5 |
| Naproxen | 3 | 3,8 | 3,4 |
| Tolmetin | 2,3 | 3,8 | 3,05 |

Tabela 6: Razão dos valores de IC_{80} COX-2 (WBA e WHMA)/COX-1. Quanto maior o valor de razão maior será a concentração necessária para inibir 80% da COX-2 em relação a COX-1 e assim maior seletividade pela COX-1:

| GRUPO 1 | Razão IC_{80} COX-2/COX-1 | | MÉDIA |
|--------------|-----------------------------|------|-------|
| | WBA | WHMA | |
| Ketorolac | 1176 | 294 | 735 |
| Flubiprofen | 24 | 51 | 37,5 |
| Suprofen | 19 | 33 | 26 |
| Ketoprofen | 22 | 6 | 14 |
| Indomethacin | 11 | 4,3 | 7,65 |
| Tolmetin | 8,6 | 2,6 | 5,6 |
| Ampyrone | 3,7 | 2,5 | 3,1 |
| Naproxen | 2,4 | 3 | 2,7 |

Tabela 7: Razão dos valores de IC_{50} COX-2 (WBA e WHMA)/COX-1. Quanto menor o valor de razão menor será a concentração necessária para inibir 50% da COX-2 em relação a COX-1 e assim maior seletividade pela COX-2:

| GRUPO 2 | Razão IC50 COX-2/COX-1 | | |
|-----------------------------|------------------------|--------|---------|
| | WBA | WHMA | MÉDIA |
| Rofecoxib | 0,013 | 0,0049 | 0,00895 |
| Diisopropyl fluorophosphate | 0,01 | 0,01 | 0,01 |
| L745,337 | 0,01 | 0,01 | 0,01 |
| NS398 | 0,051 | 0,0061 | 0,02855 |
| Mefenamic acid | 0,11 | 0,049 | 0,0795 |
| Nimesulide | 0,19 | 0,038 | 0,114 |
| Etodolac | 0,2 | 0,1 | 0,15 |
| Meloxicam | 0,37 | 0,04 | 0,205 |
| Niflumic acid | 0,22 | 0,43 | 0,325 |

Tabela 8: Razão dos valores de IC₅₀ COX-2 (WBA e WHMA)/COX-1. Quanto menor o valor de razão menor será a concentração necessária para inibir 80% da COX-2 em relação a COX-1 e assim maior seletividade pela COX-2:

| GRUPO 2 | Razão IC80 COX-2/COX-1 | | |
|-----------------------------|------------------------|-------|--------|
| | WBA | WHMA | MÉDIA |
| Diisopropyl fluorophosphate | 0,01 | 0,01 | 0,01 |
| L745,337 | 0,01 | 0,01 | 0,01 |
| NS398 | 0,015 | 0,015 | 0,015 |
| Rofecoxib | 0,05 | 0,05 | 0,05 |
| Etodolac | 0,12 | 0,043 | 0,0815 |
| Celexocib | 0,21 | 0,11 | 0,16 |
| Nimesulide | 0,17 | 0,17 | 0,17 |
| Meloxicam | 0,32 | 0,091 | 0,2055 |
| Diclofenac | 0,27 | 0,23 | 0,25 |

Ficaram então definidos os composto do Quadro 1 a seguir como aqueles que apresentaram seletividade de acordo com os dados experimentais:

Quadro 1. Substâncias que apresentaram seletividade

| GRUPO 1 | GRUPO 2 |
|--------------|-----------------------------|
| Ketorolac | Diisopropyl fluorophosphate |
| Flubiprofen | L745,337 |
| Suprofen | NS398 |
| Ketoprofen | Rofecoxib |
| Indomethacin | Mefenamic acid |
| Tolmetin | Etodolac |
| Ampyrone | Celexocib |

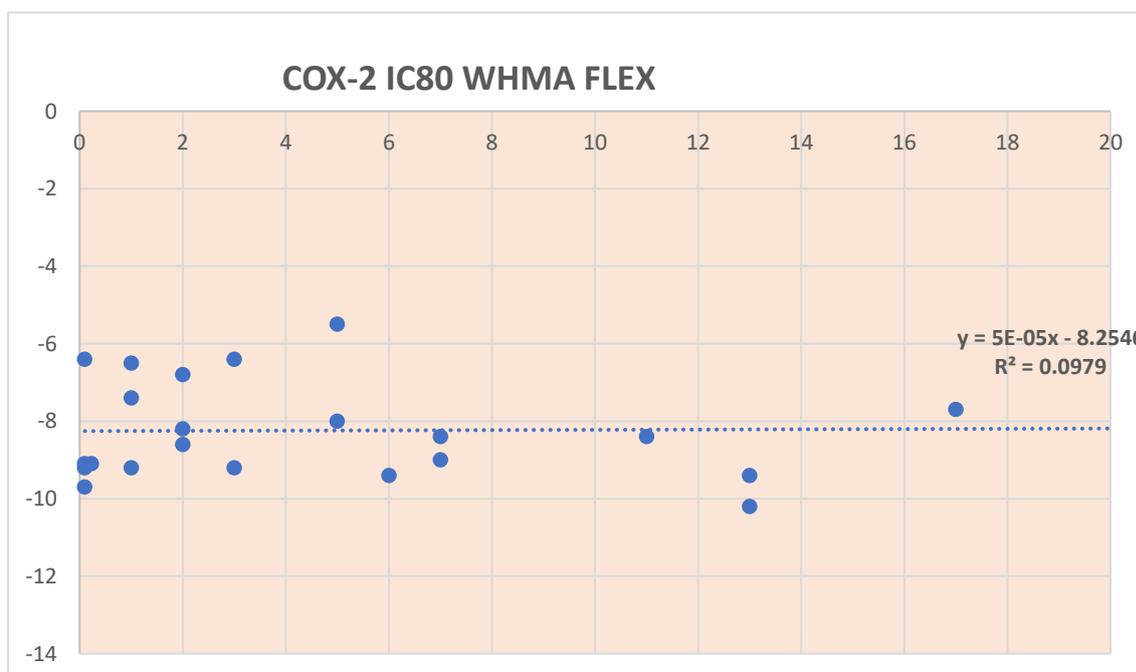
| | |
|----------|------------|
| Naproxen | Nimesulide |
| | Meloxicam |
| | Diclofenac |

4. ANÁLISE ESTATÍSTICA

O cálculo de regressão linear foi aplicado no cruzamento entre os valores experimentais de concentração inibitória nos métodos WBA e WHMA (IC₅₀ e IC₈₀ em μ M) e os valores de energia livre de interação geradas nas simulações por Docking rígido ou flexível (Δ G em kJ/Mol). Ao final se estabeleceu o coeficiente de correlação de Pearson (R) para cada cruzamento. Em sua quase totalidade, os valores de R estiveram abaixo de 0,3, podendo ser interpretados como desprezíveis (MUKAKA, 2012).

O gráfico 1, em que se estabeleceu a única correlação acima de 0,3 (R = 0,313), entre os dados de IC₈₀ para a COX-2 e o Docking Flexível, é considerada fracamente positiva e podemos notar no gráfico que a inclinação da reta é praticamente imperceptível. É possível em fim interpretar que as variações dos valores de energia livre, determinados por docking, não apresentam correlação linear estatisticamente válida com os dados experimentais de IC₅₀ e IC₈₀ dos compostos testados. Desse modo a simples observação do valor de energia liberado no docking não terá valor na avaliação de afinidade e consequente prospecção de novos ligantes inibidores.

Gráfico 1: Cálculo de correlação linear entre os valores de IC₈₀ para a COX-2 e de energia livre no Docking Flexível. Os dados de IC acima de 20 foram suprimidos para melhor visualização da área com maior número de pontos.



Dentre os fatores que podem ter contribuído para o resultado insatisfatório estão o fato de que nem todos os ligantes interagiram de forma restrita na região do espaço determinada no grid (Figura 7). Isso ficou evidenciado pelos elevados valores de desvio quadrático médio Além disso temos que considerar que moléculas maiores podem apresentar maior energia de interação, que assim está relacionada a área de superfície de contato e não necessariamente a complementariedade e afinidade ao sítio.

Figura 7: Docking flexível da COX-2 com o Rofecoxibe. Aminoácidos flexíveis do sítio catalítico são mostrados em verde, conformações do ligante que interagem com o sítio destacados em vermelho e conformações fora do sítio em laranja.

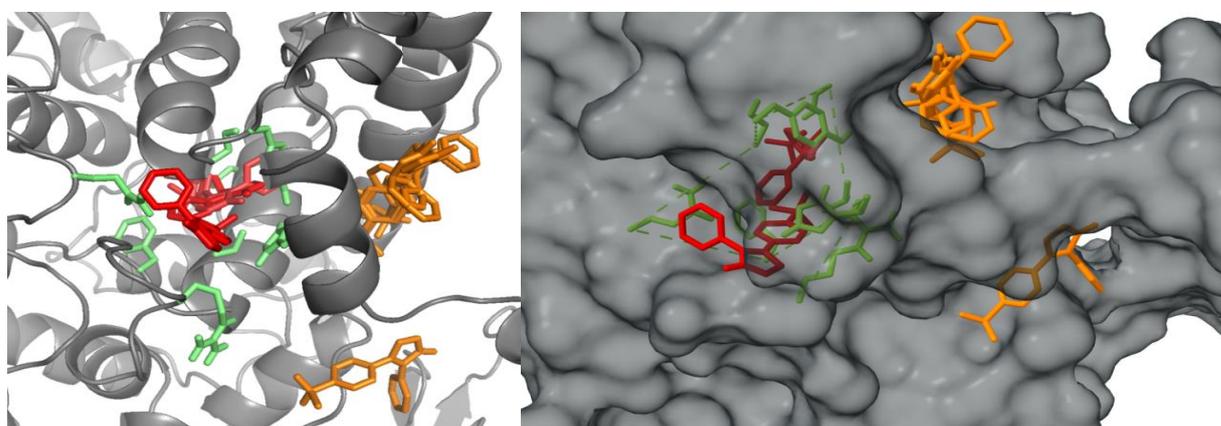


Tabela 10. Tabela com os ligantes antiinflamatórios testados dispostos por ordem decrescente da razão entre a energia de docking rígido ou flexível para cox-2 dividida pela energia de docking na cox-1. Estão destacados em verde aqueles que, de acordo com os dados experimentais, apresentaram-se seletivos pela enzima cox-2 (Grupo 2) e destacados em laranja aqueles cuja seletividade nos resultados experimentais apontavam para a cox-1 (Grupo 1). Todos os demais encontram-se sem destaques.

| Docking Rígido | | Docking Flexível | |
|-----------------------|--------|-----------------------------|--------|
| Compostos: | Razão | Compostos: | Razão |
| 5-Aminosalicilic acid | 1,0891 | Diflunisal | 1,1735 |
| 6MNA | 1,0638 | 5-Aminosalicilic acid | 1,1683 |
| Tamoxifen | 1,0469 | Niflumic acid | 1,1000 |
| Tenidap | 1,0313 | 6MNA | 1,0851 |
| Suprofen | 1,0303 | Fenoprofen | 1,0588 |
| Ampyrone | 1,0213 | SC58125 | 1,0575 |
| Zomepirac | 1,0182 | Suprofen | 1,0562 |
| Sulfasalazine | 1,0147 | Sodium salicylate | 1,0460 |
| Aspirin | 1,0109 | Ampyrone | 1,0460 |
| Sulindac | 1,0000 | Meloxicam | 1,0455 |
| Sulindac sulphide | 1,0000 | Diisopropyl fluorophosphate | 1,0455 |

| | | | |
|-----------------------------|--------|--------------------|--------|
| Ticlopidine | 1,0000 | Zomepirac | 1,0455 |
| Meloxicam | 0,9873 | Sulfasalazine | 1,0440 |
| Nabumetone | 0,9872 | Celexocib | 1,0435 |
| Tomoxiprol | 0,9841 | Rofecoxib | 1,0426 |
| Indomethacin | 0,9756 | Aspirin | 1,0353 |
| Ketoprofen | 0,9756 | Diclofenac | 1,0345 |
| Meclofenamate | 0,9753 | Flufenamate | 1,0333 |
| Naproxen | 0,9744 | Etodolac | 1,0330 |
| Niflumic acid | 0,9744 | Ibuprofen | 1,0319 |
| Rofecoxib | 0,9730 | Ketorolac | 1,0164 |
| SC58125 | 0,9722 | Salicylaldehyde | 1,0118 |
| Sodium salicylate | 0,9718 | Nimesulide | 1,0000 |
| Tolmetin | 0,9688 | Paracetamol | 1,0000 |
| Carprofen | 0,9670 | Valeryl salicylate | 1,0000 |
| Celexocib | 0,9670 | Tenidap | 1,0000 |
| Diisopropyl fluorophosphate | 0,9655 | Tolmetin | 1,0000 |
| Etodolac | 0,9651 | Tomoxiprol | 1,0000 |
| Fenoprofen | 0,9647 | Resveratrol | 1,0000 |
| Ibuprofen | 0,9639 | Salicin | 1,0000 |
| Ketorolac | 0,9634 | Sulindac | 0,9881 |
| L745,337 | 0,9634 | NS398 | 0,9877 |
| Mefenamic acid | 0,9630 | Tamoxifen | 0,9877 |
| Paracetamol | 0,9610 | L745,337 | 0,9872 |
| Diflunisal | 0,9545 | Naproxen | 0,9870 |
| Flubiprofen | 0,9529 | Nabumetone | 0,9750 |
| Nimesulide | 0,9487 | Sulindac sulphide | 0,9747 |
| NS398 | 0,9487 | Piroxicam | 0,9744 |
| Piroxicam | 0,9481 | Carprofen | 0,9740 |
| Salicin | 0,9459 | Flubiprofen | 0,9697 |
| Salicylaldehyde | 0,9459 | Meclofenamate | 0,9625 |
| Diclofenac | 0,9444 | Indomethacin | 0,9610 |
| Flufenamate | 0,9412 | Ticlopidine | 0,9595 |
| Resveratrol | 0,9351 | Mefenamic acid | 0,9444 |
| Valeryl salicylate | 0,9344 | Ketoprofen | 0,9420 |

De acordo com os valores descritos na tabela 10 é possível aferir que o docking rígido não apresentou capacidade preditiva útil para identificar a seletividade dos agentes antiinflamatórios tendo em vista que os resultados acima de 1,0 deveriam estar relacionados a compostos com maior tendência a seletividade por cox-2. Contudo observamos que dos 9 compostos com valores de razão cox-2/cox-1 acima de 1,0 nenhum deles se enquadrava como cox-2 seletivo de acordo com os dados experimentais.

Já os dados de razão cox-2/cox-1 relacionados ao método de docking flexível mostram que os 22 compostos com resultados acima de 1,0, e que assim deveriam identificar compostos cox-2 seletivos, 6 apresentam de fato esta seletividade de

acordo com os dados experimentais e apenas 3 são na realidade cox-1 seletivos. Podemos então apontar uma melhor tendência do método flexível em promover a triagem de ligantes úteis quando comparado ao método rígido.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

É importante ressaltar que as técnicas de CADD devem ser encaradas como auxiliares e otimizadoras do processo de desenvolvimento de novos fármacos. Elas podem apontar para ligantes mais promissores, dentro de bibliotecas de milhões de compostos, os quais seriam inviáveis de serem submetidos aos ensaios experimentais *in vitro* e *in vivo* tradicionais. Deste modo, a técnica flexível se mostrou com utilidade na realização da triagem de compostos com promissora bioatividade, contudo, não poderiam por si só atribuir tais atividades estando sempre ao final vinculados a necessidade de dados experimentais

O estudo apresentado tem como benefício a busca de uma melhor compreensão do emprego de técnicas computacionais de desenvolvimento de fármacos e principalmente de suas limitações. A melhor tendência encontrada no método de docking molecular flexível parece apontar para o potencial promissor desta técnica na triagem de bibliotecas de ligantes, contudo necessita ser aperfeiçoada até que possa corroborar com confiabilidade e precisão resultados de bioensaios experimentais.

REFERÊNCIAS

WEI, Pengcheng et al. Substrate analog interaction with MCR-1 offers insight into the rising threat of the plasmid-mediated transferable colistin resistance. **The FASEB Journal**, [s.l.], v. 32, n. 2, p.1085-1098, fev. 2018. FASEB.

ELLIS CR, Kruhlak NL, Kim MT, Hawkins EG, Stavitskaya L (2018) Predicting opioid receptor binding affinity of pharmacologically unclassified designer substances using molecular docking. **PLOS ONE 13(5)**: e0197734.

MACHADO, Karina S et al. FReDoWS: a method to automate molecular docking simulations with explicit receptor flexibility and snapshots selection. **Bmc Genomics**, Ouro Preto, p.2-17, 18 out. 2010.

LIN, Michael Y. et al. The Importance of Long-term Acute Care Hospitals in the Regional Epidemiology of *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase–Producing Enterobacteriaceae. **Clinical Infectious Diseases**, [s.l.], v. 57, n. 9, p.1246-1252, 14 ago. 2013. Oxford University Press (OUP).

LOMONACO S, CRAWFORD MA, LASCOLS C, TIMME RE, Anderson K, et al. (2018) Resistome of carbapenem- and colistin-resistant *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates. **PLOS ONE 13(6)**: e0198526.

ZHOU, Yonglin et al. In Vitro/Vivo Activity of Potential MCR-1 Inhibitor in Combination With Colistin Againsts mcr-1-Positive *Klebsiella pneumoniae*. **Frontiers In Microbiology**, [s.l.], v. 9, p.1-9, 17 jul. 2018. Frontiers Media SA.

PATERSON, David L; A HARRIS, Patrick N. Colistin resistance: a major breach in our last line of defence. **The Lancet Infectious Diseases**, [s.l.], v. 16, n. 2, p.132-133, fev. 2016. Elsevier BV.

A DIMASI, Joseph; HANSEN, Ronald W; GRABOWSKI, Henry G. The price of innovation: new estimates of drug development costs. **Journal Of Health Economics**, [s.l.], v. 22, n. 2, p.151-185, mar. 2003. Elsevier BV.

DIMASI, Joseph A.; GRABOWSKI, Henry G.; HANSEN, Ronald W.. Innovation in the pharmaceutical industry: New estimates of R&D costs. **Journal Of Health Economics**, [s.l.], v. 47, p.20-33, maio 2016. Elsevier BV.

LIU, Yi-yun et al. Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: a microbiological and molecular biological study. **The Lancet Infectious Diseases**, [s.l.], v. 16, n. 2, p.161-168, fev. 2016. Elsevier BV.

BLAIR, Jessica M. A. et al. Molecular mechanisms of antibiotic resistance. **Nature Reviews Microbiology**, [s.l.], v. 13, n. 1, p.42-51, 1 dez. 2014. Springer Nature.

LAEEQ, Shainda et al. AN OVERVIEW OF THE COMPUTER AIDED DRUG DESIGNING. **World Journal Of Pharmacy And Pharmaceutical Sciences**, Kursi Road, v. 3, n. 5, p.963-994, 26 abr. 2014.

SLIWOSKI, G. et al. Computational Methods in Drug Discovery. **Pharmacological Reviews**, [s.l.], v. 66, n. 1, p.334-395, 31 dez. 2013. American Society for Pharmacology & Experimental Therapeutics (ASPET).

WISHART DS, FEUNANG YD, MARCU A, Guo AC, Liang K, et al., HMDB 4.0 — The Human Metabolome Database for 2018. *Nucleic Acids Res.* 2018. Jan 4;46(D1):D608-17. 29140435

BERMAN, H. M.; WESTBROOK, J.; FENG, Z.; GILLILAND, G.; BHAT, T. N.; WEISSIG, H. "**The Protein Data Bank**", *Rev. Nucl. Acids*, vol. 28, pág 235–242, 2000.

HANWELL, M.D.; CURTIS, D.E.; LONIE, D.C.; VANDERMEERSCH, T.; ZUREK, E.; HUTCHISON, G.R. "**Avogadro: uma plataforma de análise, visualização e análise química semântica avançada**" *Journal of Cheminformatics*, 2012.

Disponível em <

https://www.editorarealize.com.br/revistas/joinbr/trabalhos/TRABALHO_EV081_MD1_SA41_ID1915_08092017144321.pdf> Acesso em: 17 Mai 2019.

Law V, Knox C, Djoumbou Y, Jewison T, Guo AC, Liu Y, Maciejewski A, Arndt D, Wilson M, Neveu V, Tang A, Gabriel G, Ly C, Adamjee S, Dame ZT, Han B, Zhou Y, Wishart DS. DrugBank 4.0: shedding new light on drug metabolism. *Nucleic Acids Res.* 2014 Jan 1;42(1):D1091-7.

SLIWOSKI, G. , KOTHIWALE, S. , MEILER,J. LOWE, E.W. , Computational Methods in Drug Discovery *Pharmacol Rev* 66:334–395, January 2014.

TROTT, O. Olson, A.J. e AutoDock Vina: melhorando a velocidade e a precisão do docking com uma nova função de pontuação, otimização eficiente e multithreading, *Journal of Computational Chemistry* 31 (2010) 455-461

ABRAHAM, M.J. , VAN DER SPOEL, D. , LINDAHL, E. , HESS, B. and the GROMACS development team, *GROMACS User Manual version 5.0.7*,(2015)

LEMKUL, J.A. "From Proteins to Perturbed Hamiltonians: A Suite of Tutorials for the GROMACS-2018 Molecular Simulation Package, v1.0" *Living J. Comp. Mol. Sci.*(2018)

KIM S, J CHEN, CHENG T, GINDULYTE A, ELE J, ELE S, LI Q, SHOEMAKER BA, THIESSEN PA, YU B, L ZASLAVSKY, ZHANG J, BOLTON EE. Atualização PubChem 2019: melhor acesso a dados químicos. *Ácidos Nucleicos Res.* 2019.

STERLING e IRWIN, *ZINC 15 – Ligand Discovery for Everyone.* J. Chem. Inf. Modelo, 2015