

UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO
ESCOLA DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**MODO DE INTERAÇÃO DOS ÁCIDOS OLEANÓLICO E URSÓLICO
COM AS ISOFORMAS DA CICLOOXIGENASE ATRAVÉS DE
DOCKING E DINÂMICA MOLECULAR**

Autor: Wendell Santos Magalhães

Orientador: Prof. Dr. Tanus Jorge Nagem

Co-Orientadora: Prof.^a Dr.^a Célia Maria Corrêa

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas – CIPHARMA, para obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas. Área de Concentração: Fármacos e Medicamentos. Linha de Pesquisa: Química e Farmacologia de Substâncias Bioativas.

Ouro Preto – MG

2010

M188m Magalhães, Wendell Santos.
Modo de interação dos ácidos oleanólico e ursólico com as isoformas da ciclooxigenase através de *docking* e dinâmica molecular [manuscrito] / Wendell Santos Magalhães. – 2010.
ix, 60 f.: il. color., grafs., tabs.

Orientador: Prof. Dr. Tanus Jorge Nagem.
Co-orientadora: Profa. Dra. Célia Maria Corrêa.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Ouro Preto. Escola de Farmácia. Programa de Pós graduação em Ciências Farmacêuticas.
Área de concentração: Fármacos e Medicamentos
1. Oxigenases - Teses. 2. Anti-inflamatórios - Teses. 3. Ácidos - Teses.
4. Dinâmica molecular - Teses. I. Universidade Federal de Ouro Preto. II. Título.

CDU: 615.276

Catálogo: sisbin@sisbin.ufop.br



UFOP
Universidade Federal
de Ouro Preto



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
Universidade Federal de Ouro Preto – UFOP
Escola de Farmácia

1



ATA DA SESSÃO DE DEFESA DA 33ª DISSERTAÇÃO DO PROGRAMA DE
PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DA ESCOLA DE
FARMÁCIA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO

1 Aos vinte e seis dias do mês de novembro de dois mil e dez, sexta-feira, realizou-se, a
2 partir das treze horas, na sala 104 do Bloco de Salas - Campus, a sessão de defesa de
3 dissertação do candidato ao grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas, **WENDELL**
4 **SANTOS MAGALHÃES** intitulada “Modo de interação dos ácidos oleanólico e
5 ursólico com as isoformas da ciclooxigenase através de *docking* e dinâmica molecular”.
6 A Banca Examinadora constituiu-se dos Professores Doutores: Romulo Leite
7 (Departamento de Farmácia/UFOP), Nelilma Correia Romeiro (Instituto de Química -
8 UFRJ) e Célia Maria Corrêa (Departamento de Farmácia – UFOP) co-orientadora. De
9 acordo com o regulamento do Curso, a co-orientadora, Prof^ª. Dr^ª. Célia Maria Corrêa,
10 presidente da banca, abriu a sessão, passando a palavra ao candidato, que fez a
11 exposição do seu trabalho. Em seguida, foi realizada a arguição pelos examinadores na
12 ordem registrada acima, com a respectiva defesa do candidato. Finda a arguição, a
13 Banca Examinadora se reuniu, sem a presença do candidato e do público, tendo
14 deliberado pela sua aprovação. Nada mais havendo
15 para constar, lavrou-se a presente ata por mim, Mirela Pena Fagundes, secretária do
16 CiPharma, e fez-se a leitura pública da presente ata que segue assinada pelos membros
17 da Banca Examinadora e pela Coordenadora do Curso. Ouro Preto, 26 de novembro de
18 2010.

19
20

21 Prof. Dr. Romulo Leite
22 (DEFAR/UFOP)

23

24 Prof^ª. Dr^ª. Nelilma Correia Romeiro
25 (DEFAR/UFOP)

26
27

28 Prof^ª. Dr^ª. Célia Maria Corrêa
29 (DEFAR/UFOP)

30

31 Prof^ª. Dr^ª. Vanessa Carla Furtado Mosqueira
32

33 Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas.
34
35

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Química Medicinal da Universidade Federal de Ouro Preto, sob responsabilidade da Prof.^a Dr.^a Célia Maria Corrêa, com colaboração do Núcleo de Estudos em Quimioinformática da Universidade Federal de Minas Gerais, sob responsabilidade do Prof. Dr. Júlio César Dias Lopes, e do Laboratório de Modelagem Molecular da Universidade Federal do Rio de Janeiro, sob responsabilidade do Prof. Dr. Ricardo Bicca de Alencastro.

Os recursos necessários à execução do projeto são provenientes das instituições federais de ensino UFOP, UFMG e UFRJ, bem como das agências de fomento Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de nível Superior (CAPES), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) e Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ). A bolsa de mestrado foi concedida pela FAPEMIG.

AGRADECIMENTOS

A Deus pela vida e por ter colocado no meu caminho aqueles que serão citados a partir de agora;

Aos meus pais por não terem medido esforços para que eu tivesse uma educação de qualidade, bem como à minha irmã, avós e demais familiares pelo apoio e compreensão dos momentos de ausência;

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da UFOP pela oportunidade;

Ao Prof. Tanus Nagem pela confiança e convivência;

À Prof.^a Célia Corrêa pela convivência, confiança e orientação;

Ao Prof. Ricardo Bicca por ter me acolhido no seu laboratório, pela convivência e pela parceria;

Ao Prof. Julio Lopes e à Prof.^a Nelilma Romeiro pelas sugestões, bem como ao Prof. Julio Lopes pela cessão da estrutura do seu laboratório;

À FAPEMIG pela concessão da bolsa de mestrado e à PROPP/UFOP pela concessão do auxílio financeiro necessário à minha permanência no Rio de Janeiro;

Às instituições de ensino UFOP (especialmente à PROPLAD), UFMG e UFRJ, bem como aos órgãos de fomento FAPERJ, FAPEMIG, CNPq e CAPES, por terem investido nos laboratórios utilizados;

Aos colegas do Laboratório de Química Medicinal da UFOP – Thaíse, Fábio, Thiago, Camila, Keiti e Danilo – e do Laboratório de Modelagem Molecular da UFRJ – Thiago, Fabrício, André, Eugênio, Jocley, Bruno, Guilherme, Lucas e Prof.^a Magaly – pela convivência, apoio e sugestões;

Ao Lúcio, Marquinhos e Rodrigo por terem me acolhido no Rio de Janeiro;

Aos colegas do Departamento de Química da UFOP pela convivência e apoio;

Aos colegas e amigos que, apesar de não estarem relacionados diretamente à execução desse trabalho, contribuíram nos momentos de descontração;

À Câmara de Vereadores de Ouro Preto pela flexibilização dos horários de trabalho e concessão dos afastamentos;

Aos membros da banca examinadora, Prof.^a Nelilma Romeiro e Prof. Rômulo Leite, pelo aceite do convite e pelas contribuições à versão final dessa dissertação.

“Não fiz o melhor, mas fiz tudo para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas não sou o que era antes.” (Martin Luther King)

“A maior recompensa do nosso trabalho não é o que nos pagam por ele, mas aquilo em que ele nos transforma.” (John Ruskin)

RESUMO

Os triterpenoides ácidos oleanólico (AO) e ursólico (AU) mostraram atividade anti-inflamatória não-seletiva *in vitro* por inibição da ciclooxigenase (COX), relacionada a processos fisiológicos e patológicos como a inflamação. Os testes *in vitro* de inibição das isoformas COX com AO e AU mostraram a inibição, por esses ligantes, de COX-1 (IC_{50} 380 μ M e 210 μ M, respectivamente) e COX-2 (IC_{50} 295 μ M e 130 μ M, respectivamente), sugerindo que a inibição de ambos sobre COX-2 é levemente favorecida, apesar de não serem seletivos. Com o intuito de determinar o modo de interação entre AO e AU e as isoformas COX, e explicar a atividade inibitória observada experimentalmente, submeteu-se as conformações 3D de AO e AU minimizadas por AM1 ao *docking* (AutoDock 4.0) com 9 estruturas cristalográficas das isoformas COX-1 ovina e COX-2 murina, complexadas a diferentes ligantes, que previamente foram submetidas ao *docking* com seus ligantes cristalográficos minimizados para validar a metodologia. Os complexos de AO e AU no sítio ativo das isoformas COX com diferentes orientações denominadas 1 e 2 foram selecionados para dinâmica molecular (GROMACS 4), utilizando campo de força GROMOS96 versão 45A3 e atribuição de cargas Hartree-Fock/6-31G calculadas com auxílio do programa Gaussian 03W após minimização de energia pelo referido método. Os complexos finais da DM, obtidos após 15,2 ns de simulação, mostraram que a orientação 2 de AO em COX-2 é mais favorável e que, em ambas as isoformas, os grupos carboxilato dos ligantes interagiram por ligação de hidrogênio com Arg120, Tyr355, Tyr385, Ser530, enquanto as hidroxilas em C-3 o fizeram com Tyr385, Ser353, Tyr348. Algumas dessas interações foram mediadas por água, que se mostrou importante em todos os complexos. Em alguns deles, os grupos carboxilato dos ligantes, passíveis de modificação por semi-síntese, aproximaram-se de resíduos da cavidade de seletividade, mais acessível em COX-2, o que é importante para o planejamento de inibidores COX-2-seletivos. Os resultados obtidos neste trabalho forneceram subsídios importantes para a determinação do modo de inibição das isoformas COX, principalmente a COX-2, por AO e AU.

ABSTRACT

Oleanolic acid (OA) and ursolic acid (UA) triterpenoids have shown a non-selective anti-inflammatory activity *in vitro* by inhibiting cyclooxygenase (COX), related to physiological and pathological processes such as inflammation. Tests *in vitro* inhibiting COX isoforms with OA and UA have shown COX-1 (IC_{50} 380 μ M and 210 μ M, respectively) and COX-1 and COX-2 (IC_{50} 295 μ M and 130 μ M, respectively) inhibition by these ligands, suggesting the inhibition of both is slightly favored when compared to COX-2, although they are not selective. With the purpose of determining the interaction among OA and UA and COX isoforms, and explaining the inhibitory activity observed experimentally, 3D conformations of both OA and UA minimized by AM1 have been submitted to docking (AutoDock 4.0) with 9 crystallographic structures of ovine COX-1 and murine COX-2 isoforms, complexed to different ligands, which have previously been submitted to docking with its crystallographic ligands minimized to validate the methodology. OA and UA complexes in the active site of COX isoforms with different orientations denominated 1 and 2 have been selected for the molecular dynamics (GROMACS 4), using a GROMOS96 force field, version 45A3 and charge attribution Hartree-Fock/6-31G calculated using Gaussian 03W program after energy minimization by the method referred to previously. Final DM complexes, obtained after 15.2 ns of simulation, have shown that OA orientation 2 in COX-2 is more favorable and that, in both isoforms, ligand carboxylate groups interacted by hydrogen bonding with Arg120, Tyr355, Tyr385, Ser530, whereas hydroxyls in C-3 have done it with Tyr385, Ser353, Tyr348. Some of these interactions have been mediated by water, which was shown to be important for all complexes. In some of them, ligand carboxylate groups, liable to modifications through semi-synthesis, approached residues of selectivity cavity, more accessible in COX-2, which is important to plan COX-2-selective inhibitors. Results obtained in this work have provided important insights to determine how to inhibit COX isoforms, particularly COX-2, by OA and UA.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: Cascata de produção dos prostanóides a partir do ácido araquidônico	4
FIGURA 2: Sítios ativos de isoformas ciclooxigenase	5
FIGURA 3: Interações por ligação de hidrogênio (em pontilhado) e seus respectivos ângulos HÂY ideais, medidos conforme a hibridação dos átomos aceptores O e N	6
FIGURA 4: Estruturas moleculares do AAS, diclofenaco e dos COX-2-seletivos lumiracoxibe, celecoxibe, rofecoxibe, valdecoxibe e etoricoxibe	8
FIGURA 5: Estrutura química dos ácidos oleanólico e ursólico	10
FIGURA 6: Interações entre átomos não ligados e entre átomos ligados (estiramento, vibração angular e torção do diedro próprio)	12
FIGURA 7: Estruturas químicas dos ligantes complexados às estruturas das isoformas COX	28
FIGURA 8: Sobreposições dos ligantes cristalográficos construídos, obtidos por <i>docking</i> , aos ligantes obtidos das estruturas do PDB	32
FIGURA 9: Orientações, obtidas por <i>docking</i> , de AO/AU nos sítios rígidos de COX-1 e COX-2	33
FIGURA 10: Orientação 1 de AO complexada ao sítio ativo de COX-1 (2OYE) após DM	38
FIGURA 11: Orientação 1 de AO complexada ao sítio ativo de COX-1 (1DIY) após DM	39
FIGURA 12: Orientação 2 de AO complexada ao sítio ativo de COX-1 (1DIY) após DM	40
FIGURA 13: Orientação 1 de AO complexada ao sítio ativo de COX-2 (3PGH) após DM	42
FIGURA 14: Orientação 2 de AO complexada ao sítio ativo de COX-2 (4COX) após DM	43
FIGURA 15: Orientação 1 de AU complexada ao sítio ativo de COX-1 (1DIY) após DM	45
FIGURA 16: Orientação 1 de AU complexada ao sítio ativo de COX-1 (2OYE) após DM	46
FIGURA 17: Orientação 2 de AU complexada ao sítio ativo de COX-1 (1DIY) após DM	47
FIGURA 18: Orientação 2 de AU complexada ao sítio ativo de COX-1 (2OYE) após DM	48
FIGURA 19: Orientação 1 de AU complexada ao sítio ativo de COX-2 (4COX) após DM	50
FIGURA 20: Orientação 1' de AU complexada ao sítio ativo de COX-2 (4COX) após DM	51
FIGURA 21: Orientação 2 de AU complexada ao sítio ativo de COX-2 (4COX) após DM	52

LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICO 1: Variação de energia dos potenciais de Lennard-Jones (A) e Couloumb (B) conforme a distância interatômica r entre os átomos i e j	13
GRÁFICO 2: Correlação do RMSD e do número de <i>clusters</i> , obtidos no <i>docking</i> , com o número de ligações torcionáveis dos ligantes	32

GRÁFICO 3: RMSD de C α dos monômeros de isoformas COX referentes aos complexos de AO com COX-1, AO com COX-2, AU com COX-1 e AU com COX-2	36
--	----

LISTA DE TABELAS

TABELA 1: <i>Docking</i> dos monômeros de isoformas COX com seus respectivos ligantes	31
TABELA 2: <i>Docking</i> de AO e AU com os monômeros rígidos de COX	34
TABELA 3: Interações por ligação de hidrogênio do complexo mostrado na FIGURA 10	38
TABELA 4: Interações por ligação de hidrogênio do complexo mostrado na FIGURA 11	39
TABELA 5: Interações por ligação de hidrogênio do complexo mostrado na FIGURA 12	40
TABELA 6: Interações por ligação de hidrogênio do complexo mostrado na FIGURA 13	42
TABELA 7: Interações por ligação de hidrogênio do complexo mostrado na FIGURA 14	43
TABELA 8: Interações por ligação de hidrogênio do complexo mostrado na FIGURA 15	45
TABELA 9: Interações por ligação de hidrogênio do complexo mostrado na FIGURA 16	46
TABELA 10: Interações por ligação de hidrogênio do complexo mostrado na FIGURA 17	47
TABELA 11: Interações por ligação de hidrogênio do complexo mostrado na FIGURA 18	48
TABELA 12: Interações por ligação de hidrogênio do complexo mostrado na FIGURA 19	50
TABELA 13: Interações por ligação de hidrogênio do complexo mostrado na FIGURA 20	51
TABELA 14: Interações por ligação de hidrogênio do complexo mostrado na FIGURA 21	52

LISTA DE ABREVIATURAS

Å – angstrom

AA – ácido araquidônico

AM1 – modelo de Austin 1 (*Austin Model 1*)

AMBER – *Assisted Model Building with Energy Refinement*

AO – ácido oleanólico

Arg – arginina

AU – ácido ursólico

AINE – anti-inflamatório não-esteroidal

AINES – anti-inflamatórios não-esteroidais

C α – carbono alfa

COX – ciclooxigenase

ΔG_{bind} – energia livre de *binding*

DFT – Teoria do Funcional de Densidade (*Density Functional Theory*)

DM – dinâmica molecular
Gln – glutamina
GROMACS – *Groningen Machine for Chemical Simulations*
GROMOS – *Groningen Molecular Simulation Package*
Glu – glutamato
Gly – glicina
HF – Hartree-Fock
His – histidina
HIV – vírus da imunodeficiência adquirida
IC₅₀ – concentração inibitória 50 % (*inhibitory concentration 50 %*)
Ile – isoleucina
kcal.mol⁻¹ – quilocaloria por mol
kDa – kilodalton
Leu – leucina
Lis – lisina
LGA – algoritmo genético Lamarckiano (*Lamarckian genetic algorithm*)
LINCS – *Linear Constraint Solver*
Met – metionina
NPT – ensemble com número de partículas, pressão e temperatura constantes
ns – nanossegundo
PDB – *Protein Data Bank* (disponível em www.pdb.org)
PG – prostaglandina
Phe – fenilalanina
Pro – prolina
ps - picossegundo
RMSD – raiz do desvio quadrático médio (*root mean square deviation*)
SPC – *Simple Point Charge*
Ser – serina
Trp – triptofano
Tyr – tirosina
V(x_i) – energia potencial V do átomo i na posição x que ele ocupa
Val – valina

SUMÁRIO

I. INTRODUÇÃO	1
II. OBJETIVOS	2
III. REVISÃO DE LITERATURA	3
III.1 - O processo inflamatório e as isoformas da ciclooxigenase	3
III.2 - Formação de complexos receptor-ligante	6
III.3 - Anti-inflamatórios não-esteroidais inibidores de COX	7
III.4 - Os triterpenoides ácidos oleanólico e ursólico	10
III.5 - Modelagem molecular aplicada ao planejamento racional de fármacos baseado no receptor	11
III.5.1 - Mecânica Molecular (Campos de Força)	11
III.5.2 - Mecânica Quântica	13
III.6 - Métodos computacionais para previsão de interações proteína-ligante	15
III.7 - AutoDock 4.0	18
III.8 - Dinâmica Molecular	21
III.8.1 - Campo de força GROMOS96	22
III.8.2 - Equações do movimento aplicáveis à DM	23
III.8.3 - Parâmetros aplicáveis à simulação por DM	24
III.8.4 - Etapas da simulação por DM	26
III.9 - Associação de <i>docking</i> e DM para o estudo de complexos receptor-ligante	27
IV. METODOLOGIA	27
IV.1 - Preparação das estruturas de isoformas COX e dos ligantes para o <i>docking</i>	27
IV.2 - <i>Docking</i> dos ligantes cristalográficos e triterpenoides com monômeros de isoformas COX	28
IV.3 - DM e <i>redocking</i> de AO e AU com monômeros obtidos de complexos equilibrados	29
V. RESULTADOS E DISCUSSÃO	30
V.1 - <i>Docking</i> dos monômeros de isoformas COX obtidos do PDB com os respectivos ligantes ..	30
V.2 - <i>Docking</i> de AO e AU com as estruturas cristalográficas rígidas de COX	33
V.3 - DM dos complexos de AO e AU com monômeros de isoformas COX e <i>redocking</i>	36
V.3.1 - Complexos de AO com COX-1	37
V.3.2 - Complexos de AO com COX-2	41
V.3.3 - Complexos de AU com COX-1	44
V.3.4 - Complexos de AU com COX-2	49
VI. CONCLUSÕES	53
VII. PERSPECTIVAS	53
VIII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	54

I. INTRODUÇÃO

A inflamação é a resposta do organismo a estímulos nocivos químicos, físicos ou biológicos. Embora seja benéfica para o indivíduo, leva a efeitos indesejáveis como dor, tumor, calor e rubor; além disso, existem patologias inflamatórias crônicas que necessitam de tratamento contínuo com fármacos anti-inflamatórios não-esteroidais (AINES) ou esteroidais (corticosteróides) [BURKE, SMYTH & FITZGERALD, 2006]. Os AINES são utilizados para o tratamento de condições inflamatórias agudas e crônicas e bloqueiam a atividade das isoformas da enzima ciclooxigenase (COX) [HEMLER & LANDS, 1976] diminuindo a síntese, a partir do substrato ácido araquidônico (AA), do precursor de prostanoídes [BERGSTRÖM, DANIELSSON & SAMUELSSON, 1964; VANE, 1971]. Duas isoformas da COX foram identificadas: a constitutiva COX-1 é expressa em muitos tecidos e requerida para a produção dos prostanoídes envolvidos na função básica de manutenção do organismo, enquanto COX-2 é considerada uma isoforma induzível cuja expressão é ativada em resposta a numerosos fatores pró-inflamatórios, apesar de estar presente constitutivamente em alguns tecidos [BOTTING, 2006]; dessa forma, a síntese de prostanoídes é aumentada durante a inflamação devido ao aumento da atividade de COX-2 [MASFERRER *et al.*, 1990].

Estudos de modelagem por homologia e de estruturas cristalográficas das isoformas COX complexadas aos AINES [HARMAN *et al.*, 2007; KURUMBAIL *et al.*, 1996; PICOT, LOLL & GARAVITO, 1994] contribuíram para a elucidação da estrutura das isoformas. Ambas as isoformas contêm dois sítios ativos, hidropoxidase e ciclooxigenase, sendo que este é o alvo molecular dos AINES e apresenta-se como um longo canal lipofílico mais largo em COX-2 do que em COX-1.

Diversos AINES estão disponíveis atualmente no mercado e dividem-se em AINES clássicos (inibem COX-1 e COX-2) e AINES COX-2-seletivos, que são moléculas mais volumosas e por isso inibem seletivamente a COX-2. Como a COX-1 é considerada uma enzima constitutiva, a sua inibição em tratamentos de patologias crônicas com AINES clássicos causa uma variedade de efeitos no organismo como depressão da função renal e lesões na mucosa gástrica [MITCHELL & WARNER, 2006]. Em 1998, a fim de tratar a inflamação e contornar esses efeitos colaterais, a indústria farmacêutica começou a lançar os fármacos COX-2 seletivos, celecoxibe (Celebra[®], Pfizer), rofecoxibe (Vioxx[®], Merck), valdecoxibe (Bextra[®], Pfizer; sucessor do celecoxibe), etoricoxibe (Arcoxia[®], Merck; sucessor do rofecoxibe) e lumiracoxibe (Prexige[®]), que surgiram com a promessa de resolução de graves problemas inflamatórios crônicos.

Entretanto, em 2000 foi publicado o estudo clínico VIGOR (*Vioxx Gastrintestinal Outcomes Research*), que indicou o risco cardiovascular associado ao uso crônico por mais de 18 meses do rofecoxibe [BOMBARDIER *et al.*, 2000]. Em seguida, outros estudos clínicos comprovaram tal

risco relacionado a ele e a outros coxibes [BRESALIER *et al.*, 2005; SOLOMON *et al.*, 2005; NUSSMEIER *et al.*, 2005; MUKHERJEE, NISSEN & TOPOL, 2001; FITZGERALD, 2002], o que culminou na proibição da comercialização de alguns fármacos dessa classe em diversos países. No Brasil, o rofecoxibe foi retirado do mercado em 2004, o uso do valdecoxibe ficou restrito a hospitais em 2005 e a dosagem do etoricoxibe foi reduzida em 25% e 50%, enquanto o celecoxibe ainda se mantém no mercado na dosagem recomendada e o lumiracoxibe foi retirado em 2008 devido à grave toxicidade hepática decorrente do metabolismo [KUEHN, 2008]. Assim, com exceção do rofecoxibe e lumiracoxibe, os COX-2-seletivos ainda são utilizados, embora com restrições, o que sugere que a inibição seletiva de COX-2 pode ser viável para o tratamento crônico de inflamações e torna o planejamento de candidatos a fármacos COX-2-seletivos necessário e justificável. Esse planejamento pode se basear, por exemplo, em moléculas naturais que demonstraram atividade inibitória sobre isoformas COX, seletiva ou não para COX-2. Dentre aquelas não-seletivas, encontram-se os ácidos oleanólico (AO) e ursólico (AU), triterpenoides naturais que inibiram isoformas COX *in vitro* [RINGBOM *et al.*, 1998].

Atualmente, estão disponíveis diversas ferramentas computacionais para estudos de planejamento de candidatos a fármacos e são largamente utilizadas pela indústria farmacêutica devido à comprovada eficácia e ao tempo e custo que são otimizados durante o processo.

Dessa forma, neste trabalho objetivou-se estudar, através de metodologias *in silico* como *docking* e dinâmica molecular (DM), o modo de interação de AO e AU com as isoformas COX.

II. OBJETIVOS

Neste trabalho, propõe-se estudar, através de *docking* e dinâmica molecular, o modo de interação dos triterpenoides com as isoformas COX.

São considerados objetivos específicos:

- 1) Validar a metodologia de *docking*, no AutoDock 4.0, através do *docking* de nove estruturas cristalográficas de isoformas COX com seus respectivos ligantes 3D minimizados;
- 2) Submeter as referidas estruturas de isoformas COX a *docking* com AO e AU e analisar as orientações e conformações desses triterpenoides nos sítios ativos, selecionando para a DM aqueles complexos que apresentarem interações diferentes entre si;
- 3) Submeter os complexos selecionados a longa trajetória de DM e analisar as interações obtidas ao final da trajetória, após estabilizada;
- 4) Submeter AO e AU a *redocking* com as estruturas de isoformas COX obtidas dos complexos ao final da trajetória de DM para avaliar se os valores de energia livre de *binding* calculados se correlacionarão aos valores de IC₅₀ experimentais relatados.

III. REVISÃO DE LITERATURA

III.1 – O processo inflamatório e as isoformas da ciclooxigenase

A inflamação é a resposta do organismo a estímulos nocivos químicos, físicos ou biológicos, e envolve diversas células e mediadores, que são produzidos no plasma e/ou nas células e regulam reações vasculares e celulares gerando dor, tumor, calor e rubor. Sendo localizada ou sistêmica, desenvolve-se nas fases aguda (vasodilatação local e aumento da permeabilidade capilar), sub-aguda (infiltração de células fagocitárias) e proliferativa crônica (degeneração tissular e fibrose) [BURKE, SMYTH & FITZGERALD, 2006].

Dentre os mediadores, merecem destaque as prostaglandinas (PG), cujo tipo E₂ (PGE₂) foi sintetizado a partir do AA num sistema enzimático proveniente de vesículas seminais ovinas [BERGSTRÖM, DANIELSSON & SAMUELSSON, 1964]. Em 1971, VANE mostrou que a biossíntese das PG foi drasticamente diminuída pelos AINES. Em 1976, a enzima responsável pela conversão do AA a PGE₂ foi isolada do referido sistema enzimático e denominada ciclooxigenase [HEMLER & LANDS, 1976]. Em 1990, postulou-se a existência de uma isoforma variante de COX devido ao aumento da síntese de PG causado pela endotoxina LPS (lipopolissacarídeo bacteriano) e à manutenção dos níveis de atividade da conhecida COX, que foi denominada COX-1 e considerada constitutiva enquanto a isoforma induzível pelo LPS foi denominada COX-2 [MASFERRER *et al.*, 1990].

Vários estudos posteriores contribuíram para elucidar o papel de isoformas COX em processos fisiológicos e patológicos. Conforme a FIGURA 1, o estímulo inflamatório contribui para o aumento da concentração intracelular de íons cálcio, o que ativa a enzima fosfolipase A₂, responsável pela liberação de AA para a célula a partir da hidrólise de fosfolipídeos de membrana. AA é metabolizado pelo sítio ativo ciclooxigenase das isoformas a prostaglandina G₂ (PGG₂), que por sua vez é metabolizada pelo sítio ativo hidroxiperoxidase a prostaglandina H₂ (PGH₂). PGH₂ é metabolizável por isomerases teciduais específicas originando prostanoídes capazes de ativar receptores acoplados à proteína G, causando numerosos efeitos fisiológicos e patológicos como a inflamação [FITZGERALD, 2003]. Foi confirmado, ainda, que COX-1 é uma isoforma cujo gene é constitutivamente expresso em vários tecidos e, sob condições fisiológicas, produz prostanoídes necessários à modulação das funções gastrintestinais, renais e à homeostase vascular; confirmaram também que COX-2, presente principalmente no cérebro e na medula espinhal, é induzível porque o respectivo gene tem a expressão aumentada em células inflamatórias em resposta a agentes pró-inflamatórios, citocinas, endotoxinas e fatores de crescimento, embora a isoforma esteja presente constitutivamente em regiões glomerulares e em vasos sanguíneos renais, sendo importante para a

manutenção das funções fisiológicas cardiovasculares e renovasculares [BOTTING, 2006]. Foi também relatada a existência da COX-3, posteriormente identificada como uma variante da COX-1 expressa no cérebro e no coração que apresenta a sequência de aminoácidos da COX-1, porém com trinta resíduos de aminoácidos extras [CHANDRASEKHARAN *et al.*, 2002; SCHWAB *et al.*, 2003].

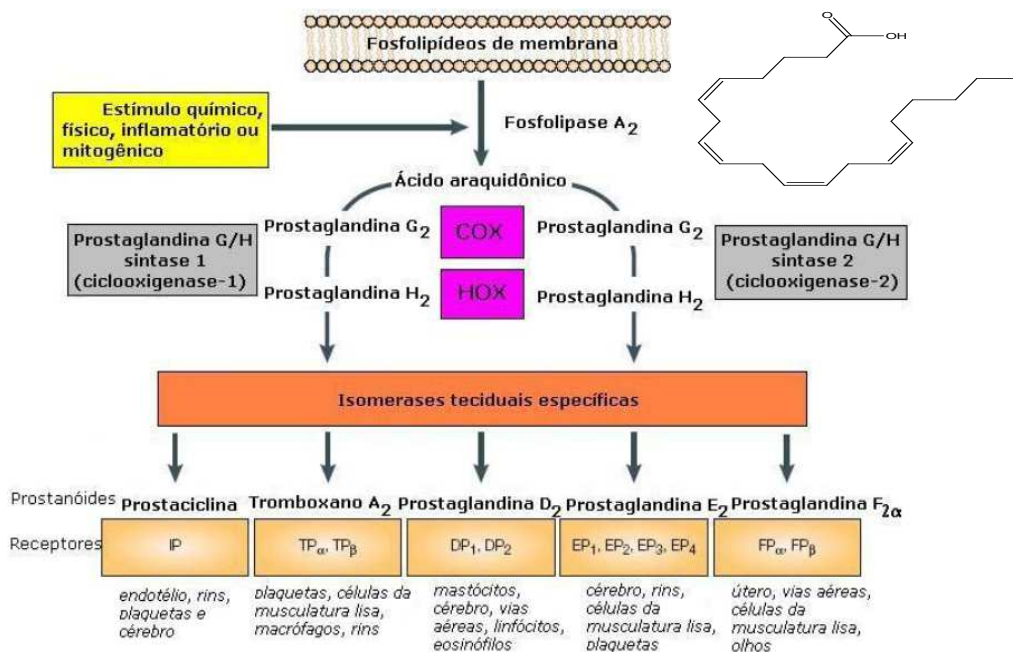


FIGURA 1: Cascata de produção dos prostanoídes a partir do AA (Adaptado de FITZGERALD, 2003). COX e HOX correspondem, respectivamente, aos sítios ciclooxigenase e hidroxilase.

Estudos de modelagem comparativa e de estruturas cristalográficas das isoformas COX complexadas aos AINES [HARMAN *et al.*, 2007; KURUMBAIL *et al.*, 1996; PICOT, LOLL & GARAVITO, 1994] contribuíram para a elucidação das estruturas das isoformas, que serão descritas nesse parágrafo conforme as três referências citadas. As isoformas COX-1 e COX-2 humanas são proteínas integrais de membrana que apresentam massa molecular de 71 kDa por monômero e identidade de sequência de aproximadamente 60% e, por esse motivo, têm estruturas tridimensionais altamente conservadas, com desvio quadrático médio (RMSD – *root mean square deviation*) de 0,9 Å para todos os carbonos alfa (C α) da cadeia peptídica (*backbone*). Entre as estruturas de isoformas COX humanas e COX-1 ovina e COX-2 murina, utilizadas experimentalmente, há aproximadamente 60% e 87% de identidade de sequência nas estruturas da proteína completa e do sítio ativo, respectivamente. As estruturas terciárias de isoformas COX são compostas por três domínios distintos: os resíduos N-terminais 33 a 72 formam o domínio de ligação do fator de crescimento epidérmico, os resíduos 73 a 116 formam o domínio de ligação à membrana, que consiste de uma espiral de alfa-hélices A a D anfipáticas que inserem a isoforma na membrana, sendo que a hélice D prolonga-se ao interior da enzima formando o domínio catalítico

globular C-terminal (resíduos 117 a 587) que contém os sítios ativos ciclooxygenase e hidroxiperoxidase [PICOT, LOLL & GARAVITO, 1994]. Daqui em diante, qualquer menção a sítio ativo referir-se-á somente ao sítio ciclooxygenase, alvo farmacológico dos AINES. O sítio ativo das isoformas COX, simplificada representado na FIGURA 2, é um longo canal lipofílico cuja entrada é uma constrição feita por Tyr355, Arg120 e Glu524 na superfície da enzima. Os dois últimos resíduos citados interagem por interações eletrostáticas mantendo a hélice D fixa e a entrada do canal aberta. Entretanto, na presença do substrato ou de inibidores com grupos ácidos que possam interagir por ligação de hidrogênio com Arg120, as interações entre este resíduo e Glu524 podem se quebrar, relaxando a hélice e fechando a entrada do sítio ativo, o que contribui para a manutenção da interação do substrato ou inibidor ácido com o sítio. A cerca de 13 Å de Arg120, no ápice do canal, encontra-se o resíduo catalítico Tyr385, responsável pela conversão de AA em PGG₂. Em ambas as isoformas, o canal lipofílico é circundado por Gly526, Ala527, Phe381, Leu384, Trp387, Phe513 e Ser530, bem como há uma cavidade adjacente formada por Met113, Val116, Val349, Tyr355, Leu359 e Leu531. Em COX-2, os resíduos Leu352, Tyr355, Phe518, Val523 e Ser353 formam uma cavidade lipofílica que é mais acessível nessa isoforma do que em COX-1 devido às posições 434 e 523 serem ocupadas por isoleucina em COX-1 e por valina em COX-2. Como este aminoácido é menos volumoso do que aquele, em COX-2 a cavidade lipofílica é maior devido ao resíduo da posição 523 e mais acessível devido ao resíduo da posição 434, dado que a cadeia lateral do resíduo 434 e Phe518 formam o portão de entrada desta cavidade. Anexa a ela, encontra-se uma cavidade polar circundada por His90, Gln192 e pelo resíduo da posição 513 (histidina em COX-1, Arginina em COX-2). O grupo guanidina de Arg513 em COX-2 é mais extenso que o anel imidazol de His513 em COX-1, o que favorece a interação com grupos polares de ligantes.

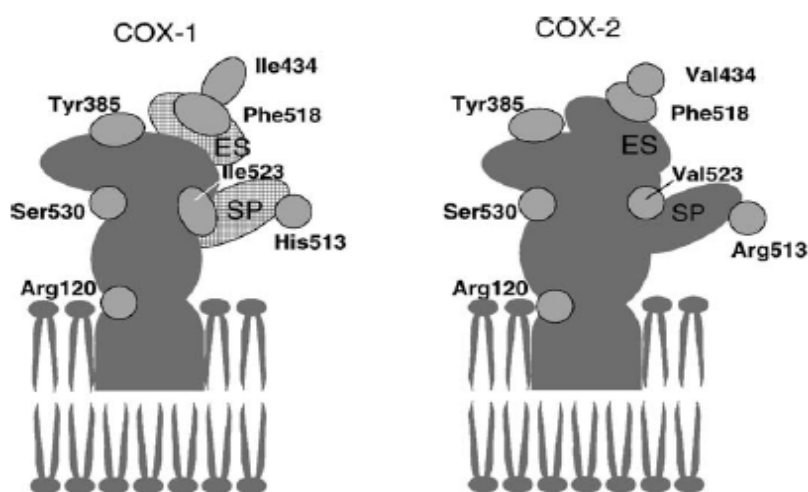


FIGURA 2: Sítios ativos de isoformas COX. SP (*side pocket*, cavidade lateral) e ES (*extra space*, espaço extra) referem-se à cavidade lipofílica acessível em COX-2 e inacessível em COX-1 conforme explicado no texto. (Adaptado de BOTTING, 2006)

III.2 – Formação de complexos receptor-ligante

A primeira teoria que surgiu para explicar a formação de complexos receptor-ligante foi a Teoria da Chave-Fechadura [FISCHER, 1894], que postulou que o ligante numa dada conformação e orientação – a “chave” – se encaixaria no sítio ativo, ou cavidade rígida, do receptor – a “fechadura” – conforme o espaço disponível para isso ocorrer e a manutenção de interações intermoleculares favoráveis levando a um complexo. Entretanto, conforme a Teoria do Encaixe Induzido [KOSHLAND, 1958], o receptor e o ligante, estando livres na conformação mais estável, são capazes de alterar suas conformações ao se associarem formando o complexo [VERLI & BARREIRO, 2004].

Dentre as interações receptor-ligante, merecem destaque aquelas que ocorrem através de ligação de hidrogênio; apesar de ocorrerem em menor número que as interações lipofílicas, frequentemente são importantes para a manutenção do complexo. Essas interações são usualmente consideradas estáveis se a distância entre o átomo de hidrogênio e o átomo aceptor for menor que 2,0 Å, mas deve ser também considerado que a interação será realmente estável se ocorrer entre o átomo de hidrogênio e o par de elétrons não-ligantes do átomo aceptor. Esse parâmetro é avaliado indiretamente através do ângulo HÂY, formado entre o átomo de hidrogênio (H), o átomo aceptor (A) e o átomo diretamente ligado por covalência (Y) ao aceptor: a interação é considerada estável se o ângulo HÂY medido for o mais próximo possível do ângulo ideal, relacionado à hibridação do átomo aceptor [LUCK, 1976]. A FIGURA 3 fornece alguns exemplos que ilustram esse conceito.

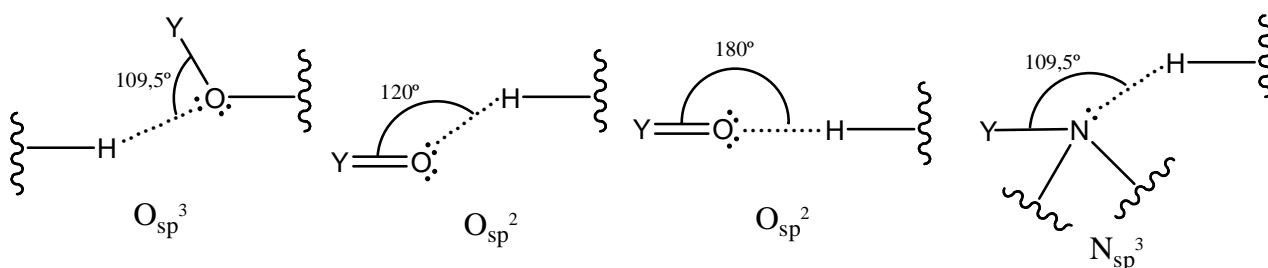


FIGURA 3: Interações por ligação de hidrogênio (em pontilhado) e seus respectivos ângulos HÂY ideais, medidos conforme a hibridação dos átomos aceptores O e N. Para o átomo O_{sp^2} , são representados dois modos de interação, com o par de elétrons e com a região de caráter negativo.

Em sistemas biológicos, com temperatura, pressão e número de partículas constantes, o processo de complexação receptor-ligante é determinado pela variação de energia livre de Gibbs (ΔG), também conhecida, neste caso, como energia livre de *binding* (ΔG_{bind}), que consiste na energia liberada por uma reação exotérmica [BROOIJMANS & KUNTZ, 2003]. Quanto menor o valor de ΔG_{bind} , mais favorável a formação do complexo, que é governada por efeitos entálpicos e

entrópicos conforme a EQUAÇÃO 1. A entalpia H descreve a energia interna total do sistema pelo somatório do conteúdo energético de ligações covalentes, ângulos de ligação, diedros e de interações intra e intermoleculares e pode ser descrita pela sua variação de energia ΔH . A entropia S, cuja variação é denotada por ΔS , mede o conteúdo energético do sistema que não pode ser transformado em trabalho, mas em calor, e assim avalia o grau de desordem desse sistema, que tende a aumentar conforme a temperatura [ADAMSOM, 1986]. No sistema composto por solvente, receptor e ligante, antes da complexação estes dois últimos estão solvatados e podem apresentar entropia translacional, rotacional, vibracional e conformacional elevadas devido à liberdade de movimento. Entretanto, ao se complexarem, têm as suas entropias diminuídas enquanto a entropia do solvente aumenta de forma mais pronunciada, o que eleva a entropia do sistema [BROOIJMANS & KUNTZ, 2003].

$$\Delta G_{bind} = \Delta H - T.\Delta S \quad (\text{EQ. 1})$$

onde ΔH é a variação de entalpia, T é a temperatura do sistema em kelvins e ΔS é a variação de entropia, sendo que ΔG_{bind} negativo denota uma complexação receptor-ligante espontânea.

No caso de complexos enzima-inibidor, o valor de ΔG_{bind} pode ser correlacionado a medidas experimentais de afinidade como concentração inibitória 50% (IC_{50} – *inhibitory concentration* 50%, concentração do inibidor necessária para inibir *in vitro* a atividade enzimática em 50%) e constante de inibição (K_i) *in vitro*, com a qual mantém uma correlação matemática conforme EQUAÇÃO 2.

$$\Delta G = R.T.\ln K_i \quad (\text{EQ. 2})$$

onde R é a constante geral dos gases ($1,987 \text{ cal.K}^{-1}.\text{mol}^{-1}$), T é a temperatura em kelvins (298,15 K, que corresponde à temperatura ambiente 25 °C) e $\ln K_i$ representa o logaritmo neperiano de K_i . É importante ressaltar que esta equação não apresenta o sinal negativo porque a constante de inibição K_i é definida para a reação de dissociação $EI \rightleftharpoons E + I$, enquanto o ΔG_{bind} refere-se ao processo inverso de ligação $E + I \rightleftharpoons EI$, onde E é a enzima e I o inibidor [COPELAND, 2005].

Diversos AINES presentes no mercado inibem as isoformas COX em concentrações semelhantes, enquanto outros inibem preferencialmente uma delas, o que é verificado experimentalmente através dos valores de K_i ou IC_{50} obtidos *in vitro*.

III.3 – Anti-inflamatórios não-esteroidais inibidores de COX

Os AINES são considerados tratamento de primeira escolha em inúmeras patologias inflamatórias agudas e crônicas como artrite reumatoide e osteoartrite e constituem uma das classes de fármacos mais prescritos e utilizados no mundo. A atividade anti-inflamatória decorre, principalmente, do bloqueio de isoformas COX, e alguns desses fármacos apresentam também atividade analgésica e antipirética [BURKE, SMYTH & FITZGERALD, 2006].

Na FIGURA 4 são dadas as estruturas químicas de alguns AINES clássicos e COX-2-seletivos. Dentre os AINES clássicos, o ácido acetilsalicílico (AAS) inibe a isoforma COX-1 seletivamente devido à acetilação irreversível do resíduo Ser530, que não ocorre em COX-2, enquanto o diclofenaco inibe ambas as isoformas em concentrações equimolares [BOTTING, 2006; MARNETT, 2002]. Todos os AINES clássicos apresentam efeitos colaterais semelhantes como depressão da função renal e lesões na mucosa gástrica em decorrência do uso crônico [MITCHELL & WARNER, 2006]. Conforme relatado na Introdução, a fim de tratar a inflamação e contornar esses efeitos colaterais, a indústria farmacêutica lançou, a partir de 1998, os inibidores COX-2 seletivos celecoxibe, rofecoxibe, valdecoxibe, etoricoxibe e lumiracoxibe. Entre estes inibidores COX-2-seletivos lançados no mercado há uma correspondência estrutural maior pois eles pertencem à classe química dos difenil-heterociclos, exceto o lumiracoxibe, pertencente à classe dos difenil-acéticos e derivado do diclofenaco. Cabe ressaltar que, apesar de os AINES COX-2-seletivos serem popularmente conhecidos como “coxibes”, esse termo não apresenta nenhum significado químico. A seletividade dos derivados difenil-heterociclos por COX-2 é explicada pela introdução do anel fenila que contém enxofre e interage com resíduos da cavidade de seletividade desta isoforma, inacessível na isoforma COX-1 [BOTTING, 2006]. A seletividade do lumiracoxibe, derivado dos difenil-acéticos, é explicada pela presença do grupo metila no anel aromático, que previne o grupo carboxilato do ligante de interagir por ligações de hidrogênio com Arg120 de COX-1, ao contrário do que ocorre com COX-2 [CORRÊA *et al.*, 2007].

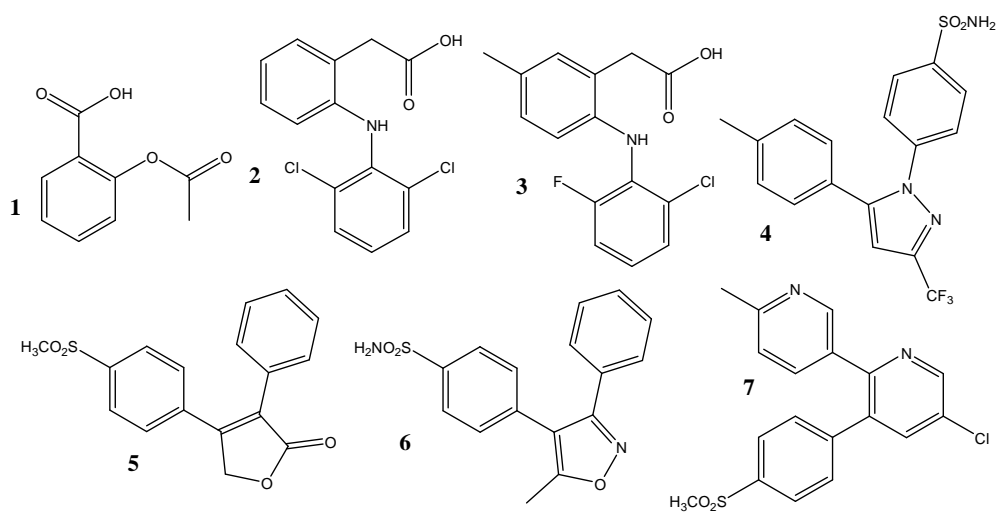


FIGURA 4: Estruturas moleculares do AAS (1), do diclofenaco (2) e dos COX-2-seletivos lumiracoxibe (3), celecoxibe (4), rofecoxibe (5), valdecoxibe (6) e etoricoxibe (7).

Em decorrência de os sítios das isoformas COX-1 e COX-2 serem muito semelhantes, estudos de cinética enzimática demonstram que todos os inibidores de COX, seletivos para uma das isoformas ou não-seletivos, interagem com ambas. Eles podem, porém, interagir através de mecanismos cinéticos equivalentes ou distintos, o que justifica o fato de serem irreversíveis ou reversíveis, seletivos ou não-seletivos. Os três mecanismos de inibição de isoformas COX são discutidos a seguir [GUPTA *et al.*, 2004; KURUMBAIL *et al.*, 1996; MARNETT, 2002]:

- 1) inibição irreversível através de ligação covalente, efetuada, por exemplo, pelo AAS através da acetilação de Ser530 em COX-1, impedindo a interação de AA com o sítio;
- 2) inibição reversível competitiva tempo-independente, efetuada por inibidores competitivos reversíveis para ambas isoformas, que competem com o substrato pelo sítio ativo, como ibuprofeno;
- 3) inibição reversível tempo-dependente, efetuada sobre ambas isoformas por inibidores não-seletivos como flurbiprofeno e indometacina, ou apenas sobre COX-2 por inibidores COX-2-seletivos, que para COX-1 são competitivos reversíveis não-dependentes do tempo, como os coxibes. A inibição tempo-dependente geralmente decorre de interações eletrostáticas e/ou mudanças conformacionais dinâmicas mais pronunciadas, como por exemplo as interações extras por ligação de hidrogênio do grupo sulfonamida dos coxibes com resíduos do bolso de seletividade de COX-2 e a ordenação da hélice D de isoformas COX decorrente da interação de inibidores ácidos com Arg120.

Os coxibes apresentam perfil farmacológico eficaz e livre de efeitos colaterais gastrointestinais comumente demonstrados para AINES clássicos, mas efeitos nos sistemas cardiovascular e renal foram relatados em decorrência do uso crônico desses fármacos conforme descrito na Introdução. A toxicidade cardiovascular dos AINES COX-2-seletivos é explicada pela diferença de concentração entre tromboxano A_2 (TXA₂) e prostaglandina I_2 (PGI₂) no organismo causada por esses fármacos. Nas plaquetas, onde se encontra COX-1, mas não COX-2, PGH₂ é convertida em tromboxano A_2 (TXA₂) pela TXA Sintase. Nas células endoteliais, onde se encontram COX-1 (constitutiva) e COX-2 (induzível), PGH₂ é convertida em prostaciclina PGI₂ pela PGI Sintase. TXA₂ e PGI₂ exercem ações antagônicas no sistema cardiovascular: enquanto esta é vasodilatadora e inibe a agregação plaquetária, aquele é vasoconstritor e ativa a agregação. Logo, a atividade de isoformas COX é um dos fatores que contribui para a homeostase cardiovascular. Inibindo-se COX-1, a síntese de TXA₂ pelas plaquetas e de PGI₂ pelas células endoteliais também será inibida, o que contribui para o equilíbrio da concentração destes metabólitos. Inibindo somente COX-2, a produção de TXA₂ pelas plaquetas continuará ativada devido à atividade de COX-1 e não será compensada pela produção de PGI₂ nas células endoteliais. Dessa forma, a taxa de TXA₂ ficará muito elevada, o que explica os efeitos vasoconstritores e de agregação plaquetária observados em pessoas que fizeram uso crônico de alguns COX-2 seletivos [GROSSER, FRIES & FITZGERALD,

2006]. Estudos clínicos sugeriram que o uso de AINES COX-2-seletivos associados ao AAS em baixa dose é muito eficaz e seguro, em termos de ação anti-inflamatória e ausência de efeitos cardiovasculares, dado que o AAS é anticoagulante [STRAND, 2007].

A investigação da atividade inibitória COX-2-seletiva e da toxicidade de novas moléculas, estruturalmente semelhantes ou não aos coxibes, continua, assim como a avaliação destas no tratamento de outras doenças como câncer e Mal de Alzheimer [BURKE, SMYTH & FITZGERALD, 2006]. Moléculas pertencentes às seguintes classes químicas de produtos naturais apresentaram atividade inibitória sobre isoformas COX: flavonoides [SELVAM & JACHAK, 2004; WU *et al.*, 2007], xantonas [ZOU *et al.*, 2005], propilbenzoatos [ATHIKOMKULCHAI *et al.*, 2006], sesquiterpenos [WUBE *et al.*, 2008], curcuminoides [SELVAM *et al.*, 2005], fenilpropanos [HUSS *et al.*, 2002) e triterpenoides [RINGBOM *et al.*, 1998; ZHANG *et al.*, 2004). Neste trabalho, avaliou-se *in silico* a inibição de isoformas COX pelos triterpenoides ácidos oleanólico e ursólico.

III.4 – Os triterpenoides ácidos oleanólico e ursólico

Os ácidos oleanólico (ácido 3-beta-hidróxi-olea-12-eno-28-óico) e ursólico (ácido 3-beta-hidróxi-ursa-12-eno-28-óico), AO e AU (FIGURA 5), são triterpenoides encontrados em altas concentrações no *ginseng* (*Panax ginseng* C.A. Mey) e no cravo-da-índia (*Caryophyllus aromaticus* L.), respectivamente, bem como em centenas de espécies de plantas que apresentam aplicações na medicina oriental como anti-inflamatória, analgésica, hepatoprotetora, cardiotônica, sedativa e tônica [LIU, 1995]. As atividades anti-HIV, antifúngica, inseticida, hepatoprotetora, anti-tumoral e anti-inflamatória de AO, AU e derivados semi-sintéticos são investigadas atualmente; a atividade anti-inflamatória decorre da inibição da transcrição gênica de isoformas COX e óxido nítrico sintase induzível, bem como da inibição direta de isoformas da COX [LIU, 2005].

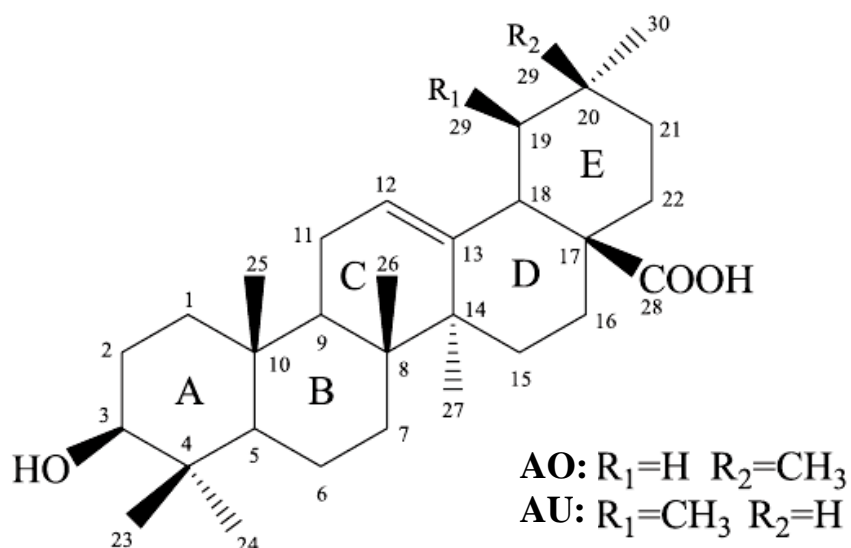


FIGURA 5: Estrutura química de AO e AU.

Os triterpenoides AO e AU mostraram atividade anti-inflamatória por inibição não seletiva *in vitro* sobre as isoformas COX-1 (respectivos IC₅₀ 380µM e 210µM) e COX-2 (respectivos IC₅₀ 295µM e 130µM) conforme RINGBOM e colaboradores (1998). Os experimentos demonstraram que AU é ligeiramente mais ativo que AO sobre ambas isoformas de COX e que ambos triterpenoides são ligeiramente mais ativos sobre COX-2 do que sobre COX-1. Os experimentos, feitos com ou sem o uso de pré-incubação de isoformas COX com AO e AU por dez minutos, indicaram que esses triterpenoides são inibidores reversíveis competitivos tempo-independentes de COX-1 e inibidores reversíveis tempo-dependentes de COX-2 [RINGBOM *et al.*, 1998].

As modificações moleculares de AO, AU e de outras moléculas naturais consomem tempo e recursos financeiros e, frequentemente, não levam ao sucesso esperado em termos de melhoria da atividade farmacológica e/ou da biodisponibilidade. Dessa forma, métodos de modelagem molecular *in silico* que permitam explicar e/ou prever a atividade farmacológica de ligantes sobre seus alvos auxiliam no processo de descoberta e desenvolvimento de um candidato a fármaco.

III.5 – Modelagem molecular aplicada ao planejamento racional de fármacos baseado no receptor

Atualmente, o planejamento racional de fármacos baseado na estrutura do receptor é a estratégia mais eficiente no desenvolvimento de novos fármacos pois fundamenta-se no bloqueio ou estimulação da atividade biológica de macromoléculas como proteínas ou ácidos nucleicos. Esse processo consome dezenas de milhões de dólares e cerca de dez a vinte anos, mas a modelagem molecular oferece um excelente direcionamento [MARSHALL, 2004]. Os métodos computacionais aplicáveis à modelagem molecular podem se basear na mecânica molecular e/ou mecânica quântica conforme descrito a seguir.

III.5.1 – Mecânica Molecular (Campos de Força)

A mecânica molecular baseia-se nas leis de Newton (mecânica molecular clássica), trata os átomos como corpos sólidos esféricos dotados de carga, raio, massa e polarizabilidade definidas e as ligações covalentes como molas, excluindo os elétrons dos cálculos. Os átomos de um sistema, ligados ou não por covalência, interagem entre si. As interações ligadas por covalência correspondem ao estiramento da ligação covalente (2 átomos), à vibração angular (3 átomos) e à torção do ângulo diedro próprio (4 átomos), que ocorre entre o 2º e 3º átomos para que o 1º e 4º átomos interajam entre si ou não; além das interações ligadas, ocorrem interações não-ligadas por covalência, que correspondem às interações apolares e polares entre átomos neutros, incluindo ligações de hidrogênio, e às interações eletrostáticas entre átomos carregados (FIGURA 6).

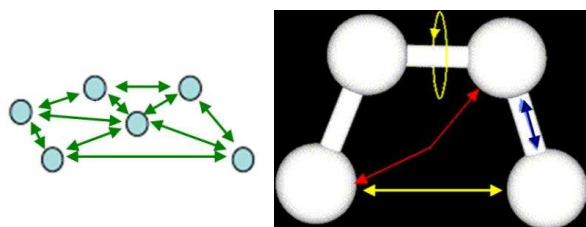


FIGURA 6: Interações entre átomos não ligados [setas verdes] e entre átomos ligados [setas azul (estiramento), vermelha (vibração angular) e amarela (torção do diedro próprio)].

As interações interatômicas determinam a energia potencial $V(x_i)$ do átomo i na posição x que este ocupa, e esta energia é calculada através de campos de força, que usualmente têm a estrutura básica apresentada na EQUAÇÃO 3.

$$V(x_i) = K_r(r - r_{eq})^2 + K_\theta(\theta - \theta_{eq})^2 + V_m[1 + \cos(n\phi - \gamma)]/2 + (A_{ij}/r_{ij}^{12} - B_{ij}/r_{ij}^6 + q_iq_j/\epsilon r_{ij}) \quad (\text{EQ. 3})$$

Na EQUAÇÃO 3, os três primeiros termos são denominados termos energéticos covalentes e referem-se ao estiramento da ligação covalente, à vibração angular e à torção do ângulo diedro próprio, respectivamente, enquanto o último termo é denominado termo energético não-covalente e refere-se às interações não-ligadas por covalência. Cada um dos termos citados é composto por parâmetros constantes ou variáveis. Os campos de força normalmente não diferem entre si quanto à estrutura de cada um dos termos, mas quanto aos valores dos parâmetros inseridos neles, usualmente obtidos através de dados experimentais e/ou cálculos de mecânica quântica; [LEACH, 2006]. Os termos e parâmetros apresentados na EQUAÇÃO 3 serão detalhados no próximo parágrafo conforme LEACH (2006).

Os dois primeiros termos representam as contribuições dos modos de estiramento e deformações angulares do sistema e descrevem o desvio em relação ao comprimento de ligação ideal (de equilíbrio) r_{eq} e ao ângulo de equilíbrio θ_{eq} , que dependem dos tipos e hibridações dos átomos e são obtidos por dados experimentais e de mecânica quântica. Como em temperaturas ordinárias os comprimentos das ligações químicas e oscilações angulares variam próximos aos seus valores de equilíbrio, obedecem a funções potenciais harmônicas. Estas funções podem ser descritas pela lei de Hooke para um sistema de massas unidas por molas, onde K_r e K_θ são as constantes de Hooke associadas ao estiramento da ligação covalente específica e ao ângulo formado entre duas ligações consecutivas, respectivamente. O terceiro termo acrescenta a contribuição das forças relacionadas aos ângulos diedros próprios e representa a energia de deformação da torção em relação a um eixo formado entre dois átomos ligados por covalência. Neste termo, V_m é a barreira de energia para a torção, n é o número de máximos ou de mínimos de energia em uma torção completa (periodicidade), ϕ é o ângulo diedro real e γ é o ângulo diedro de referência ou de fase. O

quarto termo, apresentado entre parênteses na EQUAÇÃO 3, representa a contribuição das interações entre átomos não ligados por covalência e é composto de três sub-termos: (i) o sub-termo de repulsão das nuvens eletrônicas, que evita a interpenetração de átomos i e j muito próximos conforme a distância r entre os seus núcleos; (ii) o sub-termo de atração relativo às interações de van der Waals entre os átomos; (iii) o sub-termo eletrostático de Coulomb, que pode ser atrativo ou repulsivo conforme as cargas atômicas parciais q_i e q_j terem sinais opostos ou iguais, sendo que ϵ corresponde à constante dielétrica do meio. A combinação dos dois primeiros sub-termos das interações entre átomos não ligados por covalência corresponde ao potencial de Lennard-Jones 12-6, que tem seu mínimo a uma distância interatômica igual à soma dos raios de van der Waals dos átomos i e j . Os parâmetros A (repulsão) e B (atração) dependem da natureza dos átomos envolvidos e são determinados por métodos experimentais e cálculos teóricos, podendo incluir valores específicos para interações por ligação de hidrogênio. Os valores 12 e 6 são os parâmetros de Lennard-Jones típicos usados para modelar as forças de repulsão e de atração.

Devido à possível existência de múltiplas interações não-covalentes, o cálculo dos termos energéticos não-covalentes, usualmente feito pelas funções potenciais de Lennard-Jones e Coulomb, é computacionalmente mais custoso, e por isso raios de corte (*cutoff*) são utilizados. Neste caso, somente os átomos localizados dentro de um raio pré-determinado referente ao átomo em estudo são considerados no cálculo dado que as interações tornam-se mais fracas conforme o aumento da distância interatômica (GRÁFICO 1). Para as interações medidas pelo potencial de Lennard-Jones, a desconsideração a mais de 9 \AA é razoável porque a energia corresponde a décimos de seu valor máximo. Entretanto, as interações eletrostáticas, que diminuem na proporção de $1/r$, ainda são significativas em distâncias mais longas, e a desconsideração de tais interações além do raio de corte pode levar a resultados incorretos [SCHREIBER & STEINHAUSER, 1992].

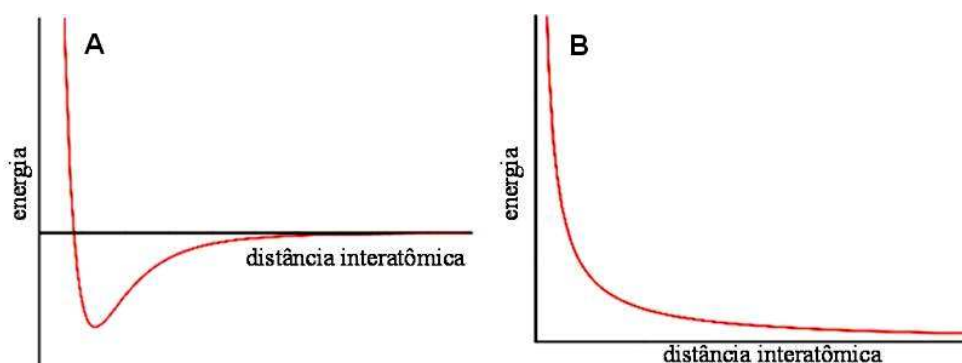


GRÁFICO 1: Variação de energia dos potenciais de Lennard-Jones (A) e Coulomb (B) conforme a distância interatômica r entre os átomos i e j . (Adaptado de van der SPOEL *et al.*, 2005)

III.5.2 – Mecânica Quântica

A mecânica quântica, ao contrário da mecânica molecular, determina propriedades eletrônicas dos sistemas por considerar o movimento dos elétrons nos seus cálculos. O referencial de toda descrição quântica de um sistema está na utilização da equação de Schrödinger, uma equação de autovalores porque quando um operador atua sobre uma função, resulta na mesma função multiplicada por uma constante [LEACH, 2001]. Na sua forma independente do tempo, é descrita como:

$$\hat{H} \Psi = E \Psi \quad (\text{EQ. 4})$$

em que a função de onda Ψ , correspondente às posições dos núcleos e elétrons, é autofunção do operador hamiltoniano \hat{H} correspondente ao autovalor E (energia do sistema). Para átomos ou moléculas, a aparente simplicidade da EQUAÇÃO 4 acima desaparece pois ela corresponde a uma abreviação de diversos termos. O termo \hat{H} corresponde ao operador hamiltoniano, que representa a energia total do sistema conforme a EQUAÇÃO 5:

$$\hat{H} = T + V_{e-e} + V_{e-n} + V_{n-n} \quad (\text{EQ. 5})$$

em que T representa a energia cinética dos elétrons e dos núcleos e os termos V_{e-e} , V_{e-n} e V_{n-n} referem-se, respectivamente, às energias potenciais de interação elétron-elétron, elétron-núcleo e núcleo-núcleo [LEACH, 2001].

A equação de Schrödinger possui solução exata para o átomo de hidrogênio e cátions hidrogenóides, mas não para átomos polieletrônicos e moléculas, necessitando de aproximações que são feitas através dos métodos *ab initio*, de Teoria do Funcional de Densidade (DFT – *Density Functional Theory*) e semi-empíricos. Apesar das aproximações, os três métodos citados são computacionalmente mais caros que os métodos de mecânica molecular e serão descritos e comparados nos próximos parágrafos conforme LEACH (2001) e ALEX (2006).

Os métodos *ab initio* são assim denominados porque, a partir do início (*from first principles*), ou seja, exclusivamente a partir de constantes físicas como a velocidade da luz, constante de Planck e massa atômica, resolvem exaustivamente todas as equações de Hartree-Fock sem desprezar quaisquer termos ou integrais do operador \hat{H} ; assim, são às vezes chamados de métodos Hartree-Fock (HF). A resolução das equações para orbitais atômicos e moleculares é diferenciada; para o primeiro caso, baseiam-se em equações aplicáveis ao hidrogênio mas, para o segundo caso, são empregadas funções orbitais de Slater (STO – *Slater type orbitals*) [SLATER, 1930].

A realização dos cálculos requer, ainda, a utilização das funções de base (*basis functions*), compostas por funções atômicas que representam cada um dos orbitais atômicos; neste caso, não são utilizadas funções de base Slater, mas funções de base Gaussian devido à facilidade de implementação. As funções de base STO- n G (*Slater Type Orbital – n Gaussian*) são bases mínimas, em que apenas n funções Gaussian são usadas para representar cada um dos n orbitais envolvidos, mas apresentam alguns problemas que podem ser minimizados ou resolvidos pela utilização de *double zeta basis functions*, que utilizam $2n$ funções Gaussian para cada n orbitais, o que torna muito custoso o procedimento computacional. Assim, foram desenvolvidas as funções de base *split valence double zeta basis functions*, que podem utilizar números variados de funções Gaussian para os orbitais de valência relacionados à ligação química em questão, para aqueles não relacionados a ela e, por fim, para os orbitais internos. Como exemplo, pode-se citar a função de base 6-31G, utilizada neste trabalho, que utiliza uma função atômica Gaussian para cada um dos seis orbitais internos, 3 funções para cada um dos orbitais de valência mais importantes da sétima camada e apenas uma função para cada um dos orbitais de valência da sétima camada menos importantes para a ligação química.

Os métodos de DFT fundamentam-se no paradigma de que o estado de densidade eletrônica, que descreve a distribuição de carga em uma molécula, e o Hamiltoniano eletrônico têm uma relação funcional, ainda desconhecida; dessa forma, resolvem as equações com menor custo computacional que os métodos *ab initio* porque não utilizam a função de onda como esses métodos, mas apenas três coordenadas da molécula, independentemente do seu tamanho.

Os métodos semi-empíricos consideram somente os elétrons de valência e baseiam-se no formalismo de Hartree-Fock utilizando aproximações e parâmetros derivados de dados experimentais e/ou da mecânica quântica, menos intuitivos que aqueles da mecânica molecular e não utilizáveis nos dois métodos anteriores. Dentre os métodos semi-empíricos, o *Austin Model 1* (AM1) [DEWAR *et al.*, 1985] é muito utilizado atualmente pela rapidez do cálculo e pela qualidade da parametrização dos átomos mais comuns em compostos orgânicos, embora apresente, como outros métodos mecânico-quânticos semi-empíricos, problemas na parametrização das geometrias de ligação de hidrogênio, das hibridações de átomos de nitrogênio de ligações amida e das hibridações de anéis aromáticos heterocíclicos [SHAFFER & WIERSCHKE, 1993].

Sob o aspecto de não utilizar parâmetros empíricos, a DFT pode ser considerada como uma teoria de natureza *ab initio* de menor custo computacional. Devido aos custos computacionais, os métodos *ab initio* e de DFT são apropriados para sistemas que contém dezenas de átomos, enquanto os métodos semi-empíricos são apropriados para sistemas que contém centenas de átomos.

III.6 – Métodos computacionais para previsão de interações proteína-ligante

A aplicação de métodos computacionais para estudar a formação e estabilidade de complexos ligante-receptor é alvo de intensas pesquisas por parte da indústria farmacêutica, que investe cerca de 10% do faturamento no desenvolvimento de algoritmos de simulação que sejam capazes de testar milhares de ligantes sobre a estrutura do alvo em curto intervalo de tempo e com um custo reduzido. Denomina-se *docking* (ancoramento) molecular o método que busca prever geométrica e energeticamente o encaixe do ligante no sítio ativo do receptor através de algoritmos de simulação [KITCHEN *et al.*, 2004].

Conforme GANI (2007), a partir da década de 80, foram desenvolvidos algoritmos de *docking* rígido que tratavam ligante e receptor como corpos rígidos, em que somente os seis graus de liberdade rotacionais e translacionais eram explorados. Em seguida, foram desenvolvidos algoritmos de *docking* flexível que consideravam o ligante flexível (exploração dos graus de liberdade conformacionais além daqueles já mencionados) e o receptor rígido conforme a Teoria da Chave-Fechadura. Posteriormente, foram desenvolvidos algoritmos que, além de tratar o ligante flexível, tratavam o receptor parcial ou totalmente flexível, conforme a Teoria do Encaixe Induzido. Os algoritmos de simulação aplicáveis ao *docking* devem ser capazes de investigar uma complexa superfície para prever a orientação e conformação do ligante no sítio ativo do receptor e para isso utilizam uma função de busca estratégica. Para *docking* flexível, as funções de busca estratégica são classificadas em sistemática, determinística ou estocástica, descritas no parágrafo seguinte conforme GANI (2007) e KITCHEN e colaboradores (2004).

As funções de busca sistemática exploram combinatoriamente todos os graus de liberdade do ligante durante a busca. Como exemplo, pode-se citar os algoritmos de construção incremental baseados em fragmentos, que dividem os ligantes em pequenos fragmentos e fazem a reconstrução incremental deles no sítio do receptor avaliando combinatoriamente os graus de liberdade. As funções de busca determinística baseiam-se nas leis do movimento newtonianas para, dado um estado inicial de entrada, calcular posições e velocidades de átomos conforme a variação do tempo. Produzem determinado estado de saída conforme o estado inicial de entrada e as condições de simulação como temperatura, pressão e tempo decorrido. Assim, a utilização das mesmas condições iniciais e dos mesmos parâmetros gera o mesmo estado final. Essas funções são utilizadas pelos métodos clássicos de minimização de energia e de dinâmica molecular. Nas funções de busca estocástica ou randômica a busca é regida por movimentos aleatórios dos graus de liberdade do estado inicial, geralmente mudando um grau de liberdade por vez. Assim, essas funções podem resultar em diferentes saídas para o mesmo estado inicial de entrada que serão aceitas conforme critérios pré-estabelecidos e, por isso, as funções de busca estocástica não possuem garantia de convergência, requerendo múltiplas execuções independentes entre si.

Os algoritmos de *docking* seriam considerados ineficazes se não tivessem a capacidade de estimar a afinidade da interação entre o receptor e as conformações e orientações do ligante propostas. Dessa forma, além de apresentarem a função de busca estratégica, apresentam também a função de pontuação (*scoring*), responsável por prever o ΔG_{bind} dos complexos propostos pela função de busca estratégica. As funções de pontuação utilizadas pelos programas de *docking* dividem-se em três tipos: funções derivadas dos campos de força, empíricas e baseadas em conhecimento, descritas no próximo parágrafo conforme GANI (2007) e KITCHEN e colaboradores (2004).

As funções baseadas em campos de força utilizam potenciais derivados dos campos de força da mecânica molecular (EQUAÇÃO 3) relacionados à entalpia e ainda incluem termos entrópicos relacionados à mobilidade conformacional e dessolvatação. Apresentam como desvantagem a inclusão de *cutoff* para avaliação das interações, que frequentemente são padronizadas de forma arbitrária, especialmente no caso de interações eletrostáticas. As funções empíricas fundamentam-se no somatório de termos entálpicos e entrópicos semelhantes àqueles citados para as funções baseadas em campos de força. Entretanto, esses termos são ajustados por coeficientes obtidos através da regressão de valores de energias determinadas experimentalmente para vários complexos ligante-receptor. Assim, a qualidade das funções empíricas está intimamente relacionada ao conjunto de complexos utilizados durante o ajuste dos coeficientes. As funções baseadas em conhecimento foram planejadas para reproduzir ΔG_{bind} como um potencial de forças calculadas a partir da frequência de contatos interatômicos de um conjunto de estruturas. Conforme a frequência e as distâncias interatômicas das interações ligante-receptor presentes no complexo avaliado correspondam às medidas verificadas experimentalmente em complexos conhecidos, tais interações são pontuadas gerando o valor de ΔG_{bind} . Logo, assim como as funções empíricas, é um método de cálculo fácil, porém a sua eficiência é dependente do conjunto de complexos utilizados no ajuste.

A eficácia das funções de busca estratégica e pontuação é avaliada por *dockings* de validação, ou *redocking*, em que o ligante de um complexo ligante-receptor é retirado da estrutura cristalográfica obtida experimentalmente e ambos são submetidos ao *docking*. A eficácia da função de busca é avaliada pelo RMSD do ligante obtido do *docking* quando comparado ao ligante cristalográfico da estrutura utilizada, sendo consensual que um RMSD menor que 2 Å é necessário para a validação da metodologia utilizada [PLEWCZNSKI *et al.*, 2010]. Isso ocorre porque a maioria das estruturas cristalográficas têm resolução de 2 Å, e assim torna-se desnecessário exigir que o *docking* tenha uma exatidão maior que a resolução da estrutura cristalográfica; dessa forma, pode-se utilizar o valor da resolução da estrutura cristalográfica como o valor máximo de RMSD tolerável para o *docking* [ONODERA, SATOU & HIROTA, 2007]. A eficácia da função de pontuação é avaliada em termos da comparação dos valores de ΔG_{bind} previsto e calculado a partir

de dados experimentais, bem como através da correlação de dois ou mais valores teóricos com dados experimentais de afinidade dos complexos como K_i e IC_{50} . As funções de pontuação atualmente disponíveis constituem o grande problema do *docking* pois não são capazes de fornecer dados teóricos que se correlacionem aos experimentais devido às suas limitações; estas não estão relacionadas somente à falta de flexibilidade da proteína e ao tratamento inadequado da solvatação, que podem ser contornados com a utilização da dinâmica molecular, mas principalmente à natureza simplista das funções de energia empregadas [GANI, 2007; KITCHEN *et al.*, 2004; TERAMOTO & FUKUNISHI, 2007].

Diversos estudos já foram publicados a respeito da avaliação comparativa de funções de busca e/ou de pontuação aplicáveis a programas de *docking*, e o mais recente e amplo dentre estes foi publicado por PLEWCZNSKI e colaboradores em 2010, que avaliaram sete programas de *docking* (Surflex, LigandFit, Glide, GOLD, FlexX, eHiTS e AutoDock) sobre 1300 complexos e concluíram que os programas que utilizam algoritmo genético na busca, GOLD [JONES *et al.*, 1997] e AutoDock [MORRIS *et al.*, 1998], foram mais hábeis que os outros a posicionar o ligante no sítio, mas as funções pontuação de todos os programas mostraram desempenho ruim.

Os estudos de complexos de isoformas COX com triterpenoides AO e AU, objetos desse trabalho, consistiram de *docking* flexível com AutoDock 4.0 [MORRIS *et al.*, 2009], que utiliza algoritmo genético Lamarckiano e função de pontuação empírica, e de dinâmica molecular com GROMACS 4 [HESS *et al.*, 2008], utilizando campo de força do pacote GROMOS96. Esses métodos e programas serão discutidos nas seções seguintes.

III.7 – AutoDock 4.0

O AutoDock 4.0 foi desenvolvido para a previsão das interações de ligantes flexíveis com receptores macromoleculares rígidos ou parcialmente flexíveis. Neste trabalho, foi utilizado o algoritmo genético Lamarckiano (LGA – *Lamarckian genetic algorithm*) [MASHHADI, SHANECHI & LUCAS, 2003] inserido no programa. Ele combina uma busca global eficiente a partir de locais distantes do mínimo – feita pelo algoritmo genético, que é falho para busca local próxima ao mínimo – com um método de busca local por minimização de energia. Assim, utiliza método de busca estocástica associado a um método de minimização determinístico [GEN & CHENG, 1999; THOMSEN, 2003]. A seguir, será detalhado o funcionamento do LGA conforme trabalhos publicados por MORRIS e colaboradores em 1998 e 2009, bem como por THORMANN e PONS em 2001.

O LGA inicia a busca pela criação aleatória de uma população inicial com um número de indivíduos definido pelo usuário, sendo que cada indivíduo representa um cromossomo (possível

solução para o *docking*, ou seja, orientação e conformação do ligante no alvo). Cada cromossomo é composto de genes (valores das variáveis ou dos conjuntos de variáveis, que correspondem aos graus de liberdade rotacional, translacional e conformacional). A criação da população inicial é seguida de ciclos sucessivos de gerações até que o número máximo de gerações ou o número máximo de avaliações de energia seja alcançado. Cada geração consiste de mapeamento, avaliação, seleção, cruzamento, mutação, mapeamento, avaliação, minimização e seleção. O mapeamento transforma o genótipo de cada indivíduo no fenótipo correspondente, que permite a avaliação prévia do ΔG_{bind} . Aqueles cromossomos cujos fenótipos apresentam menor ΔG_{bind} são selecionados para cruzamento e mutação gênica, que são feitos aleatoriamente entre os membros da população gerando novos indivíduos que substituem os originais, mantendo o número da população constante. Os indivíduos são novamente mapeados gerando os fenótipos que terão ΔG_{bind} calculado e aqueles mais estáveis são submetidos à minimização de energia local gerando outros fenótipos ainda mais estáveis, cujos indivíduos substituem os anteriores mantendo o número da população constante. Para a geração posterior, são selecionados aqueles indivíduos referentes a fenótipos mais estáveis. Conforme determinado pelo usuário, corridas múltiplas, compostas por milhares de gerações, são realizadas pelo LGA e cada uma delas fornece uma solução final (complexo ligante-receptor). Em seguida, o programa ordena as soluções conforme o ΔG_{bind} e agrupa-as em *clusters* (conjuntos) conforme o RMSD.

Conforme HUEY e colaboradores (2007), a função de pontuação empírica do AutoDock 4.0, calibrada para átomos unidos (considera somente átomos pesados e hidrogênios polares) calcula o ΔG_{bind} do complexo formado entre receptor rígido ou parcialmente flexível e ligante flexível conforme EQUAÇÃO 6, utilizando-se de seis termos V relacionados às avaliações pares (baseadas no ligante e no receptor) e um termo ΔS_{conf} relacionado à entropia conformacional.

$$\Delta G_{bind} = (V_{comp}^{L-L} - V_{ncomp}^{L-L}) + (V_{comp}^{R-R} - V_{ncomp}^{R-R}) + (V_{comp}^{R-L} - V_{ncomp}^{R-L}) + \Delta S_{conf} \quad (\text{EQ. 6})$$

onde L refere-se ao ligante, R ao receptor, “comp” ao estado complexado e “ncomp” ao estado não complexado. Os termos V do primeiro e segundo grupos referem-se, respectivamente, às diferenças de energias intramoleculares do ligante e do receptor, enquanto os termos V do terceiro grupo referem-se à mudança na energia intermolecular entre os estados complexado e não complexado. As energias intramoleculares são calculadas para todos os pares de átomos, excluindo interações entre átomos ligados por covalência (estiramento, ângulo e diedro). Assume-se que ligante e receptor estão suficientemente distantes um do outro no estado não complexado para se considerar V_{ncomp}^{R-L} igual a zero e, no caso de *docking* com receptor rígido, os termos do segundo conjunto se anulam

pois os estados não complexado e complexado do receptor são idênticos. Assim, para estudos de *docking* com receptor rígido a EQUAÇÃO 6 simplifica-se à EQUAÇÃO 7:

$$\Delta G_{bind} = (V_{comp}^{L-L} - V_{ncomp}^{L-L}) + V_{comp}^{R-L} + \Delta S_{conf} \quad (\text{EQ. 7})$$

em que o último termo refere-se à diminuição da entropia torcional, diretamente proporcional ao número de ligações torcionáveis N_{tor} do ligante (EQUAÇÃO 8), incluindo ligações com átomos de hidrogênios polares.

$$\Delta S_{conf} = W_{conf} \cdot N_{tor} \quad (\text{EQ. 8})$$

onde W_{conf} corresponde à constante empírica de mudanças conformacionais. Cada um dos termos V das EQUAÇÕES 6 e 7 apresentam a seguinte estrutura (EQUAÇÃO 9):

$$\begin{aligned} V = & W_{vdw} \sum_{ij} \left(\frac{A_{ij}}{r_{ij}^{12}} - \frac{B_{ij}}{r_{ij}^6} \right) + W_{lig.Hidr} \sum_{ij} E(t) \left(\frac{C_{ij}}{r_{ij}^{12}} - \frac{D_{ij}}{r_{ij}^{10}} \right) \\ & + W_{eletr} \sum_{ij} \frac{q_i q_j}{\varepsilon(r_{ij}) r_{ij}} + W_{diss} \sum_{ij} (S_i V_j + S_j V_i) e^{(-r_{ij}^2/2\sigma^2)} \end{aligned} \quad (\text{EQ. 9})$$

em que as constantes empíricas W foram otimizadas para calibrar os termos com base em 188 complexos experimentais de ΔG_{bind} determinado e os termos representados por “vdw”, “lig.Hidr”, “eletr” e “diss” referem-se às interações de van der Waals, ligações de hidrogênio, eletrostáticas e à dessolvatação, respectivamente.

Na EQUAÇÃO 9, os três primeiros termos correspondem às interações não-ligadas dos campos de força da mecânica molecular: o primeiro termo modela as interações de van der Waals e utiliza o potencial padrão de Lennard-Jonnes 12-6 e os parâmetros energéticos A e B obtidos do campo de força AMBER (*Assisted Model Building with Energy Refinement*) [WEINER *et al.*, 1984]; o segundo termo modela as interações por ligação de hidrogênio utilizando o potencial de Lennard-Jonnes 12-10, os parâmetros energéticos C e D obtidos do campo de força AMBER, referentes às distâncias H...A (hidrogênio-aceptor), e o coeficiente $E(t)$ referente à direcionalidade da ligação de hidrogênio conforme ângulo t formado entre o átomo-teste, o hidrogênio e o átomo alvo (doador) na proteína; o terceiro termo corresponde ao potencial de Coulomb para as interações eletrostáticas considerando as cargas atômicas q ; o quarto termo modela o potencial de

dessolvatação utilizando o volume atômico V , o parâmetro de solvatação atômica S e uma constante σ equivalente a 3,5 Å [HUEY *et al.*, 2007].

Todos os termos V e o termo de dessolvatação são avaliados utilizando potenciais de afinidade molecular do receptor determinados previamente pelo módulo AutoGrid 4.0 [MORRIS *et al.*, 2009]. Com esse programa auxiliar, o receptor é envolvido numa malha tridimensional (*grid*) centrada no sítio ativo. As partículas-teste, ou seja, os átomos-teste inseridos nos ligantes (usualmente C, N, O, H, F, Cl, Br, I e S) e uma partícula de carga e ($1,60219 \cdot 10^{-19}$ C), percorrem todos os pontos do *grid*, usualmente distantes 0,375 Å entre si, registrando as energias de interação com todos os átomos do receptor localizados a menos de 8 Å de distância e gerando os mapas de potencial de afinidade interatômica. Esses mapas representam uma tabela de consulta para a avaliação das energias de interação que ocorrerá durante o *docking*, quando, para cada átomo do ligante posicionado no sítio, serão calculadas todas as energias. Logo, os cálculos executados durante o *docking* são proporcionais ao número de átomos do ligante e não do receptor, o que torna o processo computacionalmente menos custoso [KITCHEN *et al.*, 2004; MORRIS *et al.*, 1998].

A adequada previsão das interações está relacionada à qualidade das cargas atômicas atribuídas ao ligante e ao receptor, que no AutoDock 4.0 são do tipo Gasteiger [GASTEIGER & MARSILI, 1980]. Essas cargas foram parametrizadas para moléculas e íons com ligações covalentes σ e sistemas π não-conjugados considerando a eletronegatividade e o potencial de ionização dos orbitais, que estão intimamente relacionados aos orbitais vizinhos. Dessa forma, o cálculo das cargas Gasteiger é simples e rápido, quando comparado ao cálculo por mecânica quântica, porque depende apenas dos tipos dos átomos e das ligações entre eles.

III.8 – Dinâmica Molecular

A Dinâmica Molecular (DM) é uma metodologia de simulação aplicável ao estudo do *docking* receptor-ligante e de ambos isolados e, devido às suas características peculiares quando comparada a outras metodologias de *docking*, como a flexibilidade de ligante e receptor, utilização de solvatação explícita e avaliação da estabilidade do complexo ao longo do tempo, deve ser tratada à parte [KARPLUS & PETSKO, 1990].

Os métodos de DM utilizam função de busca determinística e fundamentos da mecânica molecular clássica para descrever o comportamento dinâmico do sistema ao longo do tempo; logo, descrevem as posições dos átomos em função do tempo, que tendem a se ajustar no sistema para diminuir a energia potencial [LEACH, 2006]. Conforme já mencionado, o cálculo da energia potencial em função da posição atômica é feito por campos de força. Assim, a simulação por DM requer a escolha de um campo de força adequado para calcular a energia potencial $V(x_i)$ de cada

átomo i na posição x em que este se encontra [van GUNSTEREN & BERENDSEN, 1990]. Dentre os campos de força aplicáveis à DM de complexos proteína-ligante em meio aquoso (parametrizados para resíduos de aminoácidos em meio solvatado) e de átomos unidos (apresentam menor custo computacional pelo fato de desconsiderar átomos de hidrogênio apolares) encontra-se disponível para uso gratuito no GROMACS 4 o pacote GROMOS96.

III.8.1 – Campo de força GROMOS96

O pacote GROMOS96 inclui a versão original 43A1 [DAURA, MARK & van GUNSTEREN, 1998] e as versões subsequentes como 45A3 [SCHULER, DAURA & van GUNSTEREN, 2001], utilizada nesse trabalho. Apesar de utilizar parâmetros diferenciados da versão inicial 43A1, especialmente para átomos de carbono alifáticos, a versão 45A3 apresenta a mesma estrutura de equação que a versão 43A1 para o cálculo de $V(x_i)$. Os termos não-covalentes (interações de van der Waals, incluindo interações por ligação de hidrogênio, e eletrostáticas) de ambas as versões são iguais aqueles da EQUAÇÃO 3 e estão representados na EQUAÇÃO 10 por TNC, mas os termos energéticos covalentes são diferentes e estão descritos nesta Equação conforme DAURA, MARK & van GUNSTEREN (1998).

$$V(x_i) = K_r(r^2 - r_{eq}^2)^2/4 + K_\theta(\cos\theta - \cos\theta_{eq})^2/2 + K_\phi[1 + \cos(n\phi - \gamma)] + K_\xi(\xi - \xi_{eq})^2/2 + TNC \quad (\text{EQ. 10})$$

Conforme EQUAÇÃO 10, o primeiro termo (potencial do estiramento de ligação covalente) difere daquele mencionado na EQUAÇÃO 3 por ser um potencial quártico (1/4) ao invés de harmônico (1/2), o que é uma desvantagem pois a média da energia de um único estiramento reduz-se à metade de um potencial harmônico normal; entretanto, dado que nenhuma raiz quadrada de r deverá ser calculada previamente, o cálculo terá um custo computacional menor. O segundo termo (vibração angular) da EQUAÇÃO 10 difere, quanto ao campo de força clássico (EQUAÇÃO 3), pela utilização dos cossenos dos ângulos real e de equilíbrio.

O termo do diedro pode ser calculado para diedro próprio, representado na FIGURA 6, ou para diedro impróprio, utilizado para manter grupos no plano, como ocorre em anéis aromáticos, e para prevenir que as moléculas deformem-se em suas imagens espectrais. Diferentemente de outros campos de força da mecânica molecular aplicáveis à DM, GROMOS96 aplica o cosseno de ângulo diedro próprio somente sobre dois átomos centrais no caso de a molécula ter mais de uma possibilidade; isso ocorre, por exemplo, no 2-Metilbutano, em que o diedro próprio será calculado para a rotação da ligação entre C-2 e C-3, uma interação 1-4 de grupos metila será considerada diedro enquanto a outra será considerada interação 1-4 não-ligada. No termo de diedro próprio

(terceiro termo da EQUAÇÃO 10), K_ϕ é a constante que define a barreira rotacional, n é o número de mínimos para a rotação de uma ligação química específica, ϕ é o ângulo diedral para a ligação central e δ é a defasagem no ângulo diedral; nota-se, em comparação com o termo do diedro clássico (EQUAÇÃO 3), que o GROMOS96 não aplica um potencial harmônico (divisão do valor à metade). No termo de diedro impróprio (quarto termo da EQUAÇÃO 10), K_ξ é a constante a ser ajustada para descrever a vibração diedral imprópria específica que tem ξ_{eq} como ângulo de equilíbrio.

III.8.2 – Equações do movimento aplicáveis à DM

Conforme descrito por van GUNSTEREN & BERENDSEN (1990), NAMBA, SILVA e SILVA (2008) e LEACH (2006), a derivada da energia potencial $V(x_i)$ em relação à posição x_i calculada pelo campo de força fornece a força $F_i(t)$ atuante sobre o átomo i no instante t conforme EQUAÇÃO 11:

$$F_i(t) = - \partial V(x_i) / \partial x_i \quad (\text{EQ. 11})$$

Dessa forma, pode ser calculada a aceleração a do átomo i no instante t (EQUAÇÃO 12)

$$F_i(t) = m_i a_i \quad (\text{EQ. 12})$$

em que m_i equivale à massa do átomo i . Integrando a EQUAÇÃO 13, é obtida a velocidade do átomo i no instante t :

$$a_i = v_i(t)/t \quad (\text{EQ. 13})$$

Integrando a EQUAÇÃO 14, é obtida a nova posição x do átomo i no tempo $t+\Delta t$:

$$v_i(t) = x_i(t)/t \quad (\text{EQ. 14})$$

O campo de força, então, recalcula a energia potencial $V(x_i)$ do átomo i na nova posição x ocupada por ele, reiniciando o ciclo. A simulação por DM consiste na resolução dessas equações passo a passo, de forma a calcular as velocidades e posições de todos os átomos em função do tempo, gerando a trajetória [van GUNSTEREN & BERENDSEN, 1990].

III.8.3 – Parâmetros aplicáveis à simulação por DM

Como sistemas biológicos são formados por centenas ou milhares de átomos, a resolução das equações, particularmente a integração, não pode ser feita continuamente devido ao alto custo computacional, mas em passos de integração separados por Δt , que deve ser menor que o tempo gasto nos movimentos mais rápidos que possam ocorrer na estrutura, ou seja, os movimentos vibracionais das ligações covalentes com átomos de hidrogênio, a fim de que estes movimentos sejam considerados [van GUNSTEREN & BERENDSEN, 1977]. Se essas ligações covalentes forem mantidas livres para vibrar durante a DM, deve ser usado Δt de 1 fs; se forem mantidas fixas, o que é feito com algoritmos de restrições (*constrains*) moleculares como SHAKE [RYCKAERT, CICCOTTI & BERENDSEN, 1977] e LINCS (*Linear Constraint Solver*) [HESS *et al.*, 1997], pode ser usado Δt de 2 fs, o que diminuirá à metade o tempo do cálculo [NAMBA, SILVA & SILVA, 2008]. No caso de trajetórias longas e/ou de estruturas macromoleculares, as restrições não afetam a trajetória devido aos movimentos de alta frequência se tornarem irrelevantes [ELBER, GHOSH & CÁRDENAS, 2002].

No algoritmo SHAKE, um conjunto de distâncias e ângulos de referência é empregado para alterar um conjunto de coordenadas existentes gerando um novo conjunto, que deve satisfazer os valores presentes na lista de referência; dado um valor de tolerância, o algoritmo SHAKE corrige as coordenadas atômicas relacionadas às ligações constrangidas até que seja satisfeito o critério de tolerância, para então permitir que a simulação avance para o próximo passo [RYCKAERT, CICCOTTI & BERENDSEN, 1977]. O algoritmo LINCS retorna as ligações aos seus comprimentos corretos após cada passo sem a aplicação de restrições moleculares, o que o torna mais estável e rápido que o algoritmo SHAKE [HESS *et al.*, 1997].

As integrações das equações nos intervalos Δt para o cálculo das novas posições atômicas $r(t)$ são feitas por algoritmos de integração como o de Verlet [VERLET, 1967] ou a variação dele conhecida como *Leap-frog* (meio-passo) [HOCKNEY, 1970]. O algoritmo de Verlet não utiliza a velocidade no cálculo, o que representa um problema para o cálculo da temperatura e energia cinética do sistema, que pode ser solucionado pela utilização do algoritmo *Leap-Frog*, em que as velocidades são atualizadas em tempos intermediários àqueles da atualização das posições e a atualização das posições depende das velocidades [LEACH, 2006]. A utilização das velocidades para o cálculo das novas posições atômicas permite o acoplamento do sistema a um banho térmico pela correção das velocidades, o que é importante para a simulação de sistemas biológicos [NAMBA, SILVA & SILVA, 2008]. Como a energia potencial é uma função das posições, e a variação destas posições depende das velocidades, o controle das velocidades representa, além do

controle da energia cinética, o controle da energia potencial; consequentemente, o controle da energia total do sistema [van der SPOEL *et al.*, 2005; NAMBA, SILVA & SILVA, 2008].

Durante a simulação, considera-se que não há forças externas atuando sobre o sistema, o que permite controlar a manutenção e a variação, conforme a necessidade do usuário, dos seguintes parâmetros: número de átomos (N), volume (V), energia total (E), energia entálpica (H), pressão (P) e temperatura (T) [NAMBA, SILVA & SILVA, 2008]. O conjunto de configurações e propriedades mantidas constantes durante a DM é denominado *ensemble* (associação). São utilizados quatro tipos de *ensembles*, em que as letras das siglas referem-se aos parâmetros mantidos constantes: microcanônico (NVE), canônico (NVT), isobárico-isoentálpico (NPH) e isobárico-isotérmico (NPT), sendo este último usualmente aplicado a sistemas biológicos, o que requer o controle de temperatura e pressão do sistema por termostatos e barostatos, respectivamente [NAMBA, SILVA & SILVA, 2008; LEACH, 2006].

A temperatura T está relacionada com a diferença de velocidades atômicas e o método mais comum para o seu controle é o acoplamento do sistema a um banho externo com temperatura T_0 fixa; nesse procedimento as velocidades das partículas são corrigidas a cada passo da simulação a fim de ajustar a energia cinética do sistema à temperatura selecionada [van GUNSTEREN & BERENDSEN, 1990]. De forma semelhante ao acoplamento de temperatura, o sistema também pode ser acoplado a um banho de pressão por um barostato, em que as variáveis T são substituídas por P e as velocidades atômicas são substituídas pelas posições [van GUNSTEREN & BERENDSEN, 1990]. O termostato e o barostato de Berendsen [BERENDSEN *et al.*, 1984] são os mais utilizados [NAMBA, SILVA & SILVA, 2008].

Independentemente do *ensemble* utilizado, todas as simulações de DM utilizam número finito de átomos, e aqueles da superfície podem escapar causando efeitos de superfície indesejáveis dado que os sistemas tendem a se deformar para minimizar a área superficial. A forma mais adequada de resolver esse problema é utilizar condições periódicas de contorno, em que os átomos são colocados em uma caixa e esta é replicada em todas as direções do espaço, logo os efeitos de superfície exercidos sobre os átomos serão eliminados [van GUNSTEREN & BERENDSEN, 1990; LEACH, 2006]. Assim, quando um átomo move-se na caixa original, suas imagens periódicas movem-se da mesma maneira nas caixas-imagem; se um átomo sai da caixa original, sua imagem periódica entra pela face oposta da caixa imagem com a mesma velocidade. No tratamento das interações de curto alcance como van der Waals, adota-se a convenção da imagem mínima para evitar que um átomo *i* da caixa central, que deve interagir somente com o átomo *j*, interaja com a sua própria imagem e/ou com átomo *j* e a imagem periódica deste átomo; este método é computacionalmente mais caro, mas tem sido normalmente empregado devido à representação mais real dos sistemas [LEACH, 2006].

O meio em que os sistemas biológicos são solvatados têm grande influência em sua estrutura, dinâmica e termodinâmica. Na simulação por DM de complexos receptor-ligante, uma representação explícita do solvente ao redor e nas cavidades do complexo é muito importante para a reprodução das forças que atuam nos sistemas biológicos, apesar de elevar o custo computacional da simulação [LEACH, 2006]. Diversos potenciais foram desenvolvidos para representar as moléculas de água explicitamente, como o modelo *Simple Point Charge* (SPC) [BERENDSEN, GRIGERA & STRAATSMA, 1987], que é o mais adequado para ser utilizado com o pacote GROMOS96 [van der SPOEL *et al.*, 2005].

III.8.4 – Etapas da simulação por DM

As simulações por DM podem ser divididas em cinco etapas a partir do momento em que se tem as estruturas tridimensionais e as topologias dos sistemas de interesse: etapa inicial, minimização, termalização, equilíbrio e produção [KARPLUS & PETSKO, 1990].

Na etapa inicial é criada a caixa de solvatação contendo receptor e/ou ligante, solvente e íons caso sejam necessários para neutralizar as cargas do sistema.

Na etapa de minimização de energia o sistema é relaxado para corrigir possíveis distorções nas ligações, ângulos e interações, diminuindo consideravelmente as forças F_i atuantes sobre os átomos i até próximo de zero e, conseqüentemente, a energia potencial do sistema [LEACH, 2006]. O procedimento consiste em percorrer a superfície do potencial na direção em que a energia decresce de forma a levar o sistema ao mínimo de energia local próximo ou até mesmo global. Os algoritmos de minimização mais utilizados em DM são *Steepest Descent* e dos gradientes conjugados [NAMBA, SILVA & SILVA, 2008; LEACH, 2006]. O primeiro deles utiliza a derivada primeira para determinar a direção do mínimo a partir de uma estrutura de alta energia potencial, enquanto o segundo algoritmo utiliza as informações obtidas pela derivada primeira para determinar a direção ótima de busca, ou seja, fazer o sistema chegar mais próximo ao mínimo global. Logo, o método do gradiente conjugado deve ser utilizado após a minimização por *Steepest Descent* [LEACH, 2006].

Após a minimização, há força F_i insignificante atuando sobre os átomos do sistema minimizado, logo eles não têm aceleração significativa conforme EQUAÇÃO 12 e, conseqüentemente, não adquirem velocidade conforme EQUAÇÃO 13 e, portanto, não ocupam nova posição no sistema conforme EQUAÇÃO 14. Assim, no início da etapa de termalização as velocidades iniciais são atribuídas aleatoriamente aos átomos conforme a distribuição de Maxwell-Boltzmann, que gera a probabilidade de um átomo i de massa m_i ter a velocidade v_i na temperatura inicial T desejada. Como a atribuição das velocidades a cada temperatura pode introduzir

perturbações no sistema, inclusive deformações em macromoléculas, é recomendado que ele seja aquecido lentamente a partir de uma baixa temperatura, usualmente 10 K, até a temperatura de equilíbrio, usualmente 310 K, visando uniformizar as suas energias. Nesta etapa, o solvente é considerado flexível e soluto é considerado rígido para que aquele se movimente da superfície para as cavidades deste.

A equilibração consiste na simulação do sistema pelo tempo necessário para que ele se equilibre, ou seja, para que suas diversas propriedades (energias cinéticas e potenciais, estrutura, temperatura, pressão e demais parâmetros que se deseja observar) estabilizem-se.

Na etapa de produção as propriedades médias que se deseja estudar estão equilibradas e, portanto, podem ser analisadas.

III.9 – Associação de *docking* e DM para o estudo de complexos receptor-ligante

Neste trabalho, optou-se por utilizar *docking* e DM para geração e refinamento dos complexos de COX com triterpenoides devido a algumas utilidades e limitações de ambas as técnicas, discutidas no parágrafo seguinte conforme ALONSO, BLIZNYUK e GREASY (2006).

Inicialmente, cabe ressaltar que o algoritmo de *docking* utilizado executa a busca por orientações e conformações do ligante no sítio de forma randômica, o que é interessante para a proposição de diferentes encaixes do ligante no sítio, enquanto a DM executa uma busca determinística ao refinar os complexos. Outro aspecto importante é que, ao contrário do método de *docking* utilizado, a DM permite a total flexibilização do receptor, o uso de solvatação explícita e a utilização de PME para o tratamento das interações eletrostáticas de longa distância. Além disso, a DM é útil para a avaliação dos complexos ao longo do tempo, o que pode fornecer informações importantes sobre a estabilidade destes. Um aspecto negativo comum ao *docking* e à DM é o tratamento simplista das interações para o cálculo do ΔG_{bind} , mas a DM permite a utilização de metodologias mais acuradas para esse cálculo como Perturbação de Energia Livre (FEP – *free energy perturbation*) [DOUUT & WEBER, 1997].

Neste trabalho, abordaram-se técnicas de modelagem molecular provenientes da mecânica quântica, para a minimização de ligantes e cálculos de cargas, e da mecânica molecular, como *docking* e DM, com o objetivo de se estudar o modo de interação dos triterpenoides ácidos oleanólico e ursólico com as isoformas da COX.

IV. METODOLOGIA

IV.1 – Preparação das estruturas de isoformas COX e dos ligantes para o *docking*

As estruturas cristalográficas de isoformas COX complexadas com os respectivos ligantes (FIGURA 5), obtidas do *Protein Data Bank* (PDB, disponível em www.pdb.org) [BERMAN *et al.*, 2000] sob os códigos de acesso (com respectivas resoluções “R”) 1CQE (R=3,10 Å) [PICOT, LOLL & GARAVITO, 1994], 1DIY (R=3,00 Å) [MALKOWSKI *et al.*, 2000], 2OYE (R=2,85 Å) [HARMAN *et al.*, 2001], 2OYU (R=2,70 Å) [HARMAN *et al.*, 2001] e 3KK6 (R=2,75 Å) [RIMON *et al.*, 2001] referentes a COX-1 de origem ovina, e 1CX2 (R=3,00 Å) [KURUMBAIL *et al.*, 1996], 3PGH (R=2,50 Å) [KURUMBAIL *et al.*, 1996], 4COX (R=2,90 Å) [KURUMBAIL *et al.*, 1996] e 1PXX (R=2,90 Å) [ROWLINSON *et al.*, 2003], referentes a COX-2 de origem murina, foram preparadas no programa Swiss-PDBViewer 4.0 [GUEX *et al.*, 2008] gerando arquivos de monômeros contendo somente os resíduos de aminoácidos e o grupo heme e arquivos contendo somente os ligantes cristalográficos anteriormente complexados aos referidos monômeros. Os ligantes cristalográficos e os triterpenoides AO e AU foram desenhados no programa PC Spartan Pro [DEPPMEIER *et al.*, 2000] mantendo os grupos carboxilatos ionizados conforme o pH fisiológico e minimizados pelo método mecânico-quântico semi-empírico AM1 neste programa.

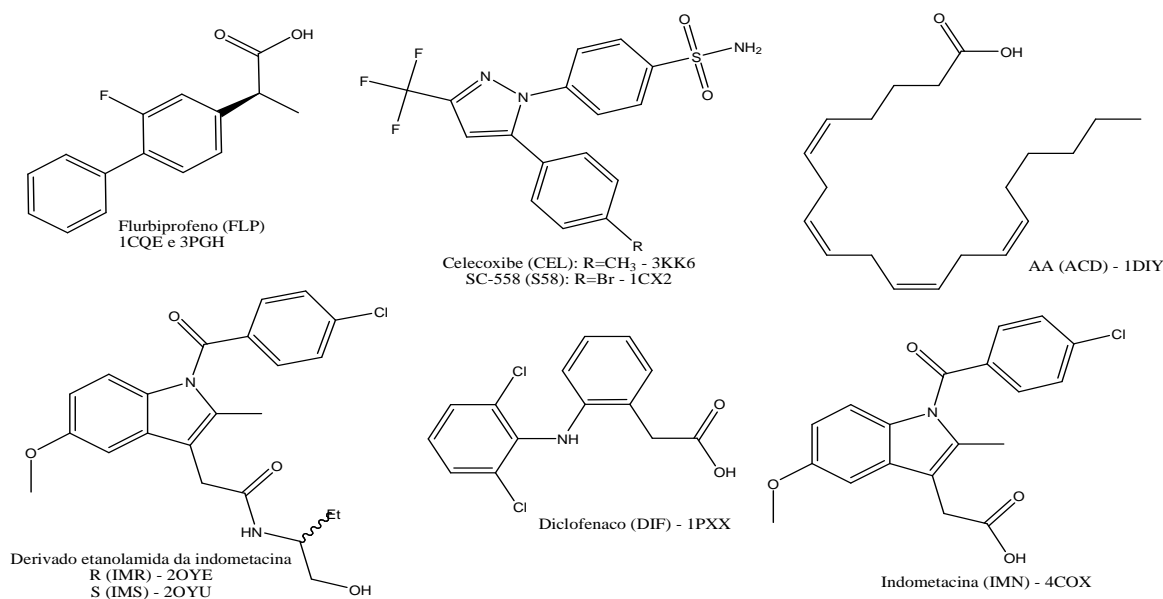


FIGURA 7: Estruturas químicas dos ligantes complexados às estruturas das isoformas COX.

IV.2 – Docking dos ligantes cristalográficos e triterpenoides com monômeros de isoformas COX

Os monômeros de isoformas COX foram submetidos a tratamento no programa AutoDockTools 1.5.2 [SANNER *et al.*, 2008] adicionando-se hidrogênios polares e cargas Gasteiger mantendo-se a estrutura rígida e todos os resíduos de histidina protonados. Os ligantes também foram submetidos ao tratamento nesse programa mantendo-se todas as ligações torcionáveis flexíveis conforme definições do programa e adicionando-se cargas Gasteiger. Os *grids*

foram calculados pelo programa AutoGrid 4.0 centrados no ligante cristalográfico com *grid* de 60x60x60 e distância entre pontos de 0,375 Å.

Os estudos de *docking* de ligantes cristalográficos e dos triterpenoides AO e AU com monômeros de isoformas COX foram executados pelo programa AutoDock 4.0 utilizando o algoritmo LGA e função de pontuação empírica para calcular o ΔG_{bind} dos complexos propostos. O protocolo do LGA utilizou uma população inicial de 150 indivíduos, no máximo 27.000 gerações e 2.500.000 avaliações de energia, taxa de mutação 0,02, taxa de permutação 0,8, taxa de elitismo 1, produção de 20 complexos e demais parâmetros definidos pelo programa automaticamente. Para o cálculo dos RMSD dos ligantes cristalográficos minimizados obtidos do *docking* em relação àqueles obtidos da estrutura cristalográfica, foi utilizado o programa Surfex 2.11 [JAIN, 2003].

Dentre as 20 soluções obtidas de cada um dos estudos de *docking* dos monômeros de COX com os respectivos ligantes cristalográficos, foram selecionados para análise os complexos cujos ligantes apresentaram menor RMSD. Para o agrupamento das soluções de *docking*, foi utilizado pelo AutoDock 4.0 o critério de ΔG_{bind} . Para a visualização gráfica dos resultados de *docking*, foram utilizados os programas AutoDockTools 1.5.2 e Discovery Studio Visualizer 2.5.5 [ACCELRYS SOFTWARE INC., 2009], que também foi utilizado para a geração das figuras de sobreposição de ligantes e de complexos obtidos por DM. Para análise das interações de van der Waals e ligações de hidrogênio foram consideradas distâncias máximas de 4,0 e 2,2 Å, respectivamente.

IV.3 – DM e *redocking* de AO e AU com monômeros obtidos de complexos equilibrados

Após a seleção para DM dos complexos de monômeros de COX com AO e AU provenientes do *docking*, foram geradas as topologias dos monômeros no GROMACS 4 utilizando campo de força GROMOS96 versão 45A3 e as topologias dos ligantes no PRODRG [SCHÜTTELKOPF & van AALTEN, 2004] utilizando campo de força GROMOS96 e atribuição total de cargas, que foram substituídas pelas cargas HF/6-31G calculadas no programa Gaussian 03W versão 6.0 [FRISCH *et al.*, 2003] após minimização de energia por este método. A protonação de cada resíduo de histidina variou conforme as interações por ligações de hidrogênio [van der SPOEL, 2005]. Em seguida, os complexos proteína-ligante foram solvatados explicitamente por água do tipo SPC numa caixa cúbica utilizando condições periódicas de contorno, com distância de 1nm entre o soluto e a superfície da caixa. Contraíons sódio foram adicionados aos sistemas de forma a neutralizar as cargas conforme requisitado pelo programa. Todos os sistemas foram submetidos à minimização de energia usando o algoritmo *Steepest Descent* seguido por Gradiente Conjugado e, em seguida, foram utilizados como ponto de partida para as simulações de DM, conforme relatado a seguir.

Nos experimentos de DM, o método LINCS foi aplicado na restrição de ligações covalentes do soluto e da água para permitir um passo de integração de 2 fs. As interações de van der Waals foram calculadas com *cutoff* de 14 Å, enquanto as interações eletrostáticas foram calculadas pelo método PME (*Particle-Mesh Ewald*) [DARDEN, YORK & PEDERSEN, 1993], aplicável a simulações de DM por tratar as interações eletrostáticas a longa distância sem truncá-las abruptamente a partir do *cutoff* utilizado (10 Å) [SMITH & PETTIT, 1991]. Todos os sistemas foram submetidos a banhos externos de temperatura e pressão de Berendsen conforme *ensemble* NPT. A termalização (pré-equilibração) compreendeu o aquecimento gradativo dos sistemas de 10 a 310 K, mantendo flexíveis somente as estruturas do solvente com os objetivos de inseri-lo nas cavidades da macromolécula e de evitar deformações na estrutura desta; nesse processo, os sistemas foram mantidos a 10, 50, 100, 150, 200 e 250 K durante 20 ps cada e a 310 K por 30 ps, totalizando 150 ps. As etapas de equilibração e produção foram feitas na temperatura de equilíbrio de 310 K até que fossem completados 15.000 ps. Adicionalmente, para verificar a possibilidade de interações favoráveis que necessitassem superar barreiras de energia, os sistemas foram aquecidos a 410 K durante 50 ps e mantidos novamente a 310 K durante 150 ps, totalizando 15.200 ps de simulação por DM.

As análises de estabilização dos sistemas consideraram os gráficos de RMSD produzidos pelo GROMACS 4 a partir da comparação entre a estrutura inicial minimizada e a estrutura obtida ao longo da trajetória. Estando os sistemas equilibrados, foram analisadas as interações. As interações por ligação de hidrogênio observadas nos complexos finais obtidos a 15,2 ns foram avaliadas quanto à distância H⁺Aceptor (máximo de 2,2 Å) e ângulo H⁺Y. Foram identificadas também as posições de aproximação entre os sítios reativos de AO e AU, passíveis de modificação por semi-síntese, e a cavidade de seletividade de ambas isoformas, pois isso é relevante para o planejamento de inibidores COX-2-seletivos. Para o cálculo do ΔG_{bind} , foram feitos os *redockings* de AO e AU com os monômeros obtidos a 15,2 ns contendo todas as moléculas de água presentes no sítio. A metodologia empregada nesses experimentos seguiu os mesmos parâmetros daquela relatada para os *dockings* iniciais com os monômeros obtidos do PDB, mas a geração dos *grids* foi feita com os ligantes AO e AU extraídos dos complexos equilibrados a 15,2 ns, e apenas os valores de ΔG_{bind} referentes às soluções de *docking* mais estáveis foram considerados na análise.

V. RESULTADOS E DISCUSSÃO

V.1 – *Docking* dos monômeros de isoformas COX obtidos do PDB com os respectivos ligantes

Os valores de ΔG_{bind} obtidos dos *dockings*, referentes às soluções em que os ligantes apresentaram menor RMSD (TABELA 1), são satisfatórios mas não podem ser comparados entre si devido a limitações da função de pontuação [PLEWCZYNSKI *et al.*, 2010], bem como a dados experimentais devido à falta destes na literatura, pois apenas os valores de IC_{50} estão relatados.

O GRÁFICO 2 mostra um desvio na relação entre o RMSD e o número de ligações torcionáveis dos ligantes para o *docking* de 4COX com indometacina (4 ligações torcionáveis) e de 2OYE e 2OYU com os derivados etanolamidas (8 ligações torcionáveis). Possivelmente, tal desvio ocorreu devido à limitação do método AM1 para lidar com anéis heterocíclicos [SHAFFER & WIERSCHKE, 1993] e à baixa resolução das estruturas cristalográficas. Apesar de ter 14 ligações torcionáveis, AA apresentou RMSD mais baixo que o esperado devido à resolução da estrutura e ao fato de ser o substrato de isoformas COX e ter cadeia linear, o que pode ter conferido maior compactação com o sítio da enzima durante a complexação, tornando-o mais estreito e dificultando movimentos das ligações torcionáveis do ligante durante o *docking*. A correlação entre o número de *clusters* e de ligações torcionáveis dos ligantes (GRÁFICO 2B) foi satisfatória pois, quanto mais flexível o ligante, maior a variação nas soluções propostas pelo *docking*. Na FIGURA 8 são mostradas as sobreposições dos ligantes em referência aos valores de RMSD da TABELA 1. Conforme os valores de RMSD obtidos, o *docking* foi considerado validado.

TABELA 1: *Docking* dos monômeros de isoformas COX com seus respectivos ligantes.

Complexo	Nt*	Nc**	RMSD (Å)	ΔG_{bind} (kcal.mol ⁻¹)
1CQE-FLP	2	1	0,79	-7,7
1DIY-ACD	14	9	1,19	-6,1
2OYE-IMR	8	3	1,48	-9,6
2OYU-IMS	8	4	1,86	-7,0
3KK6-CEL	3	1	0,77	-9,9
1CX2-S58	3	1	0,92	-10,0
1PXX-DIF	4	2	1,00	-7,6
3PGH-FLP	2	1	0,52	-8,3
4COX-IMN	4	2	1,72	-10,0

* Número de ligações torcionáveis do ligante cristalográfico. ** Número de *clusters* em que foram classificadas as 20 soluções propostas pelo algoritmo.

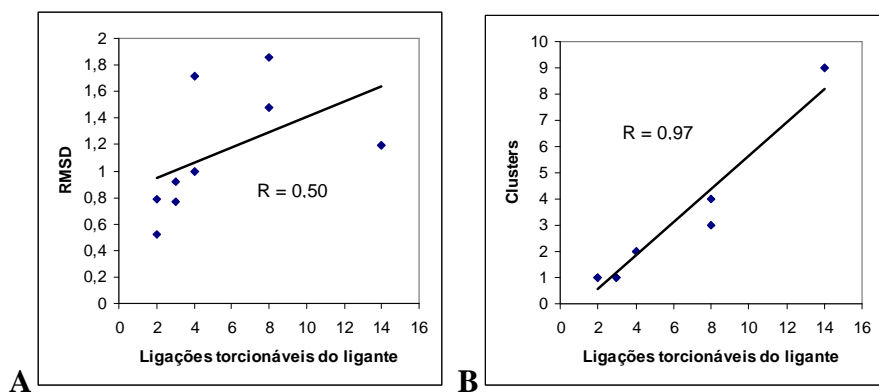


GRÁFICO 2: Correlação do RMSD em Å (A) e do número de *clusters* (B), obtidos nos estudos de *docking*, com o número de ligações torcionáveis dos ligantes, conforme dados da TABELA 1.

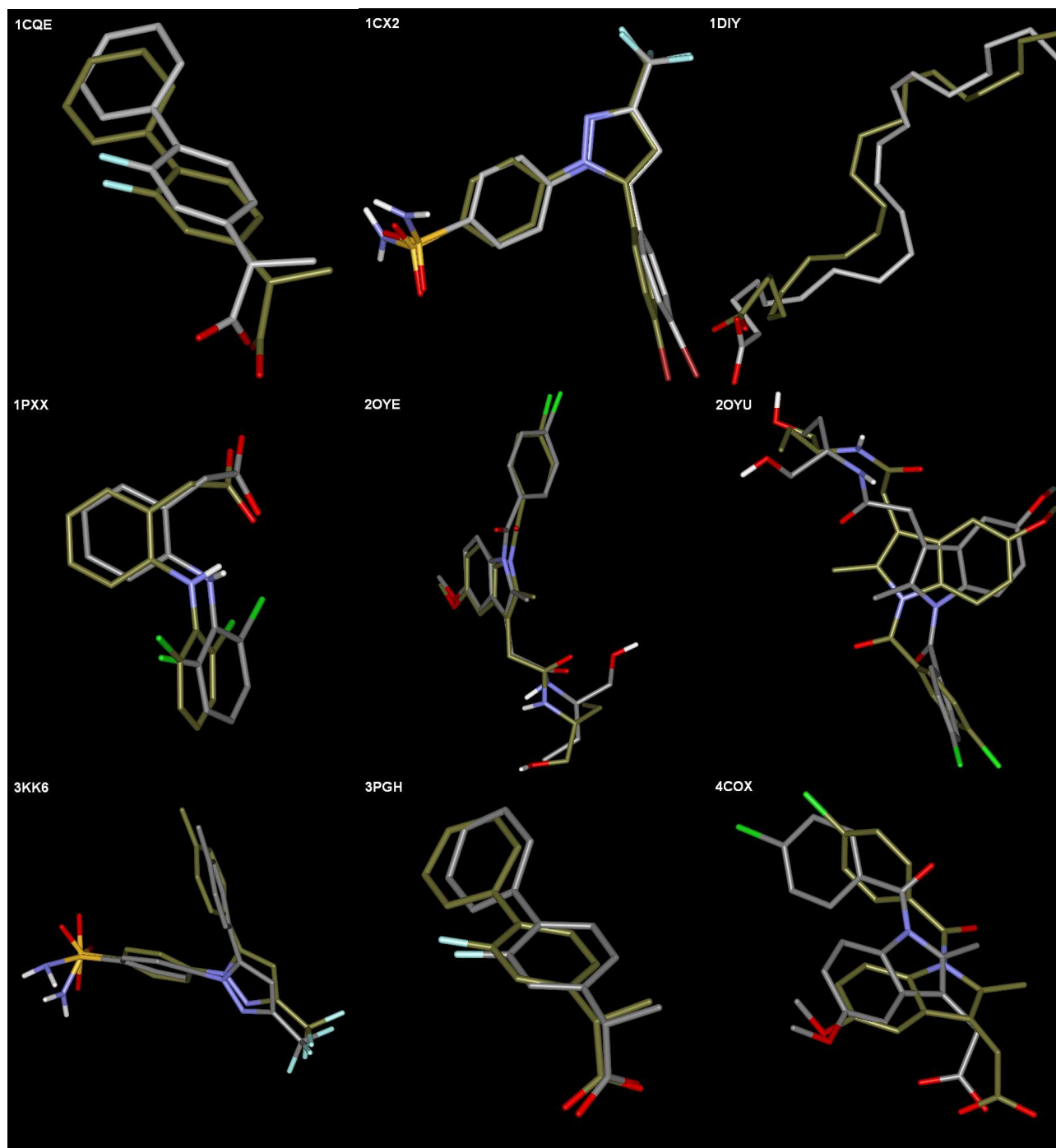


FIGURA 8: Sobreposições dos ligantes cristalográficos construídos (verde), obtidos *por docking*, aos ligantes obtidos das estruturas do PDB (cinza).

V.2 – Docking de AO e AU com as estruturas cristalográficas rígidas de COX

Os *dockings* de monômeros rígidos de isoformas COX com AO e AU produziram complexos em que esses ligantes posicionaram-se no sítio com orientações, conformações e ΔG_{bind} distintos, mas foram observadas semelhanças nas orientações dos ligantes nos sítios, o que permitiu a classificação destas como 1, 1' e 2 (FIGURA 9) e contribuiu para a seleção daqueles complexos que seriam submetidos à DM. A TABELA 2 relata os resultados do *docking*, como o número de *clusters* e de complexos pertencentes ao *cluster* mais populoso, que refletem a satisfatória reprodutibilidade da busca executada pelo *docking* de ambos os ligantes.

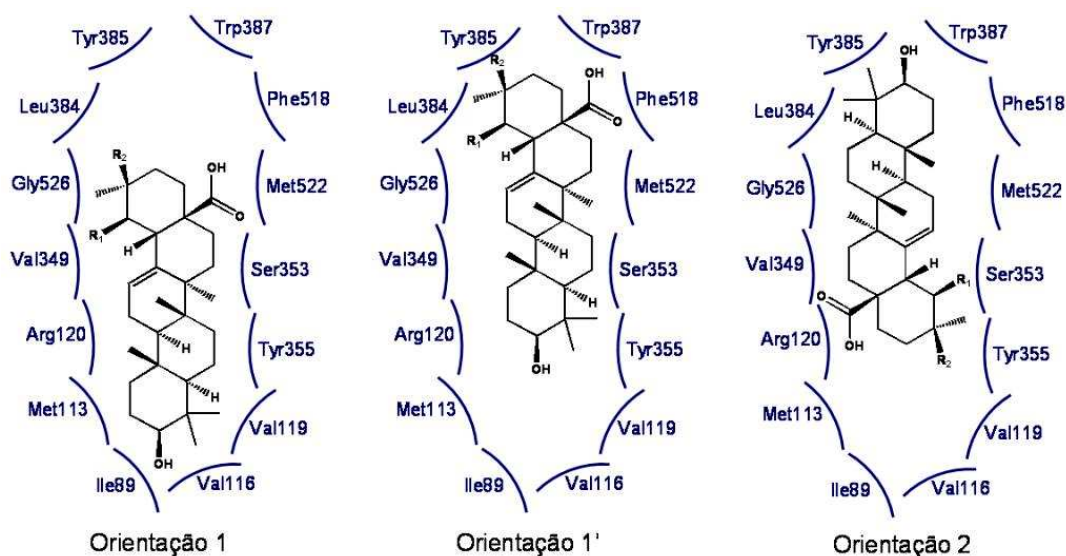


FIGURA 9: Orientações, obtidas por *docking*, de AO e AU nos sítios rígidos de COX-1 e COX-2.

Um ligante volumoso como AO e AU não se acomoda favoravelmente num sítio inicialmente complexado a uma estrutura pouco volumosa como o flurbiprofeno (1CQE, 3PGH), o diclofenaco (1PXX) e o AA (1DIY), levando a valores de ΔG_{bind} positivos, condição que privilegia a dissociação do complexo. Sítios ativos mais largos como os das estruturas 3KK6, 4COX, 2OYE, 2OYU e 1CX2, complexadas a moléculas muito volumosas como celecoxib, indometacina, derivados etanolamida R e S da indometacina e SC-558, respectivamente, acomodam favoravelmente moléculas volumosas como AO e AU, o que culmina em valores de ΔG_{bind} negativos, condição que privilegia a formação do complexo. Entretanto, os complexos de 2OYU com os triterpenóides resultaram em valores de ΔG_{bind} positivos porque alguns átomos do esqueleto de AO e AU aproximaram-se de resíduos da entrada do sítio como Arg120, Tyr355 e Val116, e esta região é menos larga em 2OYU do que em 2OYE porque a cadeia etanolamida do ligante de 2OYU não interage nesta região, ao contrário do que ocorre em 2OYE [HARMAN *et al.*, 2007].

Considerando que a maioria dos *dockings* produziu complexos de ΔG_{bind} positivo e que estes seriam refinados por DM, optou-se por não detalhar as interações ligante-receptor observadas, mas

apenas por descrevê-las brevemente em termos da orientação do ligante no sítio considerando o posicionamento da hidroxila em C-3, do carboxilato em C-28 e dos grupos metila em C-19 e C-20, o que foi útil para a definição de quais complexos seriam submetidos à DM.

TABELA 2: *Docking* de AO e AU com os monômeros rígidos de COX.

Ligante	Isoforma	IC ₅₀ <i>in vitro</i> (μ M)	Código PDB	Ng*	Ncc**	Orientação do ligante	ΔG_{bind} *** (kcal.mol ⁻¹)
AO	COX-1	380	1CQE	1	20	1	3,9
			1DIY	2	18	1	10,9
			1DIY	2	18	2	12,4
			2OYE	1	20	1	-6,9
			2OYU	1	20	1	2,0
	COX-2	295	3KK6	1	20	1	-1,0
			1CX2	1	20	2	-4,7
			1PXX	2	12	2	0,8
			1PXX	2	12	1	2,5
			3PGH	1	20	1	0,1
AU	COX-1	210	4COX	1	20	2	-3,0
			1CQE	1	20	1	1,0
			1DIY	2	11	1	12,3
			1DIY	2	11	2	14,3
			2OYE	2	16	2	-5,5
	COX-2	130	2OYE	2	16	1	0,6
			2OYU	1	20	1	1,2
			3KK6	1	20	1	-1,1
			1CX2	1	20	2	-1,8
			1PXX	1	20	2	-1,1
			3PGH	1	20	1	1,1
			4COX	2	14	2	-3,1
			4COX	2	14	1'	-0,3
			4COX	2	14	1	0,3

* Número de *clusters* em que se agruparam as soluções propostas pelo *docking*. ** Número de soluções agrupadas no *cluster* mais populoso. *** ΔG_{bind} referente ao complexo cuja orientação foi citada na coluna anterior.

Complexos de COX-1: os *dockings* de AO e AU com 1CQE, 1DIY, 2OYU e 3KK6 produziram orientações 1 em que as hidroxilas em C-3 aproximaram-se de Met113 e Val116, os grupos carboxilato aproximaram-se de Met522 e Gly526 e os grupos metila em C-19 e C-20 aproximaram-se de Trp387, Tyr348 e Tyr385. Adicionalmente, os *dockings* de 1DIY com AO e AU produziram orientações 2 em que as hidroxilas em C-3 aproximaram-se de Ser530 e Phe381, os grupos carboxilato aproximaram-se de Phe518 e Leu352 e os grupos metila em C-19 e C-20 aproximaram-se de Ile523 e Ser353. O *docking* 2OYE-AU produziu orientações 1 semelhantes àquelas relatadas para os complexos de AO e AU com 1CQE, 1DIY, 2OYU e 3KK6, bem como orientações 2, em que a hidroxila em C-3 aproximou-se de Val349 e Ser353, o grupo carboxilato aproximou-se de Val116 e Arg120 e os grupos metila em C-19 e C-20 aproximaram-se de Glu524, Pro86 e Ile89. O *docking* 2OYE-AO produziu orientações 1, em que a hidroxila em C-3 aproximou-se de Val119 e Ile89, o grupo carboxilato aproximou-se de Ser353 e Leu359 e os grupos metila em C-20 aproximaram-se de Phe518, Ile523 e Ala527. Conforme as variações de posicionamento de AO e AU nos sítios de COX-1, foram selecionados para estudos de DM os complexos de AO e AU nas orientações 1 e 2 obtidos dos *dockings* com 1DIY e 2OYE, totalizando sete complexos.

Complexos de COX-2: os *dockings* de 3PGH com AO e AU e 1PXX-AO produziram orientações 1 semelhantes àquelas obtidas dos *dockings* de AO e AU com 1CQE, 1DIY, 2OYU e 3KK6, relatadas no parágrafo anterior. Os *dockings* de AO e AU com 1CX2 e 1PXX e o *docking* 4COX-AO produziram orientações 2 em que as hidroxilas em C-3 aproximaram-se de Trp387, Tyr385 e Leu384, os grupos carboxilato aproximaram-se de Ser353 (o *docking* 4COX-AO mostrou interação por ligação de hidrogênio com a hidroxila à distância de 2,2Å) e Val349 e os grupos metila em C-19 e C-20 aproximaram-se de Val116 e Leu531. O *docking* 4COX-AU produziu duas orientações do tipo 1, denominadas 1' e 1, e uma orientação do tipo 2. A orientação 2 interagiu de forma ligeiramente diferente daquela relatada para o complexo 4COX-AO pois a hidroxila em C-3 aproximou-se de Leu384, Phe381 e Tyr385, o carboxilato aproximou-se de Leu359 e Ser353 mas não interagiu por ligação de hidrogênio com Ser353 devido a distância interatômica de 3,0Å e os grupos metila em C-19 e C-20 aproximaram-se de Leu531 e Ala527. Adicionalmente, duas orientações do tipo 1 foram propostas pelo algoritmo: na orientação 1', a hidroxila em C-3 aproximou-se de Tyr355, o carboxilato aproximou-se de Leu352, Tyr348 e Trp387 e os grupos metila em C-19 e C-20 aproximaram-se de Gly526 e Leu384, respectivamente; na orientação 1, a hidroxila em C-3 aproximou-se de Met113 e Val116, o carboxilato aproximou-se de Phe518, Met522 e Ala527 e os grupos metila em C-19 e C-20 aproximaram-se de Ser530 e Tyr385, respectivamente. Conforme as variações de posicionamento de AO e AU nos sítios de COX-2, foram selecionados para estudos de DM os complexos de AO e AU nas orientações 2, 1 e 1' obtidos dos *dockings* com 3PGH e 4COX, totalizando cinco complexos.

V.3 – DM dos complexos de AO e AU com monômeros de isoformas COX e *redocking*

Conforme os gráficos de RMSD das cadeias principais de todos os monômeros complexados a AO e AU, a trajetória de 15,2 ns foi suficiente para a estabilização dessas cadeias (GRÁFICO 3). Foram observadas variações sutis de RMSD nesses gráficos, mas elas não podem ser relacionadas a AO e AU pois referem-se aos 554 C α da cadeia principal do monômero. Devido a esses ligantes ocuparem um sítio ativo anteriormente ocupado por outro ligante, conforme a estrutura experimental obtida do PDB, e devido à elevada semelhança estrutural que eles compartilham, durante a DM tendem a causar modificações mais pronunciadas nas cadeias laterais dos resíduos do sítio do que na cadeia principal do monômero.

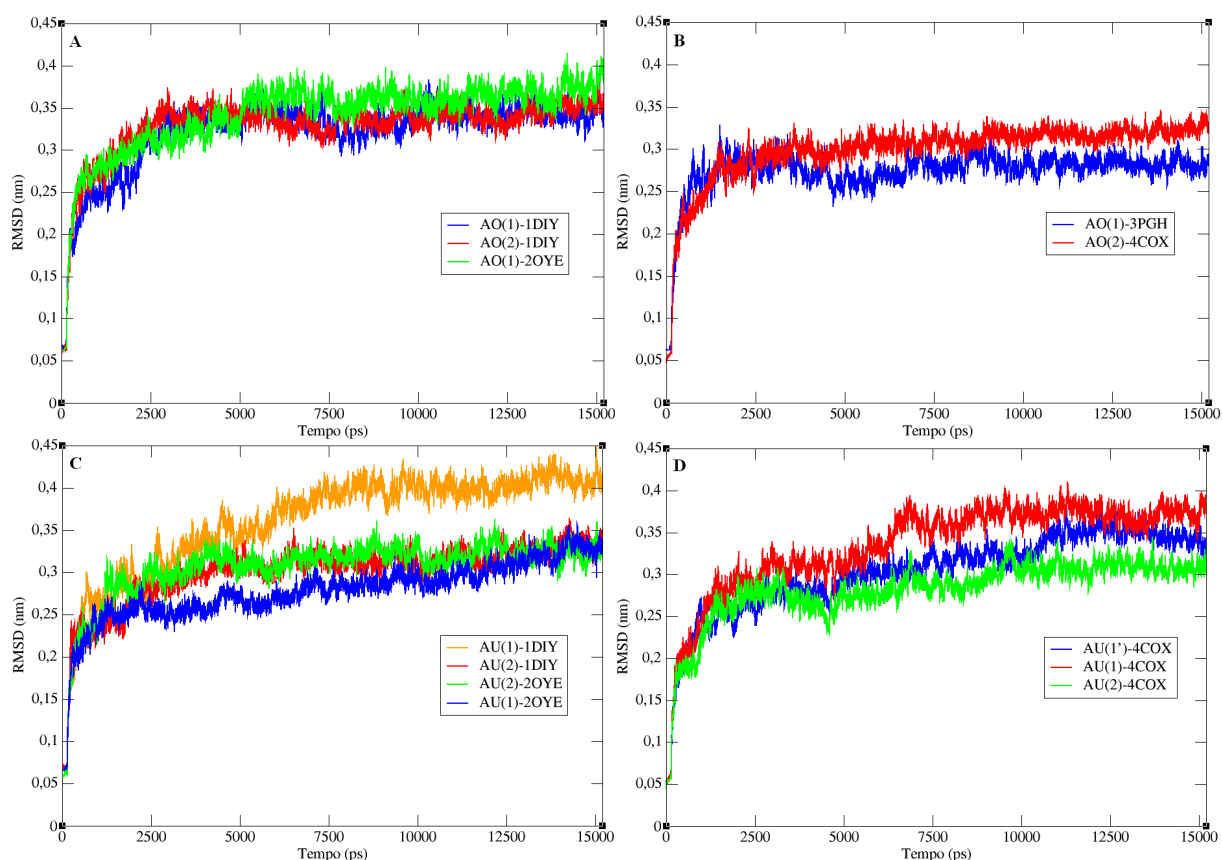


GRÁFICO 3: RMSD de C α dos monômeros de isoformas COX referentes aos complexos de AO com COX-1 (A), AO com COX-2 (B), AU com COX-1 (C) e AU com COX-2 (D).

As análises das interações foram feitas aos 8, 9, 10 e 12 ns, não tendo sido observadas diferenças na posição dos ligantes e das cadeias laterais a partir de 10 ns de simulação. Como a hidroxila em C-3 dos ligantes não interagiu por ligação de hidrogênio com resíduos de aminoácidos próximos em alguns complexos, possivelmente devido a barreiras energéticas que deveriam ser superadas para modificação dos graus de liberdade dos resíduos, todos os sistemas finais foram simulados por mais 50 ps a 410 K e por 150 ps a 310 K, sem que ocorressem alterações. Em todos

os complexos, foi observada a presença de moléculas de água próximas aos grupos polares dos ligantes. Apesar de o sítio das isoformas COX ser lipofílico, a água exerce um papel fundamental nas interações com inibidores [PALOMER *et al.*, 2000; SAI-RAM *et al.*, 2006].

Nos *redockings* de AO e AU com as estruturas dos monômeros obtidas dos complexos finais de 15,2 ns, os ligantes sobrepuseram-se satisfatoriamente aos ligantes originais dos complexos, o que permitiu relacionar os valores de ΔG_{bind} calculados pelo AutoDock 4.0, citados nas legendas das FIGURAS 10-21, aos complexos equilibrados pela DM. Esses valores mostraram que AO e AU não são seletivos para COX-2 e que não é possível determinar a orientação mais provável dos ligantes nos sítios das isoformas devido às limitações da função de pontuação do AutoDock 4.0. As metodologias de *docking* não são adequadas para a previsão de valores acurados de ΔG_{bind} , embora o sejam para a previsão de interações [PLEWCZYNSKI *et al.*, 2010]. Dessa forma, torna-se necessário avaliar os complexos por metodologias mais apropriadas tais como perturbação de energia livre (FEP – *free energy perturbation*) [DOUUT & WEBER, 1997], por exemplo.

V.3.1 – Complexos de AO com COX-1

Conforme TABELAS 3-5 e FIGURAS 10-12, no complexo da orientação 1 de AO com 1DIY foram observadas interações por ligação de hidrogênio do carboxilato do ligante com a hidroxila de Ser530 e da hidroxila em C-3 do ligante com a carbonila de Leu357. No complexo da orientação 1 de AO com 2OYE foram observadas interações por ligação de hidrogênio do carboxilato do ligante com o anel imidazol de His90 e com a hidroxila de Ser353, mediadas por água, com a amina de Ser353 (interação fraca, conforme o ângulo HÂY) e duas moléculas de água. Ao se comparar ambos os complexos, observa-se que as interações por ligação de hidrogênio do complexo da orientação 1 de AO com 1DIY são menos estáveis do que as do complexo da orientação 1 de AO com 2OYE devido ao maior desvio do ângulo HÂY ideal, o que não pressupõe que esse complexo seja mais estável do que aquele dado que o sítio é lipofílico. No complexo da orientação 2 de AO com 1DIY foram observadas duas interações fracas por ligação de hidrogênio do carboxilato do ligante com a hidroxila de fenol de Tyr355, que provavelmente correspondem a uma interação forte com a região de caráter negativo localizada entre os dois átomos de oxigênio do grupo carboxilato. Foram observadas também interações por ligação de hidrogênio do carboxilato do ligante com o grupo guanidina de Arg120 e com uma molécula de água. Dentre os complexos de AO com COX-1, apenas no complexo 2OYE-AO o carboxilato do ligante aproximou-se do bolso de seletividade (Ser353, His90) acessível em COX-2 e considerado inacessível em COX-1 pelos fármacos COX-2-seletivos, apesar de alguns ligantes já demonstrado interações com esse bolso na isoforma 2OYE [HARMAN *et al.*, 2007].

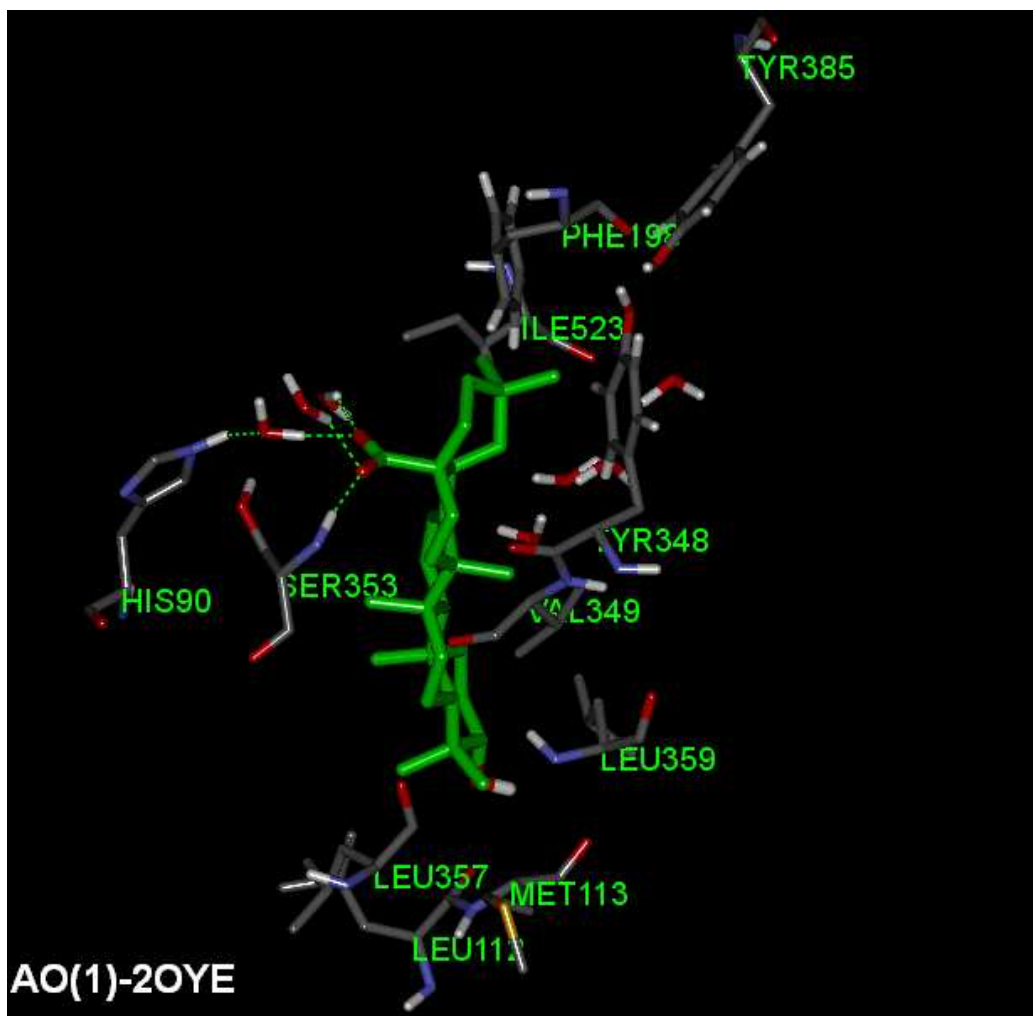


FIGURA 10: Orientação 1 de AO complexada ao sítio ativo de COX-1 (2OYE) após 15,2 ns de DM. As interações por ligação de hidrogênio estão explicitadas em pontilhado verde e apenas os resíduos próximos ao ligante são apresentados, mas alguns foram removidos para melhor visualização do complexo. $\Delta G_{bind} = -11,1 \text{ kcal.mol}^{-1}$, calculado pelo *redocking*.

TABELA 3: Interações por ligação de hidrogênio do complexo mostrado na FIGURA 10.

Interação por Ligação de Hidrogênio	Distância H...A (Å)	Ângulo HÂY _{obs}	Ângulo HÂY _{prev}
His90-NH...OH ₂	1,9	114,8°	109,5°
OH ₂ ...OOC-AO	1,6	108,9°	120°
Ser353-OH...OH ₂	1,8	99,7°	109,5°
OH ₂ ...OOC-AO	1,6	108,9°	120°
Ser353-NH ₂ ...OOC-AO	2,2	164,1°	120°
OH ₂ ...OOC-AO	2,1	167,4°	120°
OH ₂ ...OOC-AO	1,8	104,8°	120°

HÂY_{obs} e HÂY_{prev} referem-se, respectivamente, aos ângulo HÂY observado e previsto conforme a hibridação do átomo A, sendo que H (átomo de hidrogênio), A (átomo aceptor) e Y (átomo ligado por covalência ao aceptor).

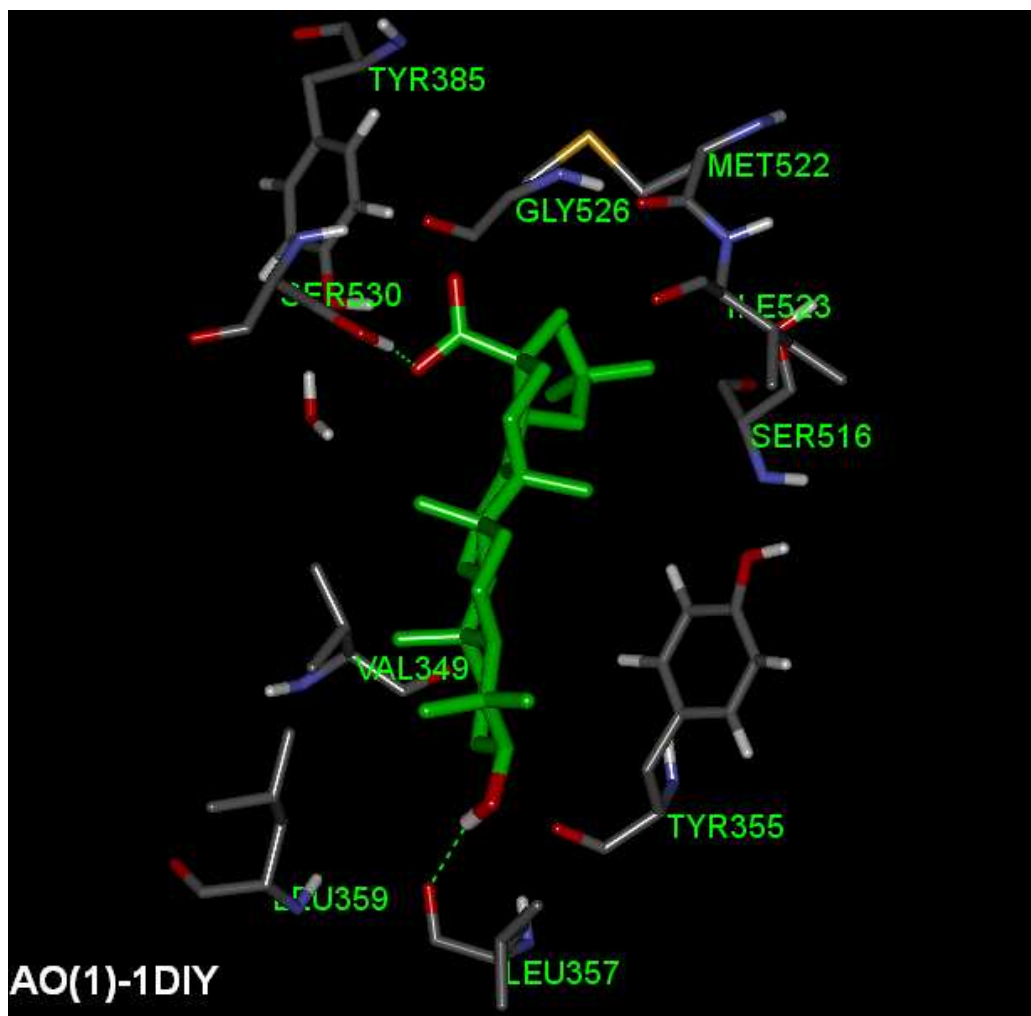


FIGURA 11: Orientação 1 de AO complexada ao sítio ativo de COX-1 (1DIY) após 15,2 ns de DM. As interações por ligação de hidrogênio estão explicitadas em pontilhado verde e apenas os resíduos próximos ao ligante são apresentados, mas alguns foram removidos para melhor visualização do complexo. $\Delta G_{bind} = -12,4 \text{ kcal.mol}^{-1}$, calculado pelo *redocking*.

TABELA 4: Interações por ligação de hidrogênio do complexo mostrado na FIGURA 11.

Interação por Ligação de Hidrogênio	Distância H...A (Å)	Ângulo HÂ _Y _{obs}	Ângulo HÂ _Y _{prev}
Ser530-OH...OOC-AO	1,9	101,3°	120°
Leu357-C=O...HO-AO	1,8	139,8°	120°

HÂ_Y_{obs} e HÂ_Y_{prev} referem-se, respectivamente, aos ângulo HÂ_Y observado e previsto conforme a hibridação do átomo A, sendo que H (átomo de hidrogênio), A (átomo aceptor) e Y (átomo ligado por covalência ao aceptor).

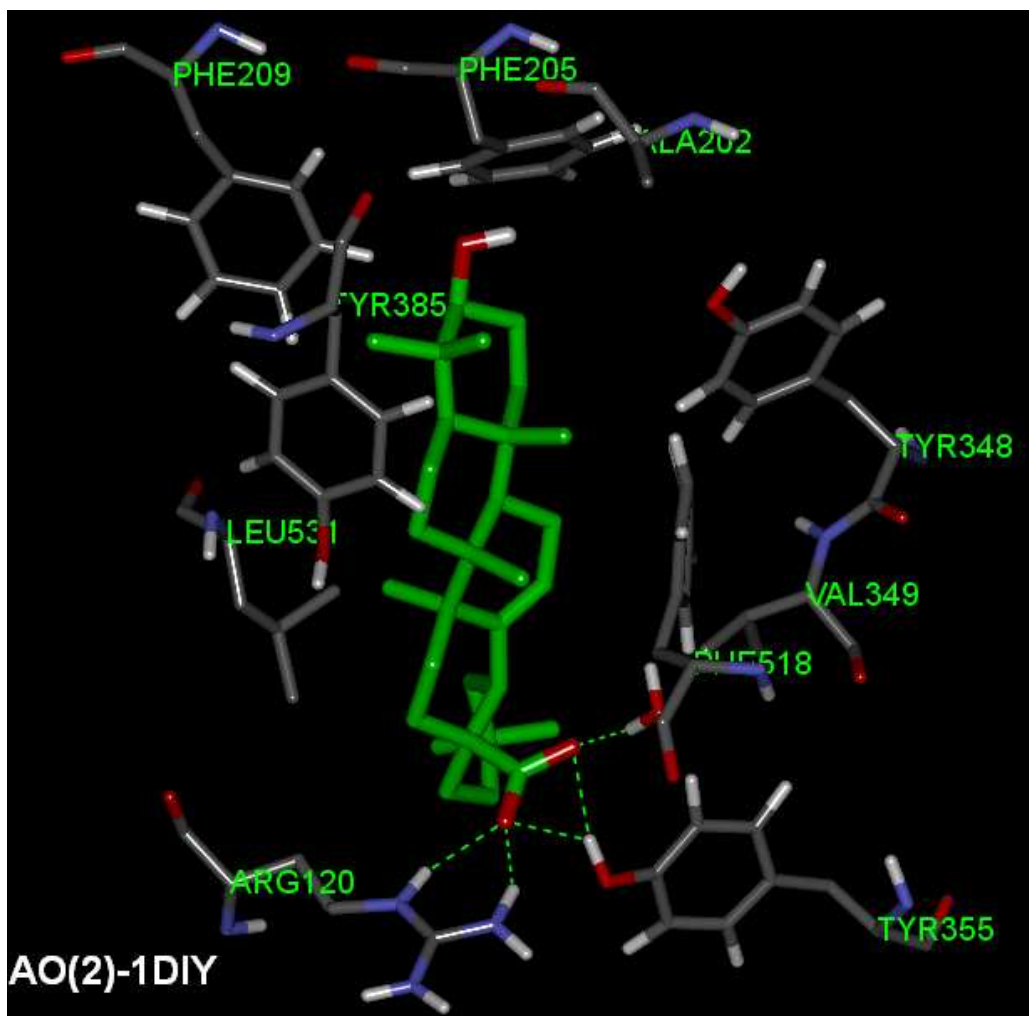


FIGURA 12: Orientação 2 de AO complexada ao sítio ativo de COX-1 (1DIY) após 15,2 ns de DM. As interações por ligação de hidrogênio estão explicitadas em pontilhado verde e apenas os resíduos próximos ao ligante são apresentados, mas alguns foram removidos para melhor visualização do complexo. $\Delta G_{bind} = -13,4 \text{ kcal.mol}^{-1}$, calculado pelo *redocking*.

TABELA 5: Interações por ligação de hidrogênio do complexo mostrado na FIGURA 12.

Interação por Ligação de Hidrogênio	Distância H...A (Å)	Ângulo HÂY _{obs}	Ângulo HÂY _{prev}
Tyr355-OH...OOC-AO	2,1	74,3°	120°
Tyr355-OH...OOC-AO	2,1	75,1°	120°
Arg120-NH ₂ ...OOC-AO	1,6	158,4°	180°
Arg120-NH...OOC-AO	2,1	126,4°	120°
OH ₂ ...OOC-AO	1,8	140,6°	120°

HÂY_{obs} e HÂY_{prev} referem-se, respectivamente, aos ângulo HÂY observado e previsto conforme a hibridação do átomo A, sendo que H (átomo de hidrogênio), A (átomo aceptor) e Y (átomo ligado por covalência ao aceptor).

V.3.2 – Complexos de AO com COX-2

Conforme TABELAS 6-7 e FIGURAS 13-14, no complexo com 3PGH, o carboxilato de AO (orientação 1) interagiu por ligações de hidrogênio mediadas por água com o carboxilato de Glu524 e a hidroxila de Tyr355, bem como interagiu diretamente por ligação de hidrogênio com Ser353. A hidroxila em C-3 desse ligante interagiu por ligação de hidrogênio com moléculas de água próximas à superfície da proteína. O complexo de 4COX com AO (orientação 2) demonstrou interações por ligação de hidrogênio do carboxilato do ligante com a carbonila de Phe357 e amina de Leu359, mediadas por água, e com a hidroxila de Ser353, bem como fraca interação por ligação de hidrogênio mediada por água da hidroxila em C-3 do ligante com a carbonila de Tyr385. O grupo carboxilato do ligante aproximou-se da entrada da cavidade de seletividade (Ser353). A visualização dos complexos mostrou que ambas as orientações do ligante, apesar de estarem invertidas no sítio, têm o grupo carboxilato próximo aos resíduos da base como Tyr355 e Ser353. Isso ocorreu porque no complexo formado com 3PGH o ligante distanciou-se muito do ápice do sítio, ocupando uma extensão menor do canal lipofílico, o que é uma desvantagem para a inibição da enzima e indica a possível saída do ligante do sítio ativo durante a simulação. Por isso, pode-se afirmar que a orientação 2 de AO é energeticamente mais favorável do que a orientação 1 no sítio de COX-2.

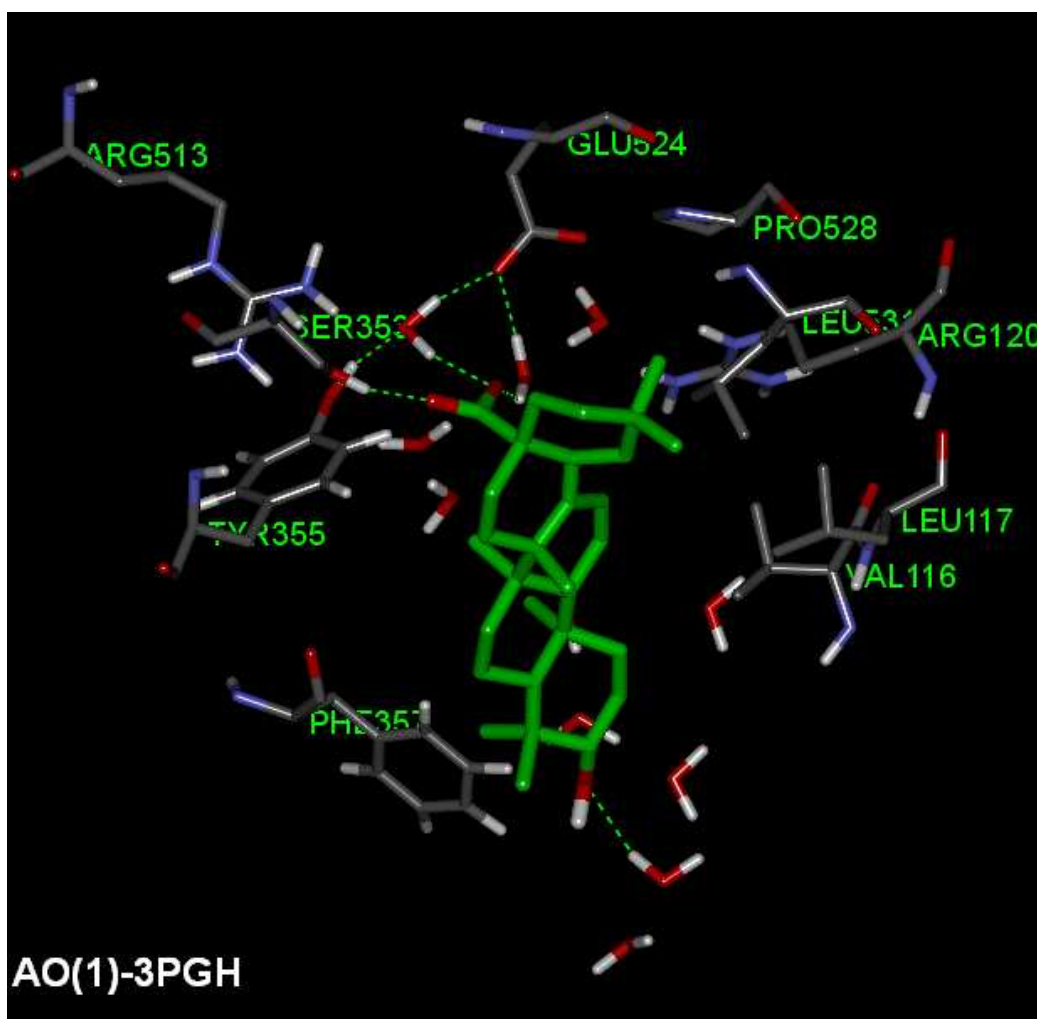


FIGURA 13: Orientação 1 de AO complexada ao sítio ativo de COX-2 (3PGH) após 15,2 ns de DM. As interações por ligação de hidrogênio estão explicitadas em pontilhado verde e apenas os resíduos próximos ao ligante são apresentados, mas alguns foram removidos para melhor visualização do complexo. $\Delta G_{bind} = -9,3 \text{ kcal.mol}^{-1}$, calculado pelo *redocking*.

TABELA 6: Interações por ligação de hidrogênio do complexo mostrado na FIGURA 13.

Interação por Ligação de Hidrogênio	Distância H...A (Å)	Ângulo HÂY _{obs}	Ângulo HÂY _{prev}
Glu524-COO...H ₂ O	1,9	152,8°	180°
OH ₂ ...OOC-AO	1,9	104,3°	120°
Tyr355-OH...OH ₂	1,7	107,4°	109,5°
OH ₂ ...OOC-AO	1,9	104,3°	120°
Ser353-OH...OOC-AO	1,9	174,0°	180°
OH ₂ ...OH-AO	2,2	42,5°	109,5°

HÂY_{obs} e HÂY_{prev} referem-se, respectivamente, aos ângulo HÂY observado e previsto conforme a hibridação do átomo A, sendo que H (átomo de hidrogênio), A (átomo aceptor) e Y (átomo ligado por covalência ao aceptor).

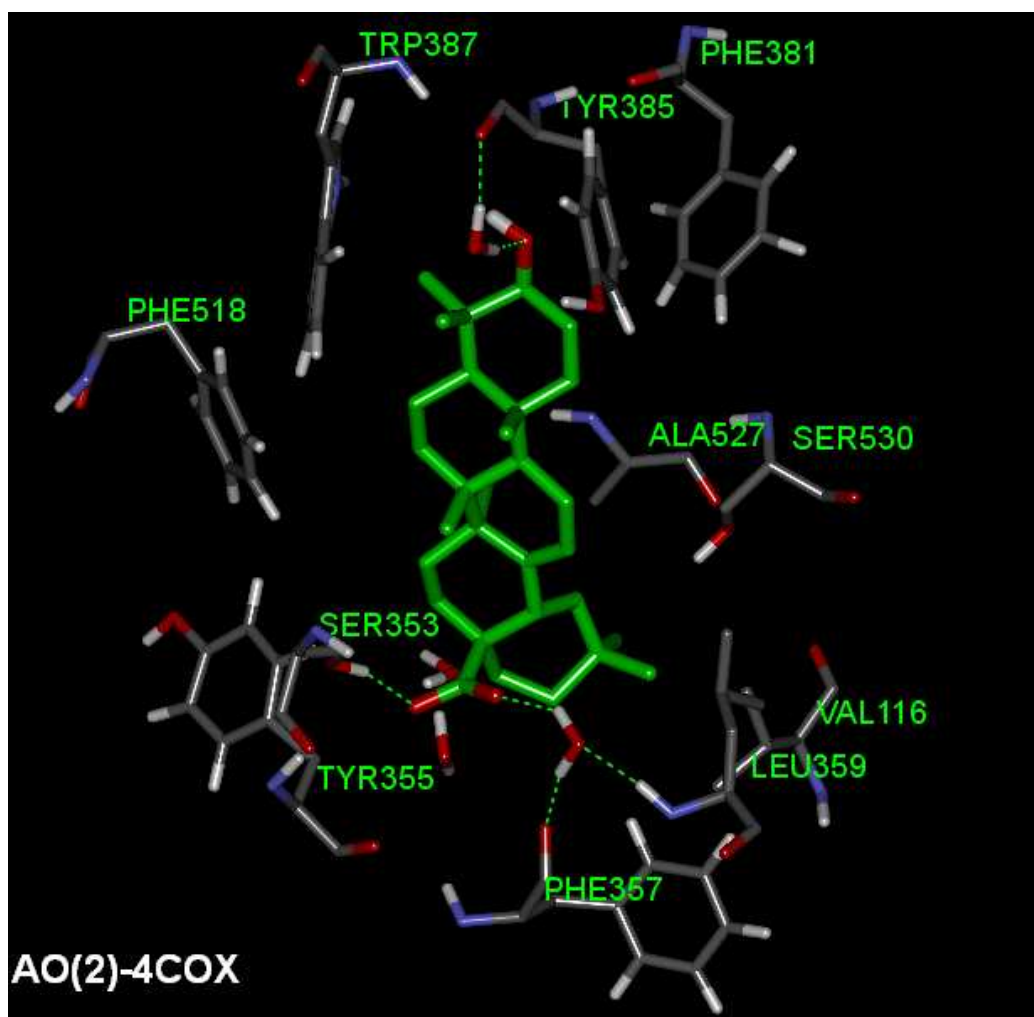


FIGURA 14: Orientação 2 de AO complexada ao sítio ativo de COX-2 (4COX) após 15,2 ns de DM. As interações por ligação de hidrogênio estão explicitadas em pontilhado verde e apenas os resíduos próximos ao ligante são apresentados, mas alguns foram removidos para melhor visualização do complexo. $\Delta G_{bind} = -12,1 \text{ kcal.mol}^{-1}$, calculado pelo *redocking*.

TABELA 7: Interações por ligação de hidrogênio do complexo mostrado na FIGURA 14.

Interação por Ligação de Hidrogênio	Distância H...A (Å)	Ângulo HÂY _{obs}	Ângulo HÂY _{prev}
Phe357-C=O...H ₂ O	1,8	138,3°	120°
OH ₂ ...OOC-AO	1,6	144,7°	120°
Leu359-NH ₂ ...OH ₂	1,9	101,0°	109,5°
OH ₂ ...OOC-AO	1,6	144,7°	120°
Ser353-OH...OOC-AO	1,9	110,3°	120°
Tyr385-C=O...H ₂ O	1,8	130,8°	120°
OH ₂ ...OOC-AO	2,1	88,7°	120°

HÂY_{obs} e HÂY_{prev} referem-se, respectivamente, aos ângulo HÂY observado e previsto conforme a hibridação do átomo A, sendo que H (átomo de hidrogênio), A (átomo aceptor) e Y (átomo ligado por covalência ao aceptor).

V.3.3 – Complexos de AU com COX-1

Conforme TABELAS 8-11 e FIGURAS 15-18, os complexos de 1DIY e 2OYE formados com as orientações 1 de AU, apesar de terem demonstrado interações distintas no *docking* inicial feito com os monômeros obtidos do PDB, convergiram para interações semelhantes durante a simulação de DM. Em ambos complexos o carboxilato de AU interagiu por ligação de hidrogênio com a hidroxila de fenol de Tyr385 e com uma molécula de água, além de ter interagido com as hidroxilas de Tyr348 e Ser530 nos complexos formados com 1DIY e 2OYE, respectivamente. No complexo da orientação 1 de AU com 2OYE, a hidroxila em C-3 do ligante interagiu por ligação de hidrogênio com uma molécula de água presente na base do sítio, ausente no complexo formado com 1DIY (Figura 3). Ao se comparar os complexos da orientação 1 de AU com 1DIY e 2OYE quanto às interações por ligação de hidrogênio, observa-se que o complexo formado com 1DIY apresenta interações mais estáveis do que aquele formado com 2OYE, o que não pressupõe que seja um complexo mais estável dado que o sítio é lipofílico. Nos complexos de 1DIY e 2OYE formados com as orientações 2 de AU foram verificadas interações muito diferentes entre si conforme já havia sido verificado no *docking* devido aos posicionamentos distintos do ligante. Em 2OYE, o carboxilato da orientação 2 de AU interagiu por ligação de hidrogênio mediada por água com os grupos guanidina de Arg79, Arg120 e com a carbonila de Arg79, enquanto a hidroxila em C-3 do ligante interagiu por ligação de hidrogênio com a carbonila de Ile523. No complexo de 1DIY com a orientação 2 de AU foram observadas interações por ligação de hidrogênio do carboxilato do ligante com o grupo amida da cadeia lateral de Gln358, com a hidroxila de Ser353 e com água, enquanto a hidroxila em C-3 do ligante interagiu por ligação de hidrogênio com a hidroxila de fenol de Tyr385. Em ambos os complexos da orientação 2 de AU com 1DIY e 2OYE foi observada a presença de moléculas de água próximas ao carboxilato do ligante, mas apenas o complexo formado com 2OYE indicou a presença de água próxima à hidroxila em C-3. É possível afirmar, conforme distâncias e ângulos HÂY, que as interações por ligações de hidrogênio observadas no complexo formado entre a orientação 2 de 1DIY são mais estáveis do que aquelas observadas no complexo formado entre a orientação 2 de AU e 2OYE; entretanto, esse complexo apresenta um número maior de interações mediadas por água do que aquele. Considerando que nos quatro complexos mencionados não houve saída do ligante do sítio durante os 15,2 ns de simulação e que as interações por ligação de hidrogênio ocorrem em número e estabilidade variada, não é possível definir qual é a orientação mais favorável de AU no sítio de COX-1.

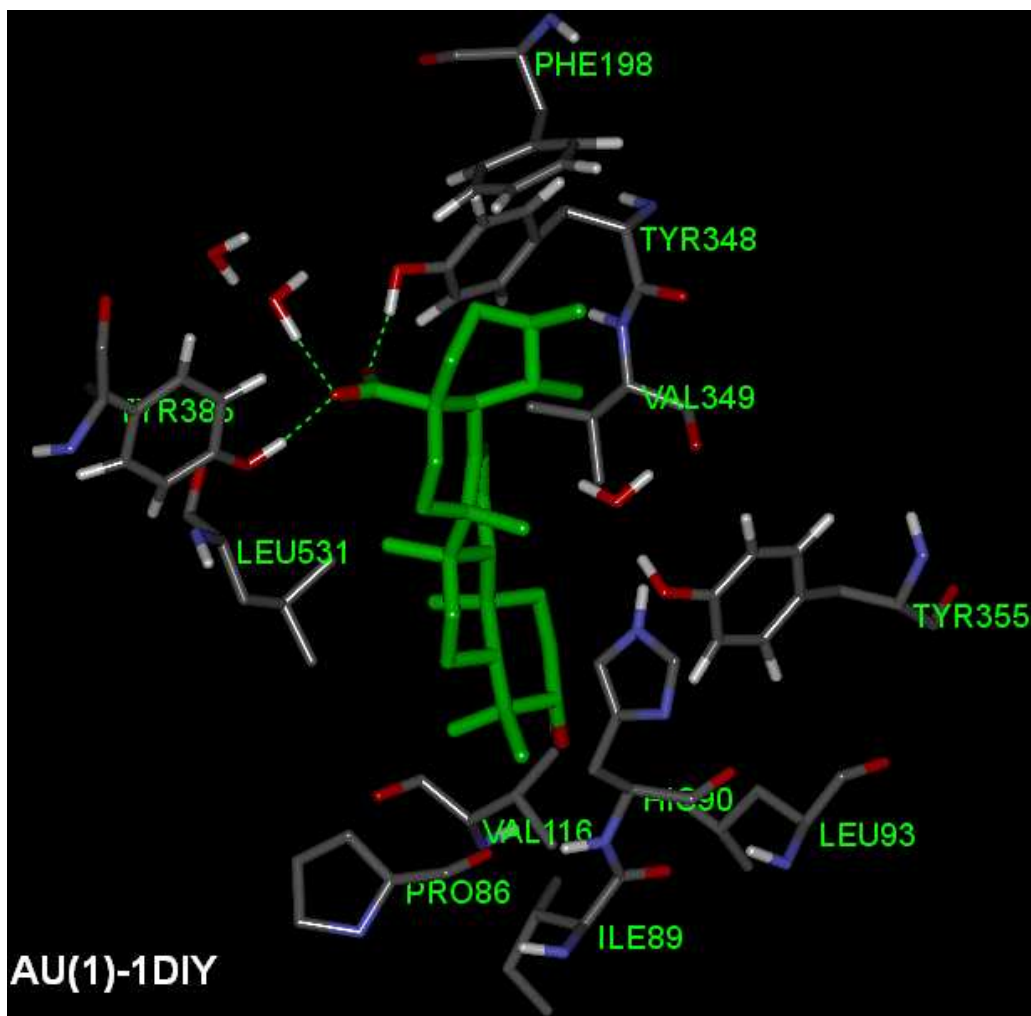


FIGURA 15: Orientação 1 de AU complexada ao sítio ativo de COX-1 (1DIY) após 15,2 ns de DM. As interações por ligação de hidrogênio estão explicitadas em pontilhado verde e apenas os resíduos próximos ao ligante são apresentados, mas alguns foram removidos para melhor visualização do complexo. $\Delta G_{bind} = -12,7 \text{ kcal.mol}^{-1}$, calculado pelo *redocking*.

TABELA 8: Interações por ligação de hidrogênio do complexo mostrado na FIGURA 15.

Interação por Ligação de Hidrogênio	Distância H...A (Å)	Ângulo HÂY _{obs}	Ângulo HÂY _{prev}
Tyr385-OH...OOC-AU	1,7	129,7°	120°
Tyr348-OH...OOC-AU	1,6	116,3°	120°
OH ₂ ...OOC-AU	1,9	90,9°	120°

HÂY_{obs} e HÂY_{prev} referem-se, respectivamente, aos ângulo HÂY observado e previsto conforme a hibridação do átomo A, sendo que H (átomo de hidrogênio), A (átomo aceptor) e Y (átomo ligado por covalência ao aceptor).

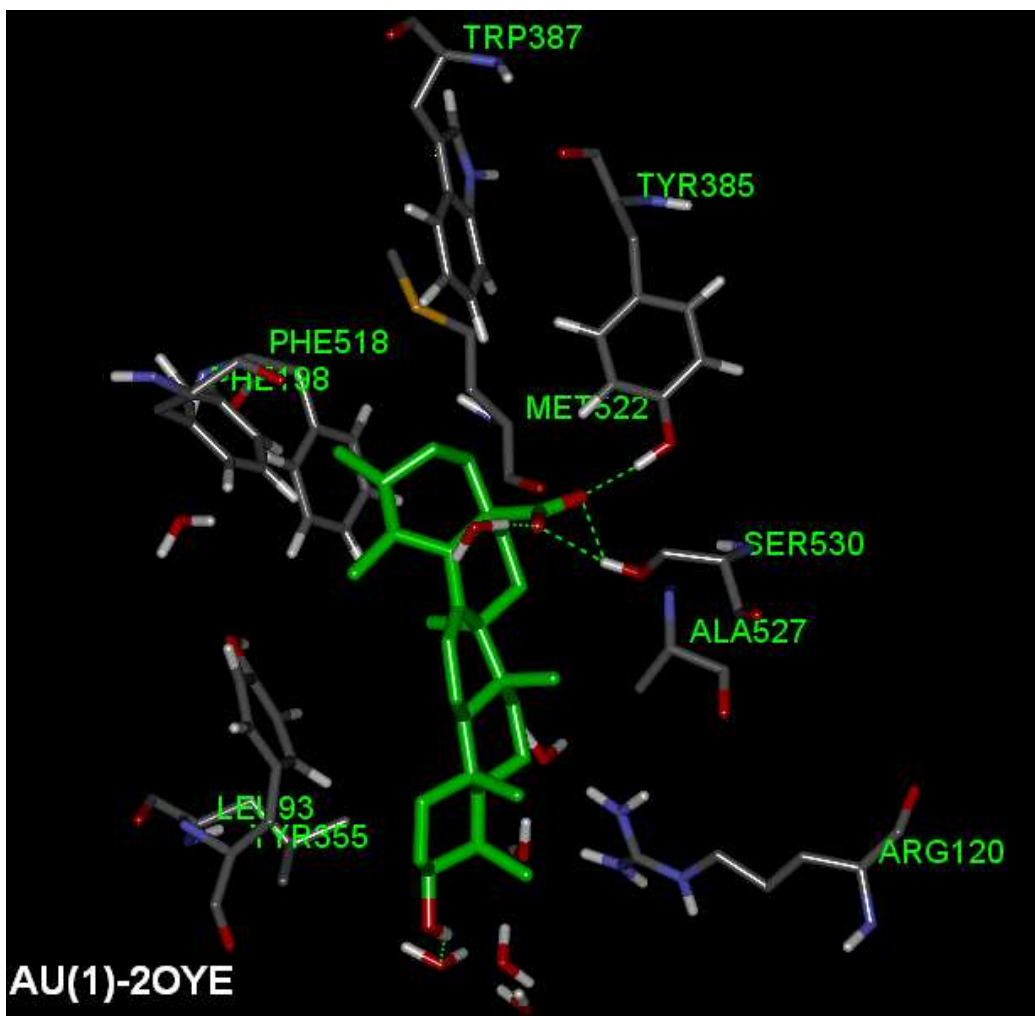


FIGURA 16: Orientação 1 de AU complexada ao sítio ativo de COX-1 (2OYE) após 15,2 ns de DM. As interações por ligação de hidrogênio estão explicitadas em pontilhado verde e apenas os resíduos próximos ao ligante são apresentados, mas alguns foram removidos para melhor visualização do complexo. $\Delta G_{bind} = -10,6 \text{ kcal.mol}^{-1}$, calculado pelo *redocking*.

TABELA 9: Interações por ligação de hidrogênio do complexo mostrado na FIGURA 16.

Interação por Ligação de Hidrogênio	Distância H...A (Å)	Ângulo HÂY _{obs}	Ângulo HÂY _{prev}
Tyr385-OH...OOC-AU	1,7	148,5°	120°
Ser530-OH...OOC-AU	2,0	79,1°	120°
OH ₂ ...OOC-AU	2,2	152,8°	120°
OH ₂ ...OH-AU	1,8	86,9°	109,5°

HÂY_{obs} e HÂY_{prev} referem-se, respectivamente, aos ângulo HÂY observado e previsto conforme a hibridação do átomo A, sendo que H (átomo de hidrogênio), A (átomo aceptor) e Y (átomo ligado por covalência ao aceptor).

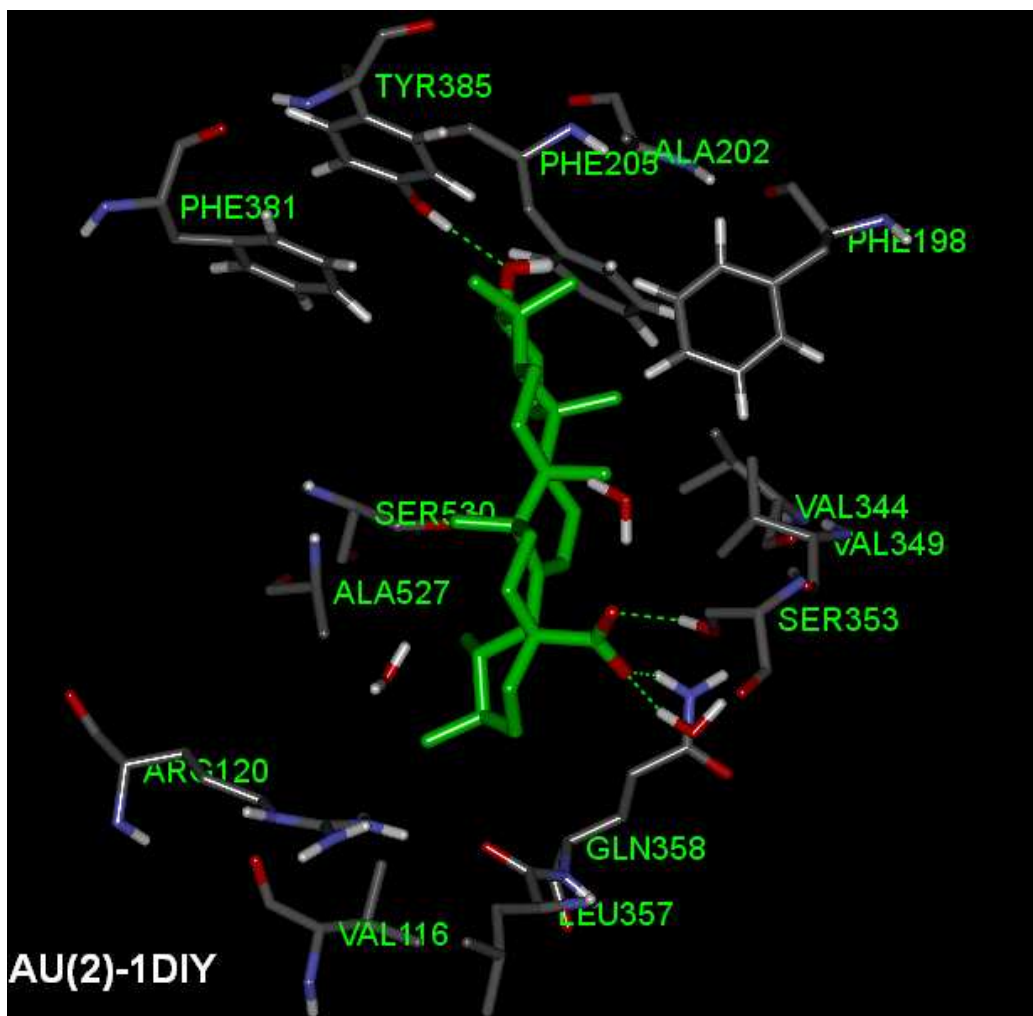


FIGURA 17: Orientação 2 de AU complexada ao sítio ativo de COX-1 (1DIY) após 15,2 ns de DM. As interações por ligação de hidrogênio estão explicitadas em pontilhado verde e apenas os resíduos próximos ao ligante são apresentados, mas alguns foram removidos para melhor visualização do complexo. $\Delta G_{bind} = -12,1 \text{ kcal.mol}^{-1}$, calculado pelo *redocking*.

TABELA 10: Interações por ligação de hidrogênio do complexo mostrado na FIGURA 17.

Interação por Ligação de Hidrogênio	Distância H...A (Å)	Ângulo HÂY _{obs}	Ângulo HÂY _{prev}
Gln358-NH ₂ ...OOC-AU	1,9	138,6°	120°
Ser353-OH...OOC-AU	1,8	114,4°	120°
Tyr385-OH...OH-AU	1,9	116,4°	109,5°
OH ₂ ...OOC-AU	1,6	117,7°	120°

HÂY_{obs} e HÂY_{prev} referem-se, respectivamente, aos ângulo HÂY observado e previsto conforme a hibridação do átomo A, sendo que H (átomo de hidrogênio), A (átomo aceptor) e Y (átomo ligado por covalência ao aceptor).

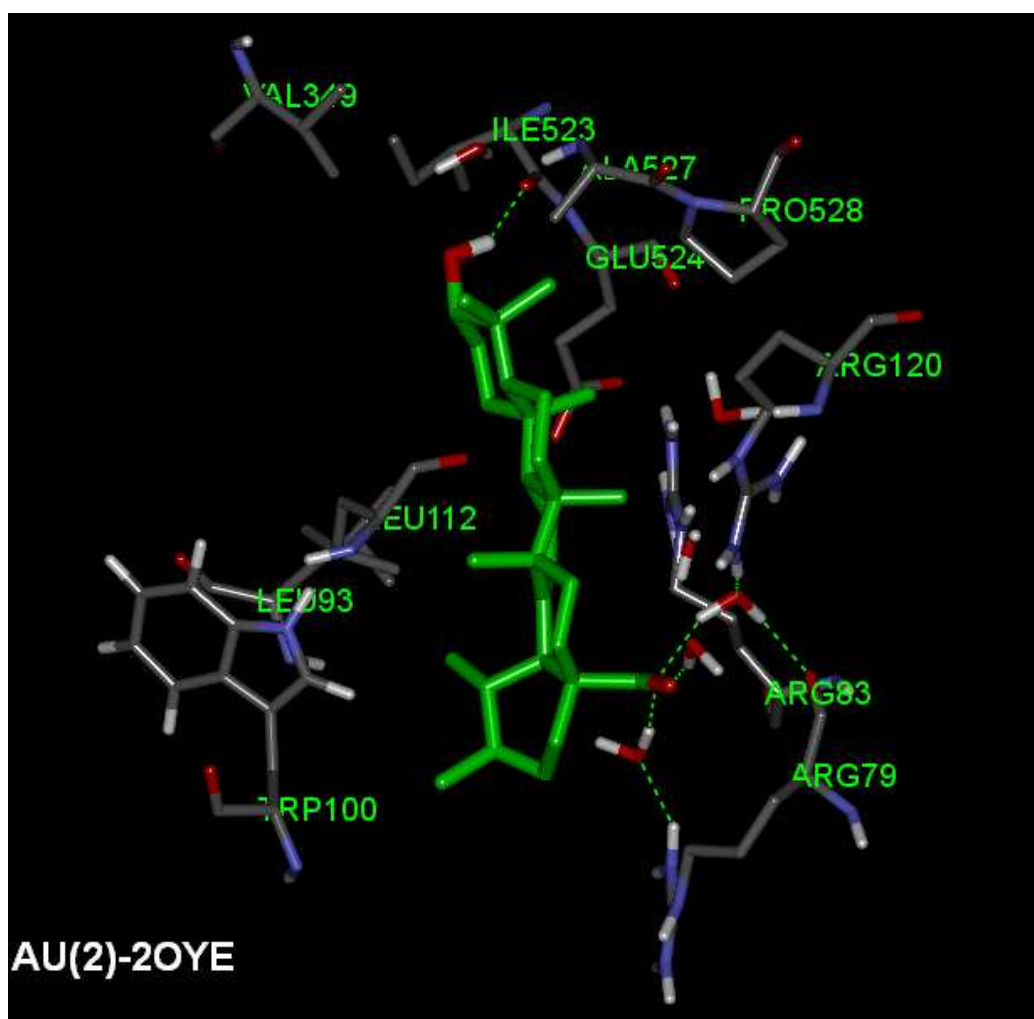


FIGURA 18: Orientação 2 de AU complexada ao sítio ativo de COX-1 (2OYE) após 15,2 ns de DM. As interações por ligação de hidrogênio estão explicitadas em pontilhado verde e apenas os resíduos próximos ao ligante são apresentados, mas alguns foram removidos para melhor visualização do complexo. $\Delta G_{bind} = -10,9 \text{ kcal.mol}^{-1}$, calculado pelo *redocking*.

TABELA 11: Interações por ligação de hidrogênio do complexo mostrado na FIGURA 18.

Interação por Ligação de Hidrogênio	Distância H...A (Å)	Ângulo HÂY _{obs}	Ângulo HÂY _{prev}
Arg79-NH ₂ ...OH ₂	2,0	126,9°	109,5°
OH ₂ ...OOC-AU	1,8	129,5°	120°
Arg120-NH ₂ ...OH ₂	1,8	91,2°	109,5°
OH ₂ ...OOC-AU	1,9	93,0°	120°
Arg79-C=O...H ₂ O	1,9	131,6°	120°
OH ₂ ...OOC-AU	1,9	93,0°	120°
Ile523-C=O...HO-AU	1,8	131,5°	120°

HÂY_{obs} e HÂY_{prev} referem-se, respectivamente, aos ângulo HÂY observado e previsto conforme a hibridação do átomo A, sendo que H (átomo de hidrogênio), A (átomo aceptor) e Y (átomo ligado por covalência ao aceptor).

V.3.4 – Complexos de AU com COX-2

Conforme TABELAS 12-14 e FIGURA 19-21, no complexo de 4COX com a orientação 1' foram observadas interações por ligação de hidrogênio entre as hidroxilas do ligante e de Ser353 e entre o carboxilato do ligante e as hidroxilas de fenol de Tyr348 e Tyr385. Com a orientação 1, foram observadas interações por ligação de hidrogênio do grupo carboxilato do ligante com água, com o grupo guanidina de Arg120 e com a carbonila de Val523 através de uma molécula de água. A hidroxila em C-3 do ligante interagiu com a carbonila de Val99 (interação fraca, conforme o ângulo HÂY) e com uma molécula de água. Neste complexo o ligante distanciou-se muito do ápice do sítio e interagiu com os resíduos da superfície protéica Val99, Trp100 e Val103, o que é uma desvantagem para a inibição da enzima e indica uma possível saída do ligante do sítio ativo durante a simulação. No complexo da orientação 2 com 4COX foram observadas interações por ligação de hidrogênio do carboxilato do ligante com as hidroxilas de Tyr355 (interação fraca, conforme o ângulo HÂY) e Ser353 e da hidroxila em C-3 do ligante com a hidroxila de fenol de Tyr385. Foi verificada a presença de moléculas de água próximas ao ligante na região do grupo carboxilato, que se aproximou da entrada do bolso de seletividade (Ser353). Comparando-se apenas as orientações 1' e 2 quanto às interações por ligação de hidrogênio, já que a orientação 1 demonstrou-se instável no sítio, pode-se verificar que a orientação 1' interagiu mais fortemente com COX-2, o que não confirma que esta seja a orientação mais provável devido à característica lipofílica do sítio. Comparando-se os resultados obtidos nos *redockings* de COX-2 com AO (conforme item V.3.3) e AU, nota-se que a orientação 1 desses ligantes afastou-se do sítio ativo em ambos os complexos.

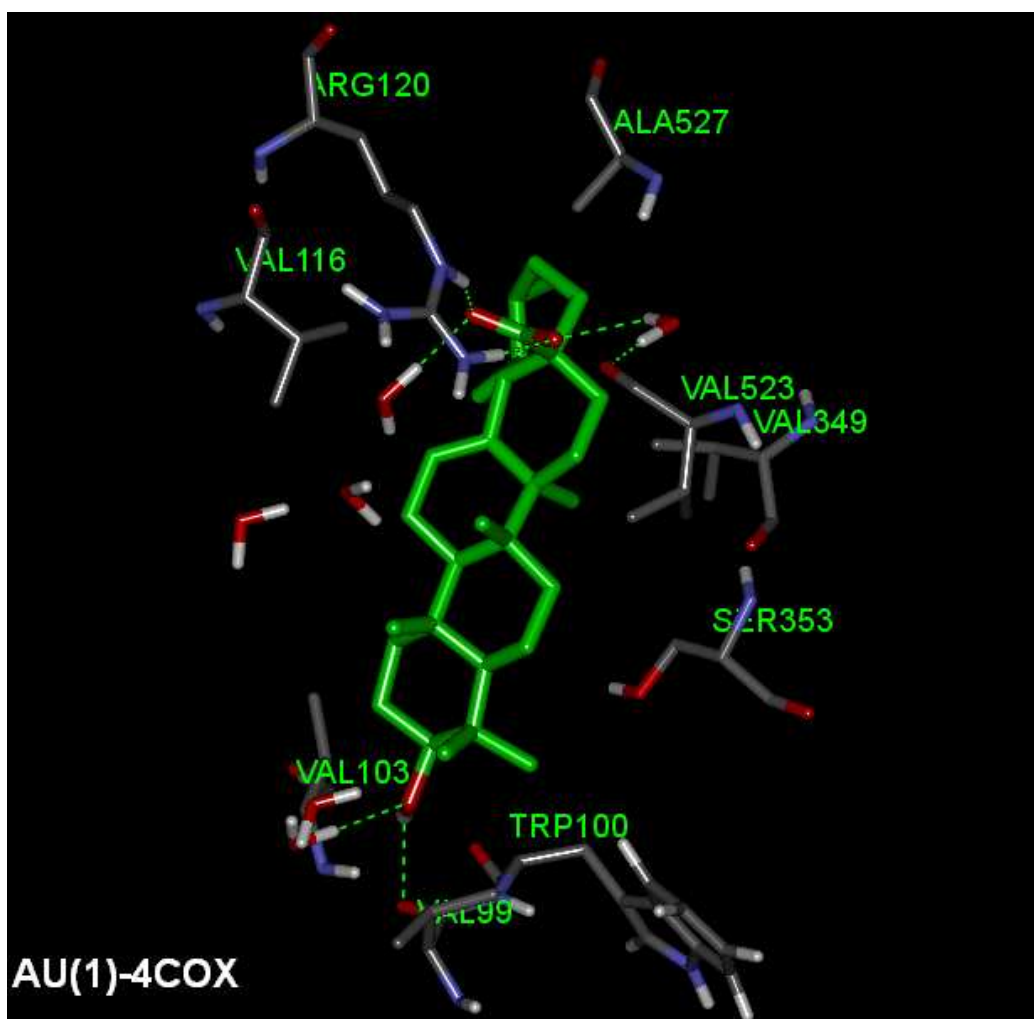


FIGURA 19: Orientação 1 de AU complexada ao sítio ativo de COX-2 (4COX) após 15,2 ns de DM. As interações por ligação de hidrogênio estão explicitadas em pontilhado verde e apenas os resíduos próximos ao ligante são apresentados, mas alguns foram removidos para melhor visualização do complexo. $\Delta G_{bind} = -12,9 \text{ kcal.mol}^{-1}$, calculado pelo *redocking*.

TABELA 12: Interações por ligação de hidrogênio do complexo mostrado na FIGURA 19.

Interação por Ligação de Hidrogênio	Distância H...A (Å)	Ângulo HÂY _{obs}	Ângulo HÂY _{prev}
Arg120-NH...OOC-AU	1,8	104,4°	120°
Arg120-NH ₂ ...OOC-AU	2,0	108,1°	120°
Val523-C=O...H ₂ O	1,6	116,1°	120°
OH ₂ ...OOC-AU	2,3	108,8°	120°
Val99-C=O...HO-AU	2,2	85,2°	120°
OH ₂ ...OOC-AU	2,1	104,9°	120°

HÂY_{obs} e HÂY_{prev} referem-se, respectivamente, aos ângulo HÂY observado e previsto conforme a hibridação do átomo A, sendo que H (átomo de hidrogênio), A (átomo aceptor) e Y (átomo ligado por covalência ao aceptor).

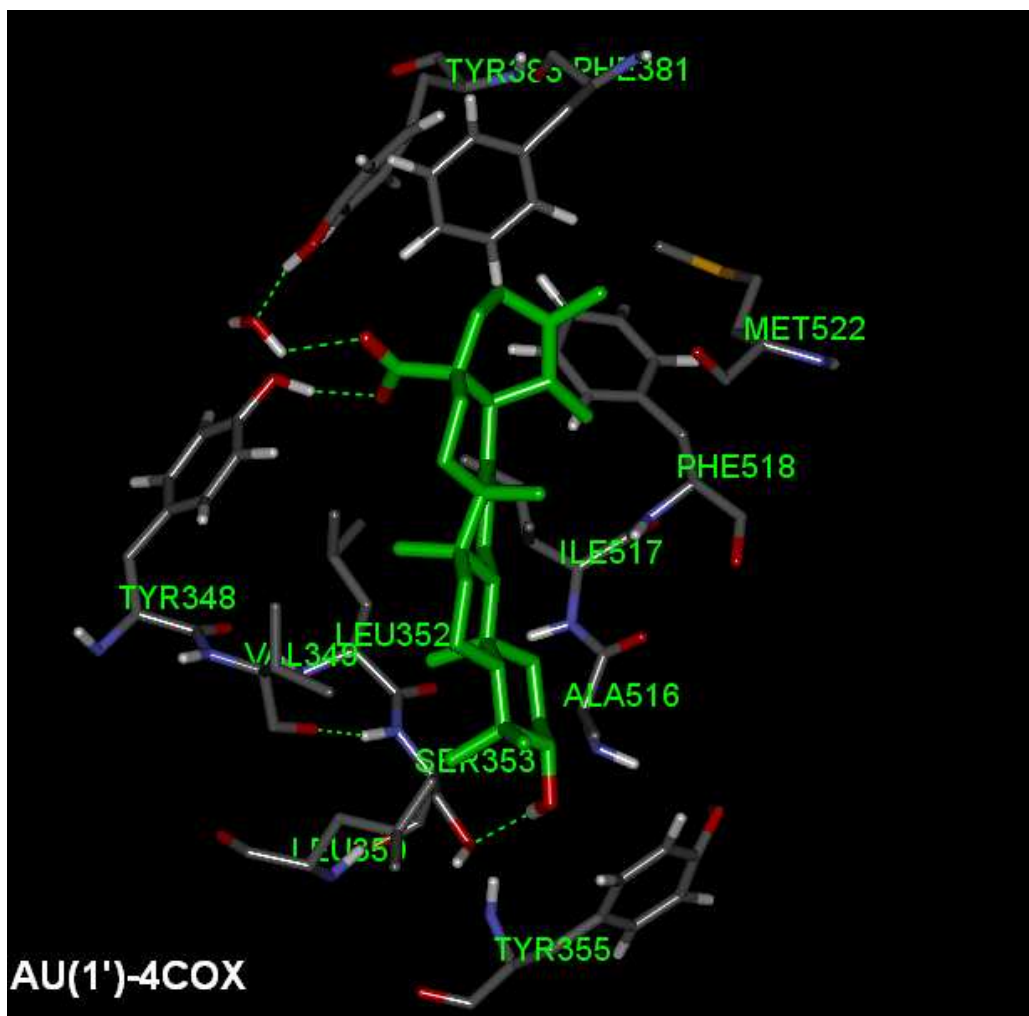


FIGURA 20: Orientação 1' de AU complexada ao sítio ativo de COX-2 (4COX) após 15,2 ns de DM. As interações por ligação de hidrogênio estão explicitadas em pontilhado verde e apenas os resíduos próximos ao ligante são apresentados, mas alguns foram removidos para melhor visualização do complexo. $\Delta G_{bind} = -12,6 \text{ kcal.mol}^{-1}$, calculado pelo *redocking*.

TABELA 13: Interações por ligação de hidrogênio do complexo mostrado na FIGURA 20.

Interação por Ligação de Hidrogênio	Distância H...A (Å)	Ângulo HÂY _{obs}	Ângulo HÂY _{prev}
Ser353-O(H)...HO-AU	2,1	85,0°	109,5°
Tyr348-OH...OH-AU	1,9	118,5°	109,5°
Tyr385-OH...OH ₂	2,0	109,7°	109,5°
OH ₂ ...OOC-AU	2,2	114,5°	120°

HÂY_{obs} e HÂY_{prev} referem-se, respectivamente, aos ângulo HÂY observado e previsto conforme a hibridação do átomo A, sendo que H (átomo de hidrogênio), A (átomo aceptor) e Y (átomo ligado por covalência ao aceptor).

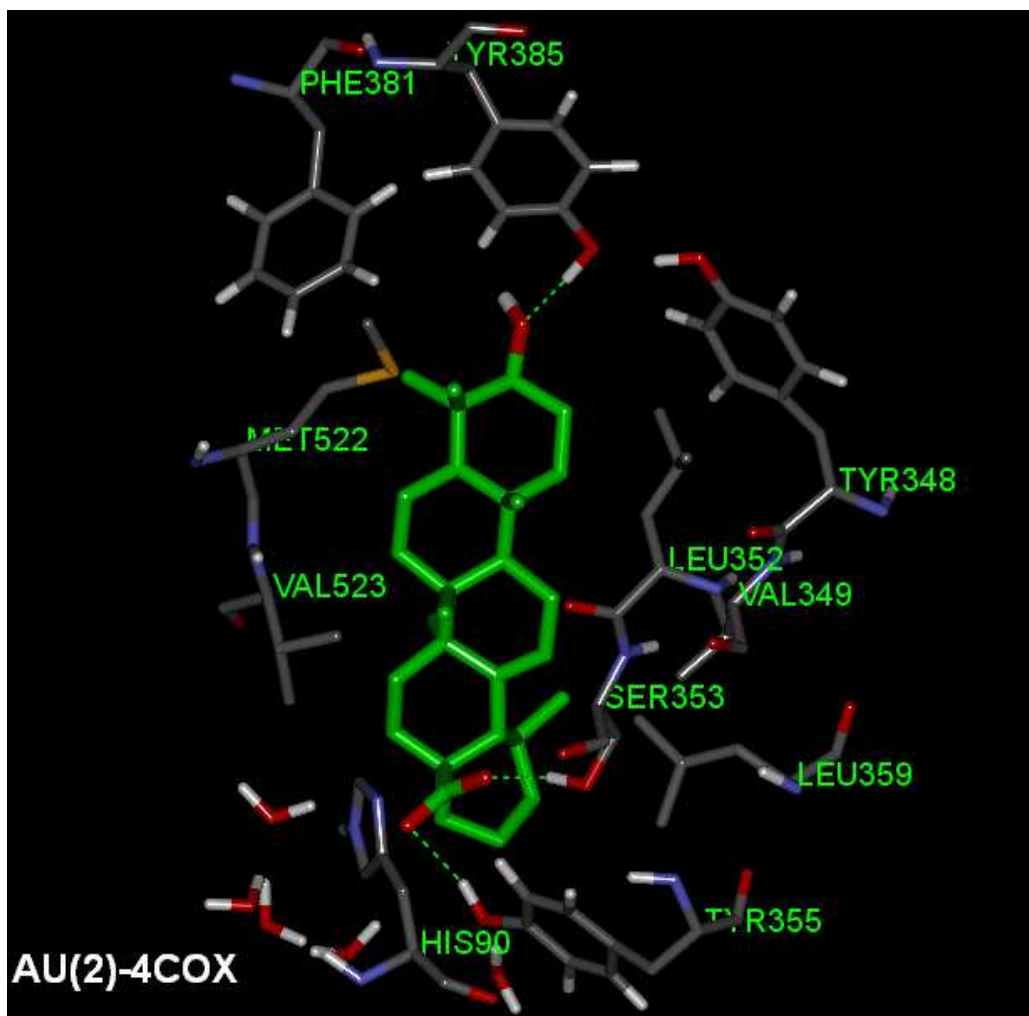


FIGURA 21: Orientação 2 de AU complexada ao sítio ativo de COX-2 (4COX) após 15,2 ns de DM. As interações por ligação de hidrogênio estão explicitadas em pontilhado verde e apenas os resíduos próximos ao ligante são apresentados, mas alguns foram removidos para melhor visualização do complexo. $\Delta G_{bind} = -10,8 \text{ kcal.mol}^{-1}$, calculado pelo *redocking*.

TABELA 14: Interações por ligação de hidrogênio do complexo mostrado na FIGURA 21.

Interação por Ligação de Hidrogênio	Distância H...A (Å)	Ângulo $\hat{H}\hat{A}Y_{obs}$	Ângulo $\hat{H}\hat{A}Y_{prev}$
Tyr355-OH...OOC-AU	2,0	84,2°	120°
Ser353-OH...OOC-AU	1,6	147,7°	120°
Tyr385-OH...OOC-AU	1,9	104,6°	120°

$\hat{H}\hat{A}Y_{obs}$ e $\hat{H}\hat{A}Y_{prev}$ referem-se, respectivamente, aos ângulo $\hat{H}\hat{A}Y$ observado e previsto conforme a hibridação do átomo A, sendo que H (átomo de hidrogênio), A (átomo aceptor) e Y (átomo ligado por covalência ao aceptor).

VI. CONCLUSÕES

Através dos *dockings* com monômeros rígidos de isoformas COX, não foi possível determinar o modo de interação dos triterpenoides AO e AU com as referidas isoformas. Os resultados provenientes da trajetória de 15,2 ns de DM mostraram que, em vários complexos, os principais resíduos das isoformas COX que interagem por ligações de hidrogênio estáveis com os grupos carboxilato de AO e AU são Arg120, Tyr355, Ser 530 e Tyr385, e que os principais resíduos que interagem com as hidroxilas em C-3 dos triterpenoides são Ser353, Tyr348 e Tyr385, comumente relatados em artigos de *docking* e DM de ligantes diversos com COX. Observou-se, também, a importância das moléculas de água para a estabilização dos grupos polares de AO e AU em todos os complexos, mediando interações por ligação de hidrogênio com os resíduos de aminoácidos, inclusive. Em alguns complexos, principalmente de COX-2, os grupos carboxilato ou hidroxila dos triterpenoides, passíveis de modificação por semi-síntese, aproximaram-se da cavidade de seletividade mais acessível em COX-2 do que em COX-1, o que é importante para o planejamento de inibidores COX-2-seletivos. Pode-se afirmar também que a orientação 1 de ambos os ligantes no sítio ativo de COX-2 é energeticamente desfavorável quando comparada às orientações 1' e 2; logo, AO interage com COX-2 com orientação do tipo 2, o que talvez não ocorra com AU porque este ligante pode interagir com COX-2 através das orientações 1' ou 2. Em relação aos complexos de COX-1, merece destaque o fato de os complexos da orientação 1 de AU com 2OYE e 1DIY, diferentes entre si na estrutura obtida pelo *docking*, terem convergido para interações semelhantes durante o tempo de simulação. A função de pontuação empírica empregada não foi satisfatória para a previsão das orientações e conformações mais favoráveis dos ligantes nos sítios ativos. Em suma, os resultados obtidos neste trabalho forneceram subsídios importantes para a proposição do modo de interação dos triterpenoides ácidos oleanólico e ursólico com as isoformas da ciclooxigenase, principalmente a COX-2.

VII. PERSPECTIVAS

Como perspectivas para a continuidade desse trabalho, propõem-se estudos de energia livre de perturbação (FEP) para o cálculo mais acurado das energias livres de *binding* dos complexos, o prolongamento das trajetórias da DM para avaliar a permanência e estabilidade das orientações dos triterpenoides nos sítios de COX e a proposição de derivados semi-sintéticos a partir destes ligantes para favorecer atividade COX-2-seletiva.

VIII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACCELRY'S SOFTWARE INC.; Discovery *Studio Modeling Environment, Release 2.5*; San Diego: Accelrys Software Inc., 2009.

ADAMSOM, A. W. *A textbook of physical chemistry*. London: Academic Press, 1986.

ALEX, A. A. Quantum Mechanical Calculations in Medicinal Chemistry: Relevant Method or a Quantum Leap Too Far? In TAYLOR, J. B.; TRIGGLE, D. J. *Comprehensive Medicinal Chemistry II. Volume 4: Computer-Assisted Drug Design*. Oxford: Elsevier, cap. 16, 2006.

ALONSO, H.; BLIZNYUK, A. A.; GREASY, J. E. Combining Docking and Molecular Dynamics Simulations in Drug Design. *Med. Res. Rev.*, vol. 26, p. 531-568, 2006.

ATHIKOMKULCHAI, S.; PRAWAT, H.; THASANA, N.; RUANGRUNGSI, N.; RUCHIRAWAT, S. COX-1, COX-2 Inhibitors and Antifungal Agents from *Croton hutchinsonianus*. *Chem. Pharm. Bull.*, v. 54, p. 262-264, 2006.

BERENDSEN, H. J. C.; GRIGERA, J. R.; STRAATSMA, T. P. The Missing Term in Effective Pair Potentials. *J. Phys. Chem.*, v. 91, p. 6269-6271, 1987.

BERENDSEN, H. J. C.; POSTMA, J. P. M.; van GUNSTEREN, W. F.; DINOLA, A.; HAAK, J. R. Molecular dynamics with coupling to an external bath. *J. Chem. Phys.*, v. 81, p. 3684-3690, 1984.

BERGSTRÖM, S.; DANIELSSON, H.; SAMUELSSON, B. The enzymatic formation of prostaglandin E2 from arachidonic acid. *Biochim. Biophys. Acta*, v. 90, p. 207-210, 1964.

BERMAN, H. M.; WESTBROOK, J.; FENG, Z.; GILLILAND, G.; BHAT, T. N.; WEISSIG, H.; SHINDYALOV, I. N.; BOURNE, P. E. The Protein Data Bank. *Nucl. Acids Res.*, v. 28, p. 235-242, 2000. Disponível em www.pdb.org. Acesso em novembro/2010.

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

BOTTING, R. M. Cyclooxygenase: past, presente and future. A tribute to John R. Vane (1927-2004). *J. Therm. Biol.*, v. 31, p. 208-219, 2006.

BRESALIER R. S.; SANDLER R. S.; QUAN, H.; BOLOGNESE, J. A.; STAT, M.; OXENIUS, B.; HORGAN, K.; LINES, C.; RIDDELL, R.; MORTON, D.; LANAS, A.; KONSTAM, M. A.; BARON, J. A. Cardiovascular events associated with rofecoxib in a colorectal adenoma chemoprevention trial. *N. Engl. J. Med.*, v. 352, p. 1092-1102, 2005.

BROOIJMANS, N.; KUNTZ, I. D. Molecular recognition and docking algorithms. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, v. 32, p. 335-373, 2003.

BURKE, A.; SMYTH, E.; FITZGERALD, G. A. Analgésicos-Antipiréticos; Farmacoterapia da Gota. In: BRUTON, L. L.; LAZO, J. S.; PARKER, K. L. *Goodman & Gilman: As Bases Farmacológicas da Terapêutica*. Rio de Janeiro: McGraw-Hill, cap. 26, 2006.

CHADRASEKHARAN, N. V.; DAI, H.; ROOS, K. L. T.; EVANSON, N. K.; TOMSIK, J.; ELTON, T. S.; SIMMONS, D. L. Cox-3, a cyclooxygenase-1 variant inhibited by acetaminophen and other analgesic/antipyretic drugs: cloning, structure, and expression. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, v. 99, p. 13926-13931, 2002.

COPELAND, R. A. *Evaluation of Enzyme Inhibitors in Drug Discovery: A Guide for Medicinal Chemists and Pharmacologists*. Hoboken: John Wiley & Sons, 2005.

CORRÊA, C. M.; PAULA, A. F.; SILVA, G. M. S.; SANT'ANNA, C. M. R.; FRAGA, C. A. M.; BARREIRO, E. J. The Molecular Basis of COX-2 versus COX-1 Selectivity of Lumiracoxib by Molecular Docking Studies. *Lett Drug Des. Discov.*, v. 4., p. 422-425, 2007.

DANNHARDT, G.; KIEFER, W. Cyclooxygenase inhibitors - current status and future prospects. *Eur. J. Med. Chem.*, v. 36, p. 109-126, 2001.

DARDEN, T.; YORK, D.; PEDERSEN, L. Particle mesh Ewald: An $N \cdot \log(N)$ method for Ewald sums in large systems. *J. Chem. Phys.*, v. 98, p. 10089-10092, 1993.

DAURA, X.; MARK, A. E.; van GUNSTEREN, W. F. Parametrization of Aliphatic CH United n Atoms of GROMOS96 Force Field. *J. Comput. Chem.*, v. 19, p 535-547, 1998.

DEPPMEIER, B. J.; DRIESSEN, A. J.; HEHRE, W. J.; JOHNSON, J. A.; KLUNZINGER, P. E.; WATANABE, M.; YU, J. *PC Spartan Pro v6.0.6*; Wavefunction Inc., USA, 2000.

DEWAR M. J. S.; ZOEBSCH, E. G.; HEALY, E. F.; STEWART, J. J. P. AM1: A New General Purpose Quantum Mechanical Model. *J. Am. Chem. Soc.*, v. 107, p. 3902-3909, 1985.

DOOUT, J. P.; WEBER, J.; *Computer-Aided Molecular Design – Theory and Applications*. London: Academic Press, 1997.

ELBER, R.; GHOSH, A.; CÁRDENAS, A. Long time dynamics of complex systems. *Acc. Chem. Res.*, v. 35, p. 396-403, 2002.

FISCHER, E. Einfluss der Configuration auf die Wirkung der Enzyme. *Ber. Dt. Chem. Ges.*, v. 27, p. 2985-2993, 1894.

FITZGERALD G. A. Cardiovascular pharmacology of nonselective nonsteroidal anti-inflammatory drugs and coxibs: clinical considerations. *Am. J. Cardiol.*, v. 89, p. 26D-32D, 2002.

FITZGERALD, G. A. Cox-2 and beyond: approaches to prostaglandin inhibition in human disease. *Nat. Rev. Drug. Discov.*, v. 2, p. 879-890, 2003.

FRISCH, M. J.; TRUCKS, G. W.; SCHLEGEL, H. B.; SCUSERIA, G. E.; ROBB, M. A.; CHEESEMAN, J. R.; MONTGOMERY JR., J. A.; VREVEN, T.; KUDIN, K. N.; BURANT, J. C.; MILLAM, J. M.; IYENGAR, S. S.; TOMASI, J.; BARONE, V.; MENNUCCI, B.; COSSI, M.; SCALMANI, G.; REGA, N.; PETERSSON, G. A.; NAKATSUJI, H.; HADA, M.; EHARA, M.; TOYOTA, K.; FUKUDA, R.; HASEGAWA, J.; ISHIDA, M.; NAKAJIMA, T.; HONDA, Y.; KITAO, O.; NAKAI, H.; KLENE, M.; LI, X.; KNOX, J. E.; HRATCHIAN, H. P.; CROSS, J. B.; ADAMO, C.; JARAMILLO, J.; GOMPERS, R.; STRATMANN, R. E.; YAZYEV, O.; AUSTIN, A. J.; CAMMI, R.; POMELLI, C.; OCHTERSKI, J. W.; AYALA, P. Y.; MOROKUMA, K.; VOTH, G. A.; SALVADOR, P.; DANNENBERG, J. J.; ZAKRZEWSKI, V. G.; DAPPRICH, S.; DANIELS, A. D.; STRAIN, M. C.; FARKAS, O.; MALICK, D. K.; RABUCK, A. D.;

RAGHAVACHARI, K.; FORESMAN, J. B.; ORTIZ, J. V.; CUI, Q.; BABOUL, A. G.; CLIFFORD, S.; CIOSLOWSKI, J.; STEFANOV, B. B.; LIU, G.; LIASHENKO, A.; PISKORZ, P.; KOMAROMI, I.; MARTIN, R. L.; FOX, D. J.; KEITH, T.; AL-LAHAM, M. A.; PENG, C. Y.; NANAYAKKARA, A.; CHALLACOMBE, M.; GILL, P. M. W.; JOHNSON, B.; CHEN, W.; WONG, M. W.; GONZALEZ, C.; POPLE, J. A.; *Gaussian 03 Revision-B.03*; Gaussian, Inc., USA, 2003.

GANI, O. A. B. S. M. Signposts of Docking and Scoring in Drug Design. *Chem. Biol. Drug Des.*, v. 70, p. 360-365, 2007.

GASTEIGER, J.; MARSILI, M. Iterative partial equalization of orbital electronegativity – a rapid access to atomic charges. *Tetrahedron*, v. 36, p. 3219-3228, 1980.

GEN, M.; CHENG, R. *Genetic Algorithms and Engineering Optimization*. Hoboken: John Wiley Professional, 1999.

GROSSER, T.; FRIES, S.; FITZGERALD, G. A. Biological basis for the cardiovascular consequences of COX-2 inhibition: therapeutic challenges and opportunities. *J. Clin. Invest.*, v. 116, p. 4-15, 2006.

GUEX, N.; PEITSCH, M. C. Swiss-Model and the Swiss-Pdb Viewer: an environment for comparative protein modeling. *Electrophoresis*, v. 18, p. 2714-2723, 1997. Disponível em <<http://www.expasy.org/spdbv>>. Acesso em outubro 2010.

GUPTA, K.; KAUB, C. J.; CAREY, K. N.; CASILLAS, E. G.; SELINSKY, B. S.; LOLL, P. J. Manipulation of kinetic profiles in 2-aryl propionic acid cyclooxygenase inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, v. 14, p. 667-671, 2004.

HARMAN, C. A.; TURMAN, M. V.; KOZAK, K. R.; MARNETT, L. J.; SMITH, W. L.; GARAVITO, R. M. Structural basis of enantioselective inhibition of cyclooxygenase-1 by S-alpha-substituted indomethacin ethanolamides. *J. Biol. Chem.*, v. 27, p. 28096-28105, 2007.

HEMLER, M.; LANDS, W.E. Purification of the cyclooxygenase that forms prostaglandins: demonstration of two forms of iron in the holoenzyme. *J. Biol. Chem.*, v. 251, p. 5575-5579, 1976.

HESS, B.; BEKKER, H.; BERENDSEN, H. J. C.; FRAAIJE, J. G. E. M. LINCX: A Linear Constraint Solver for Molecular Simulations. *J. Comput. Chem.*, v. 18, p. 1463-1472, 1997.

HESS, B.; KUTZNER, C.; van der SPOEL, D.; LINDAHL, E. GROMACS 4: Algorithms for Highly Efficient, Load-Balanced, and Scalable Molecular Simulation. *J. Chem. Theory Comput.*, v. 4, p. 435-447, 2008.

HOCKNEY, R. W. The potential calculation and some applications. *Meth. Comput. Phys.*, v. 9, p. 136-211, 1970.

HUEY, R.; MORRIS, G. M.; OLSON, A. J.; GOODSSELL, D. S. A Semiempirical Free Energy Force Field with Charge-Based Desolvation. *J. Comput. Chem.*, v. 28, p. 1145-1152, 2007.

HUSS, U.; RINGBOM, T.; PERERA, P.; BOHLIN, L.; VASANGE, M. Screening of Ubiquitous Plant Constituents for COX-2 Inhibition with a Scintillation Proximity Based Assay. *J. Nat. Prod.*, v. 65, p. 1517-1521, 2002.

- JAIN, A. N. Surflex: Fully Automatic Flexible Molecular Docking Using a Molecular Similarity-Based Search Engine. *J. Med. Chem.*, v. 46, p. 499-511, 2003.
- 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.* v. 267, p. 727-748, 1997.
- KARPLUS, M.; PETSKO, G. A. Molecular dynamics simulations in biology. *Nature*, v. 347, p. 631-639, 1990.
- KITCHEN, D. B.; DECORNEZ, H.; FURR, J. R.; BAJORATH, J. Docking and Scoring in Virtual Screening for Drug Discovery: Methods and Applications. *Nat. Rev. Drug Discov.*, v. 3, p. 935-949, 2004.
- KOSHLAND, D. E. Application of a Theory of Enzyme Specificity to Protein Synthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, v. 44, p. 88-104, 1958.
- KUEHN, B. M. FDA Panel: Keep COX-2 Drugs on Market. *JAMA*, v. 293, p. 1571-1572, 2005.
- KURUMBAIL, R. G.; STEVENS, A. M.; GIERSE, J. K.; McDONALD, J. J.; STEGEMAN, R. A.; PAK, J. Y.; GILDEHAUS, D.; MIYASHIRO, J. M.; PENNING, T. D.; SEIBERT, K.; ISAKSON, P. C.; STALLINGS, W. C. Structural basis for selective inhibition of cyclooxygenase-2 by anti-inflammatory agents. *Nature*, v. 384, p. 644-648, 1996.
- LEACH, A. R. Ligand-Based Approaches: Core Molecular Modeling. In TAYLOR, J. B.; TRIGGLE, D. J. *Comprehensive Medicinal Chemistry II. Volume 4: Computer-Assisted Drug Design*. Oxford: Elsevier, cap. 5, 2006.
- LEACH, A. R. *Molecular Modeling: Principles and Applications*. Harlow: Prentice Hall, 2001.
- LIU, J. Pharmacology of oleanolic acid and ursolic acid. *J. Ethnoph.*, v. 49, p. 57-68, 1995.
- LIU, J. Oleanolic acid and ursolic acid: Research perspectives. *J. Ethnoph.*, v. 100, p. 92-94, 2005.
- LUCK, W. A. P. Angles in Hydrogen Bonds. In SCHUSTER, P.; ZUNDEL, G.; SANDORFY, C. *The Hydrogen Bond: Recent developments in theory and experiments*. Amsterdam: North-Holland, cap. 11, 1976.
- MALKOWSKI, M. G.; GINELL, S. L.; SMITH, W. L.; GARAVITO, R. M. The productive conformation of arachidonic acid bound to prostaglandin synthase. *Science*, v. 289, p. 1933-1937, 2000.
- MARNETT, L. J. Recent developments in cyclooxygenase inhibition. *Prost. & other Lipid Mediators*, v. 68-69, p. 153-164, 2002.
- MARSHALL, G. R. Introduction to chemoinformatics in drug discovery – A personal view. In OPREA, T. I. *Chemoinformatics in drug discovery*. Weinheim: Wiley-VHC, 2004.
- MASFERRER, J.L.; ZWEIFEL, B.S.; SEIBERT, K.; NEEDLEMAN, P. Selective regulation of cellular cyclooxygenase by dexamethasone and endotoxin in mice. *J. Clin. Invest.*, v. 86, p. 1375-1379, 1990.

- MASHHADI, H. R.; SHANECHI, H. M.; LUCAS, C. A new genetic algorithm with Lamarckian individual learning for generation scheduling. *IEEE Trans. Power Syst.*, v. 18, p. 1181-1186, 2003.
- MITCHELL, J. A.; WARNER, T. D. COX isoforms in the cardiovascular system: understanding the activities of non-steroidal anti-inflammatory drugs. *Nat. Rev. Drug. Discov.*, v. 5, p. 75-86, 2006.
- MORRIS, G. M.; GOODSSELL, D. S.; HALLIDAY, R. S.; HUEY, R.; HART, W. E.; BELEW, R. K.; OLSON, A. J. Automated docking using a Lamarckian genetic algorithm and an empirical binding free energy function. *J. Comput. Chem.*, v. 19, p.1639-1662, 1998.
- MORRIS, G. M.; HUEY, R.; LINDSTROM, W.; SANNER, M. F.; BELEW, R. K.; GOODSSELL, D. S.; OLSON, A. J. AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated Docking with Selective Receptor Flexibility. *J. Comput. Chem.*, v. 30, p. 2785-2791, 2009.
- MUKHERJEE, D.; NISSEN S. E.; TOPOL E. J. Risk of cardiovascular events associated with selective COX-2 inhibitors. *JAMA*, v. 286, p. 954-959, 2001.
- NAMBA, A. M.; SILVA, V. B.; SILVA, C. H. T. P. Dinâmica molecular: teoria e aplicações em planejamento de fármacos. *Ecl. Quim.*, v. 33, p. 13-24, 2008.
- NUSSMEIER N. A.; WHELTON A. A.; BROWN M. T.; LANGFORD, R. M.; HOEFT, A.; PARLOW, J. L.; BOYCE, S. W.; VERBURG, K. M. Complications of the COX-2 inhibitors parecoxib and valdecoxib after cardiac surgery. *N. Engl. J. Med.*, v. 352, p. 1081-1091, 2005.
- ONODERA, K.; SATOU, K.; HIROTA, H. Evaluations of Molecular Docking Programs for Virtual Screening. *J. Chem. Inf. Model.*, v. 47, p. 1609-1618, 2007.
- PALOMER, A.; PÉREZ, J. J.; NAVEA, S.; LLORENS, O.; PASCUAL, J.; GARCÍA, L.; MAULEÓN, D. Modeling Cyclooxygenase Inhibition. Implication of Active Site Hydration on the Selectivity of Ketoprofen Analogues. *J. Med. Chem.*, v. 43, p. 2280-2284, 2000.
- PICOT, D.; LOLL, P. J.; GARAVITO, R. M. The X-ray crystal structure of the membrane protein prostaglandin H2 synthase-1. *Nature*, v. 367, p. 243-249, 1994.
- PLEWCZYNSKI, D. LAZNIEWSKI, M.; AUGUSTYNIAK, R.; GINALSKI, K. Can We Trust Docking Results? Evaluation of Seven Commonly Used Programs on PDBbind Database. *J. Comput. Chem.*, n/a., 2010. doi: 10.1002/jcc.21643
- RIMON, G.; SIDHU, R. S.; LAUVER, D. 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. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, v. 107, p. 28-33, 2010.
- RINGBOM, T.; SEGURA, L.; NOREEN, Y.; PERERA, P.; BOHLIN, L. Ursolic Acid from *Plantago major*, a Selective Inhibitor of Cyclooxygenase-2 Catalyzed Prostaglandin Biosynthesis. *J. Nat. Prod.*, v. 61, p. 1212-1215, 1998.
- ROWLINSON, S. W.; KIEFER, J. R.; PRUSAKIEWICZ, J. J.; PAWLITZ, J. L.; KOZAK, K. R.; KALGUTKAR, A. S.; STALLINGS, W. C.; KURUMBAIL, R. G.; MARNETT, L. J. A Novel Mechanism of Cyclooxygenase-2 Inhibition Involving Interactions with Ser-530 and Tyr-385. *J. Biol. Chem.*, v. 14, p. 45763-45769, 2003.

- RYCKAERT, J. P.; CICCOTTI, G.; BERENDSEN, H. J. C. Numerical integration of the cartesian equations of motion of a system with constraints: molecular dynamics of n-alkanes. *J. Comput. Phys.*, v. 23, p. 327-341, 1977.
- SAI RAM, K. V. V. M.; RAMBABU, G.; SARMA, J. A. R. P.; DESIRAJU, G. R. Ligand Coordinate Analysis of SC-558 from the Active Site to the Surface of COX-2: A Molecular Dynamics Study. *J. Chem. Inf. Model.*, v. 46, p. 1784-1794, 2006.
- SANNER, M. F.; HUEY, R.; DALLAKYAN, S.; KARNATI, S.; LINDSTROM, W.; MORRIS, G. M.; NORLEDGE, B.; OMELCHENKO, A.; STOFFLER, D.; VAREILLE, G.; *AutoDockTools v1.5.2 revision 2*; Molecular Graphics Laboratory, The Scripps Research Institute, USA, 2008.
- SCHREIBER, H.; STEINHAUSER, O. Cutoff size does strongly influence molecular dynamics results on solvated polypeptides. *Biochemistry*, v. 31, p. 5856-5860, 1992.
- SCHULER, L. D.; DAURA, X.; van GUNSTEREN, W. F. An Improved GROMOS96 Force Field for Aliphatic Hydrocarbons in the Condensed Phase. *J. Comput. Chem.*, v. 22, p. 1205-1218, 2001.
- SCHÜTTELKOPF, A. W.; van AALTEN, D. M. F. PRODRG: a tool for high-throughput crystallography of protein-ligand complexes. *Acta Cryst.*, v. D60, p. 1355-1363, 2004.
- SCHWAB, J. M.; SCHLUESENER, H. J.; MEYERMANN, R.; SERMAN, C. N. Cox-3 the enzyme and the concept: steps towards highly specialized pathways and precision therapeutics? *Prost. Leuk. Ess. Fatty Acids*, v. 69, p. 339-343, 2003.
- SELVAM, C.; JACHAK, S. M. A cyclooxygenase (COX) biflavonoid from the seeds of *Semecarpus anacardium*. *J. Ethnoph.*, v. 95, p. 209-212, 2004.
- SELVAM, C.; JACHAK, S. M.; THILAGAVATHI, R.; CHAKRABORTI, A. K. Design, synthesis, biological evaluation and molecular docking of curcumin analogues as antioxidant, cyclooxygenase inhibitory and anti-inflammatory agents. *Bioorg. Med. Chem. Let.*, v. 15, p. 1793-1797, 2005.
- SHAFFER, A. A.; WIERSCHKE, S. G. Comparison of computational methods applied to oxazole, thiazole, and other heterocyclic compounds. *J. Comput. Chem.*, v. 14, p. 75-88, 1993.
- SLATER J. C. Atomic Shielding Constants. *Phys. Rev.*, v. 36, p. 57-64, 1930.
- SMITH, P.E. & PETTIT, B.M., 1991. Peptides in ionic solutions: a comparison of the Ewald and switching function techniques. *J. Chem. Phys.*, 95, 8430-8441.
- SOLOMON S. D.; MCMURRAY J. J. V.; PFEFFER, M. A.; WITTES, J.; FOWLER, R.; FINN, P.; ANDERSON, W. F.; ZAUBER, A.; HAWK, E.; BERTAGNOLLI, M. Cardiovascular risks associated with celecoxib in a clinical trial for colorectal adenoma prevention. *N. Engl. J. Med.*, v. 352, p. 1071-1080, 2005.
- STRAND, V. Are COX-2 inhibitors preferable to non-selective non-steroidal anti-inflammatory drugs in patients with risk of cardiovascular events taking low-dose aspirin? *Lancet*, v. 370, p. 2138-2151, 2007.
- TERAMOTO, R.; FURUKUNISHI, H. Supervised Consensus Scoring for Docking and Virtual Screening. *J. Chem. Inf. Model.*, v. 47, p. 526-534, 2007.

- THOMSEN, R. Flexible ligand docking using evolutionary algorithms: investigating the effects of variation operators and local search hybrids. *Biosystems*, v. 72, p. 57-73, 2003.
- THORMANN, M.; PONS, M. Massive docking of flexible ligands using environmental niches in parallelized genetic algorithms. *J. Comput. Chem.*, v. 22, p. 1971-1982, 2001.
- van der SPOEL, D.; LINDAHL, E.; HESS, B.; van BUUREN, A. R.; APOL, E.; MEULENHOF, P. J.; TIELEMAN, D. P.; SIJBERS, A. L. T. M.; FEENSTRA, K. A.; van DRUNEN, R.; BERENDSEN, H. J. C. *Gromacs User Manual version 4.0*, 2005. Disponível em <www.gromacs.org>. Acesso em outubro 2010.
- van GUNSTEREN, W. F.; BERENDSEN, H. J. C. Algorithms for macromolecular dynamics and constraint dynamics. *Mol. Phys.*, v. 34, p. 1311-1327, 1977.
- van GUNSTEREN, W. F.; BERENDSEN, H. J. C. Computer simulation of molecular dynamics: methodology, applications and perspectives in chemistry. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, v. 29, p. 992-1023, 1990.
- VANE, J. R. Inhibition of prostaglandin synthesis as a mechanism of action for the aspirin-like drugs. *Nature*, v. 231, p. 232-235, 1971.
- VERLET, L. Computer 'experiments' on classical fluids I. Thermodynamical properties of Lennard-Jones molecules. *Phys. Rev.*, v. 159, p. 98-103, 1967.
- VERLI, H.; BARREIRO, E. J. Um paradigma da química medicinal: a flexibilidade dos ligantes e receptores. *Quim. Nova*, v. 28, p. 95-102, 2005.
- WEINER, S. J.; KOLLMAN, P. A.; CASE, D. A.; SINGH, U. C.; GHIO, C.; ALAGONA, G.; PROFETA, S.; WEINER, P. A new force field for molecular mechanical simulation of nucleic acids and proteins. *J. Am. Chem. Soc.*, v. 106, p. 765-784, 1984.
- WU, C.; WU, S.; CHUNG, W.; LIN, H.; CHEN, K.; CHEN, Y.; HSU, M.; YANG, J.; WANG, J.; LIN, C. Cyclooxygenase (COX) by Molecular Docking Analysis of Flavonoids and Lignans. *Int. J. Mol. Sci.*, v. 8, p. 830-841, 2007.
- WUBE, A. A.; WENZIG, E.; GIBBONS, S.; ASRES, K.; BAUER, R.; BUCAR, F. Constituents of the stem bark of *Discopodium penninervium* and their LTB₄ and COX-1 and COX-2 inhibitory activities. *Phytochem.*, v. 69, p. 982-987, 2008.
- ZHANG, Y.; JAYAPRAKASAM, B.; SEERAM, N. P.; OLSON, L. K.; DE WITT, D.; NAIR, M. G. Insulin Secretion and Cyclooxygenase Enzyme Inhibition by Cabernet Sauvignon Grape Skin Compounds. *J. Agric. Food Chem.*, v. 52, p. 228-233, 2004.
- ZOU, J.; JIN, D.; CHEN, W.; WANG, J.; LIU, Q.; ZHU, X.; ZHAO, W. Selective Cyclooxygenase-2 inhibitors from *Calophyllum membranaceum*. *J. Nat. Prod.*, v. 68, p. 1514-1518, 2005.