

**IDENTIFICACIÓN DE INHIBIDORES
SELECTIVOS DE LA CICLOOXIGENASA 2
MEDIANTE TÉCNICAS *in silico***

JUAN CAMILO RESTREPO VASQUEZ

**PROGRAMA DE QUÍMICA
FACULTAD DE CIENCIAS BÁSICAS**



UNIVERSIDAD DE PAMPLONA

PROGRAMA DE QUÍMICA

FACULTAD DE CIENCIAS BÁSICAS

Pamplona, JUNIO 09 2023

**IDENTIFICACIÓN DE INHIBIDORES
SELECTIVOS DE LA CICLOOXIGENASA 2
MEDIANTE TÉCNICAS *in silico***

JUAN CAMILO RESTREPO VASQUEZ

**Trabajo de grado presentado como requisito para optar al título de
QUÍMICO**

Directores:

Dr. Luis Carlos Vesga Gamboa

Doctor en química

Dr. Eliseo Amado Gonzales

Doctor en química

AGRADECIMIENTOS

A los profesores que hicieron parte de este proceso, y a la Universidad de Pamplona por facilitar mi preparación académica y personal, rodeado de la bonita cultura Pamplonesa.

Al Departamento de Química y al doctor Eliseo Amado Gonzales por sus enseñanzas como profesor y tutor de mi trabajo de grado.

A mi familia que sin ellos esto no hubiese sido posible, a ellos que fueron mi mayor motivación en este proceso.

Al doctor Luis Carlos Vesga Gamboa, mi tutor, guía y amigo, por todo el tiempo dedicado en mi formación académica; gracias a sus consejos y meticulosidad en la realización de este trabajo, me llevo herramientas valiosas para mi futuro.

A mis compañeros y amigos Leonardo Reyes, Maryoli Mendoza, Daira Pinzón, Kerly Triana, Felipe Rodríguez, Carlos Jordán, Camilo Serrano, Camilo Luque y muchas personas más que fueron importantes en mi vida universitaria.

A “Linternita” mi hija felina por todas las noches de desvelo en las que me acompaño.

LISTA DE SIGLAS

COX: Ciclooxygenasa

COX-1: Ciclooxygenasa 1

COX-2: Ciclooxygenasa 2

AINS: Antiinflamatorios no esteroideos

FDA: US Food and Drug Administration

CADD: Diseño de fármacos asistido por computadora

AMP_c: Adenosín monofosfato cíclico

ADME: Absorción, distribución, metabolismo y excreción.

MM-GBSA: Mecánica molecular generalizada Born/Área de superficie

IL: Interleucina

TNF- α : Factor de necrosis tumoral alfa

NO: Óxido nítrico

UPLC-ESI-MS: Ultra-performance liquid chromatography-electrospray ionization-mass spectrometry

NF- κ B: Factor nuclear kappa beta

TABLA DE CONTENIDO

1	INTRODUCCIÓN.....	9
2	PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	10
3	JUSTIFICACIÓN	11
4	OBJETIVOS	12
4.1	Objetivo General.....	12
4.2	Objetivos Específicos	12
5	MARCO TEÓRICO	12
5.1	Isoformas De La COX	12
5.2	Acción Catalítica De La COX.....	13
5.3	Características Estructurales De La COX-2	15
5.4	Antiinflamatorios No Esteroides (AINS)	16
5.4.1	Celecoxib Y Su Mecanismo De Acción	18
5.4.2	Metabolitos Secundarios De Plantas.....	20
5.5	Diseño De Fármacos Asistido Por Computadora (CADD)	21
5.5.1	Métodos De Diseños De Fármacos Asistidos Por Computadora.....	21
5.5.2	Absorción, Distribución, Excreción Y Metabolismo (ADME)	21
5.5.3	Modelo Farmacofórico	24
5.5.4	Docking Molecular	26
5.5.5	Dinámica Molecular (DM).....	29
5.5.6	Energía Libre	31
6	METODOLOGÍA	33
6.1	Construcción De La Base De Datos	33
6.2	Optimización De Las Estructuras Químicas De Los Ligandos	33
6.3	Modelo Farmacofórico y Virtual Screening Por El Modelo	34
6.4	Docking Molecular.....	35
6.5	Energía Libre Por El Método Mecánica Molecular Generalizada Born/Área (MM-GBSA)	36
6.6	Propiedades ADME-Tox	36
6.7	Dinámica Molecular	36
7	RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS	37

7.1	Base De Datos	37
7.2	Modelo Farmacofórico	37
7.3	Docking molecular	40
7.4	Virtual Screening de Docking Molecular	43
7.4.1	Catequina y epigallocatequina galato	46
7.4.2	Cianidina 3-α-arabinósido	47
7.4.3	Helioxantina	48
7.4.4	5,7-dihidroxi flavonas	48
7.5	Energía Libre Por El Método MM-GBSA De Las Poses Obtenidas Mediante Docking Molecular	51
7.6	Propiedades ADME-Tox	57
7.7	Dinámica Molecular	58
8	CONCLUSIONES	68
9	RECOMENDACIONES	68
10	DIVULGACION DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS	69
11	BIBLIOGRAFIA	69
12	ANEXOS	81

IDENTIFICACIÓN DE INHIBIDORES SELECTIVOS DE LA CICLOOXIGENASA 2 EDIANTE TÉCNICAS *In silico*

Resumen: Procesos inflamatorios llevados a cabo durante la progresión de patologías como la artritis, osteoartritis, hiperplasia prostática, cáncer, entre otras, se han vinculado con la sobreexpresión de enzimas como la ciclooxigenasa 2 (COX-2), la cual coexiste como una de las isoformas de la ciclooxigenasa (COX), siendo la COX-1 y COX-2 las principales isoformas de la COX. La inhibición de la isoforma COX-1 debida al uso de antiinflamatorios no esteroideos (AINS) conlleva a daños gastrointestinales y renales, por lo que se hace necesario el uso de AINS selectivos hacia la COX-2. En la actualidad, el único inhibidor selectivo (celecoxib) de la COX-2 aprobado por la *FDA* incrementa el riesgo de sufrir accidentes cerebrovasculares y cardiovasculares. Debido a esto, en este trabajo se buscó identificar posibles inhibidores selectivos de la COX-2 que pudieran llegar a presentar efectos antiinflamatorios con menos efectos secundarios. Para esto, se evaluaron 5000 metabolitos de plantas mediante virtual screening a través de un modelo farmacofórico, docking molecular, energía libre de enlace (EL) y dinámica molecular empleando el software Maestro de Schrödinger, LLC. Como resultado se logró identificar los metabolitos crisina (DS:-9,017; EL:-45,68 kcal/mol), apigenina (DS:-10,483; EL:-45,17 kcal/mol), galangina (DS:-9,943; EL:-53,52 kcal/mol) y 5,7- dihidroxi-3-isoprenil flavona (DS:-10,466; EL:-75,03 kcal/mol) como posibles inhibidores, los cuales presentaron interacciones hidrofóbicas, π - π y puentes de hidrógeno con los residuos aminoacídicos Val523, Ser530, y Tyr385, fundamentales en la inhibición selectiva de la COX-2 ya que permiten la diferenciación de la COX-2 y metabolización del sustrato natural. Posteriormente, se evaluó la estabilidad de las poses predichas por los ensayos de docking para cada flavona mediante dinámica molecular, y los resultados obtenidos permitieron plantear como hipótesis que los sustituyentes alifáticos y no polares ubicados en el carbono 3 (C-3) de las flavonas juegan un rol fundamental en la selectividad hacia la COX-2, debido a que mejoran la estabilidad de las flavonas en complejo con la COX-2. Los resultados mostraron que el metabolito 5,7-dihidroxi-3-isoprenil flavona presentó una frecuencia de interacción tipo hidrofóbica con la Val523 del 54%, interacción similar a la observada en los compuestos de referencia (celecoxib=62%; rofecoxib=80%), lo cual nos permite validar la hipótesis planteada dado que el único metabolito capaz de establecer interacciones similares a los compuestos de referencia tiene un sustituyente alifático no polar en el C-3. Finalmente, se pudo concluir que las flavonas crisina, apigenina, galangina, y en especial la 5,7-dihidroxi-3-isoprenil flavona representa una nueva alternativa en el diseño y desarrollo de nuevos inhibidores selectivos de la COX-2, con menos efectos secundarios que los demostrados por los fármacos aprobados por la *FDA*.

1 INTRODUCCIÓN

La COX es una enzima oxidorreductasa la cual presenta las isoformas COX-1 y COX-2, asociadas con la síntesis de prostaglandinas como resultado de la metabolización del ácido araquidónico, siendo esta la vía principal de la respuesta inflamatoria y del dolor (Zhang et al., 2020). La COX-1 es la isoforma proteica encargada de la síntesis de prostaglandinas promotoras de la síntesis de mucosas que protegen el epitelio gástrico, la regulación plaquetaria, mantenimiento y protección de la función renal, entre otras (García Meijide & Gómez-Reino Carnota, 2000). Por otro lado, la isoforma COX-2 está principalmente relacionada con la respuesta inflamatoria y del dolor, viéndose sobreexpresada en patologías como el cáncer, artritis, hiperplasia prostática, osteoartritis (Oniga et al., 2017). Debido a esto, la inhibición de la COX-2 ha sido un enfoque de alto interés en el desarrollo de diversos fármacos.

Debido a la expresión de la COX-2 en enfermedades que llevan a cabo procesos inflamatorios como las mencionadas anteriormente, se hace necesario el uso de antiinflamatorios no esteroideos (AINS), dentro de los cuales se encuentran fármacos como el ibuprofeno, naproxeno, aspirina, entre otros aprobados por la *US Food and Drug Administration (FDA)* cuyo mecanismo de acción consiste en inhibir a la COX (Ahmadi et al., 2022). Los AINS son fármacos con una alta demanda debido a su efecto antiinflamatorio, analgésico y antipirético, sin embargo, la mayor parte de dichos fármacos presentan baja selectividad por la COX-2 (Chen et al., 2021). La inhibición de la COX-1 por parte de los AINS es una de las causas de complicaciones gastrointestinales, mientras que los inhibidores selectivos por la COX-2 han mostrado ser tóxicos cuando se usan por tiempo prolongado (Parolini, 2020), motivo por el cual se llevó a cabo esta investigación, haciendo enfoque en compuestos de origen vegetal.

El objetivo principal de este trabajo consistió en evaluar y analizar una base de datos construida con metabolitos de plantas en busca de compuestos con capacidad para inhibir de forma selectiva a la enzima COX-2. El método de evaluación de cada una de las moléculas analizadas se llevó a cabo empleando técnicas computacionales, en los cuales se analizaron

variables como la energía libre de enlace mediante el método mecánica molecular generalizada Born/Área (MM-GBSA), interacciones proteína-ligando con residuos importantes del sitio activo de la COX-2, y estabilidad de los complejos proteína-ligando mediante simulaciones de dinámica molecular. De esta forma, los resultados obtenidos permitieron la identificación del metabolito 5,7-dihidroxi-3-isoprenil flavona como posible inhibidor de la COX-2 el cual presentó interacciones hidrofóbicas con la Val523, aminoácido determinante en la selectividad hacia la isoforma COX-2

2 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La COX-2 se ha identificado de forma sobreexpresada en enfermedades degenerativas como la osteoartritis, artritis reumatoide, hiperplasia prostática y párkinson, además de diversos tipos de cáncer como el cáncer de colon, seno, colorrectal, gástrico, hepatocelular, entre otros (El-Husseiny et al., 2018; Huai et al., 2019; Khan et al., 2018; Sadeghi-Aliabadi et al., 2013; Zarghi & Arfaei, 2011). Diversas investigaciones han demostrado que la COX-2 desempeña un rol importante en la proliferación y desarrollo de las patologías mencionadas anteriormente, por lo que la inhibición selectiva de dicha enzima ha sido un enfoque de alto interés farmacológico.

La evidencia de la sobreexpresión de la COX-2 en diversas patologías, hace necesario el uso de inhibidores selectivos de dicha enzima, motivo por el cual en la actualidad se cuenta con diversos AINS, sin embargo, los más comunes como el naproxeno, aspirina e ibuprofeno no son selectivos y causan múltiples efectos adversos debido a la inhibición de la COX-1 la cual es una enzima que desempeña funciones homeostáticas como la regulación de la temperatura corporal, protección del epitelio gástrico, regulación plaquetaria, entre otras (Parolini, 2020). Por el contrario, el celecoxib el cual es el único inhibidor selectivo de la COX-2 aprobado por la *FDA* incrementa el riesgo de sufrir accidentes cardíacos y cerebrovasculares, además, de posibles daños renales y hepáticos, motivos por los cuales en los años 2004 y 2005 fueron retirados del mercado el rofecoxib y valdecoxib compuestos de la misma familia del celecoxib. Adicionalmente, la automedicación con AINS ha dejado como resultado una cifra

anual de 16000 muertes en los estados unidos asociadas a complicaciones debidas al uso de dichos fármacos (Chan et al., 2017).

3 JUSTIFICACIÓN

Según Gowayed et al., 2020 el efecto modulador sobre la COX-2 es uno de los mecanismos en el tratamiento de artritis en modelos con ratas; en la osteoartritis se ha demostrado que el uso de antiinflamatorios no esteroideos como el celecoxib en ensayos clínicos con pacientes logra la reducción del dolor y mejora las funciones físicas en comparación con los placebos, según lo reportado por Nakata et al., 2018, siendo estas patologías degenerativas diagnosticadas a 32.5 millones de adultos en el año 2020 en los estados unidos (*Osteoarthritis (OA) | Arthritis | CDC*, n.d.), y se proyecta que para el año 2040 se diagnosticaran a 78.4 millones de adultos (25.9% de todos los adultos) con artritis en los estados unidos (Hootman et al., 2016). Adicionalmente, la desregulación de la COX-2 es uno de los mecanismos celulares implicados en la tumorigenesis e inhibición de la apoptosis, entre otros procesos claves en las vías de proliferación del cáncer (Ghosh et al., 2007), el cual dejó como resultado una cifra de 608570 muertes en los estados unidos en el año 2021 y 10 millones de muertes en el mundo en el año 2020 (Siegel et al., 2021). Adicionalmente, ensayos preclínicos han mostrado que el uso de antiinflamatorios no esteroideos como el celecoxib inhibe la progresión del cáncer colorrectal lo cual sugiere que la inhibición de la COX-2 es una terapia efectiva en el tratamiento del cáncer (X. Li et al., 2021); no obstante, el único inhibidor selectivo de la COX-2 está asociado con un alto riesgo de eventos cardiacos y cerebrovasculares (Modica et al., 2005).

De acuerdo con las múltiples patologías en las cuales se encuentra sobreexpresada la COX-2, así como la toxicidad ligada al uso de los AINS aprobados por la *FDA*, se hace necesario el desarrollo de nuevos inhibidores selectivos y más seguros de dicha enzima, por lo cual se buscó en este trabajo identificar nuevos compuestos con potencial inhibitorio frente a la COX-2 empleando técnicas *in silico*.

Teniendo en cuenta los aportes científicos descritos sobre la COX-2, este proyecto tuvo como hipótesis: ¿Es posible identificar y optimizar nuevos compuestos con potencial como inhibidores selectivos de la COX-2, a partir de inhibidores selectivos reportados en la literatura y técnicas computacionales? Por tal motivo, en busca de corroborar la hipótesis planteada en esta investigación se establecieron los siguientes objetivos.

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo General

Identificar estructuras moleculares (ligandos) con posible actividad inhibitoria y selectiva hacia la enzima COX-2, mediante técnicas in silico

4.2 Objetivos Específicos

- Construir una base de datos compuesta por metabolitos secundarios de plantas.
- Diseñar un modelo farmacofórico, e identificar posibles inhibidores de la COX-2 mediante virtual screening por el modelo farmacofórico, docking molecular y energía libre MM-GBSA.
- Analizar las interacciones y estabilidad de los complejos proteína-ligando mediante dinámica molecular y proponer las mejores estructuras con posible efecto inhibidor y selectivo sobre la COX-2.

5 MARCO TEÓRICO

5.1 Isoformas De La COX

La COX es una enzima la cual presenta dos isoformas, la COX-1 y la COX-2. La enzima constitutiva COX-1 se cristalizó por primera vez en 1971, y hasta 1991 se cristalizó la isoforma inducible COX-2; por lo que se creía que la isoforma constitutiva era la única ciclooxygenasa presente en las células eucariotas, sin embargo, en la actualidad se sabe que

las isoformas de la COX se encuentran presentes en todos los organismos vertebrados estudiados (López Parra et al., 2007).

La COX-1 es la isoforma encargada de llevar a cabo la síntesis de prostaglandinas que desempeñan funciones homeostáticas, como la regulación de la temperatura del cuerpo, protección del epitelio gástrico, regulación plaquetaria, mantenimiento y protección de la función renal a través de la dilatación de los vasos medulares y la perfusión del riñón, entre otras (García Meijide & Gómez-Reino Carnota, 2000). Mientras que, la COX-2 está principalmente relacionada con la respuesta inflamatoria, del dolor y la inhibición de la agregación plaquetaria mediante la síntesis de prostaciclina, viéndose expresada por estímulos asociados al desarrollo de diversas patologías, razón por la que se considera a la COX-2 como una proteína de alto interés farmacológico (Oniga et al., 2017).

La estructura primaria de la COX-1 y COX-2 comparten un 60 % de homología entre sus residuos aminoácidos, no obstante, a pesar de las diferencias las dos enzimas tienen la capacidad para metabolizar el ácido araquidónico y sintetizar prostaglandinas (Zarghi & Arfaei, 2011). Las diferencias que determinan cada una de las isoformas, es el cambio de tres residuos aminoácidos presentes en el sitio activo (Abdellatif et al., 2021). En el caso de la COX-1 se encuentran los residuos aminoácidos Ile523, His513 y Ile434, mientras que en la COX-2, son cambiados los residuos aminoácidos mencionados anteriormente, por los residuos Arg513, Val434 y Val523 (Abdellatif et al., 2021; Sağlık et al., 2021).

Los residuos que difieren entre cada una de las isoformas juegan un rol clave en el diseño de inhibidores selectivos, debido a que modifican el tamaño del canal en el cual se acopla el ácido araquidónico el cual es metabolizado por las isoformas de la COX (Blobaum & Marnett, 2007).

5.2 Acción Catalítica De La COX

El ácido araquidónico es metabolizado por las isoformas de la COX, enzimas pertenecientes al grupo de las oxidoreductasas, las cuales llevan a cabo reacciones redox mediante la transferencia de especies de hidrógeno y oxígeno, en la síntesis de prostaglandinas G_2 (PGG_2) (Nakata et al., 2018). La transición de PGG_2 a prostaglandinas H_2 (PGH_2) es catalizada por una enzima peroxigenasa, mientras que la síntesis de las prostaglandinas I_2 , D_2 , E_2 , F_2 (PGI_2 , PGD_2 , PGE_2 , PGF_2) y tromboxanos A_2 (TXA_2) es catalizada por enzimas sintasas específicas

para cada tipo de prostanoide obtenido en la metabolización del ácido araquidónico (**figura 1**) (Martínez-Canabal & Rivas-Arancibia, 2005).

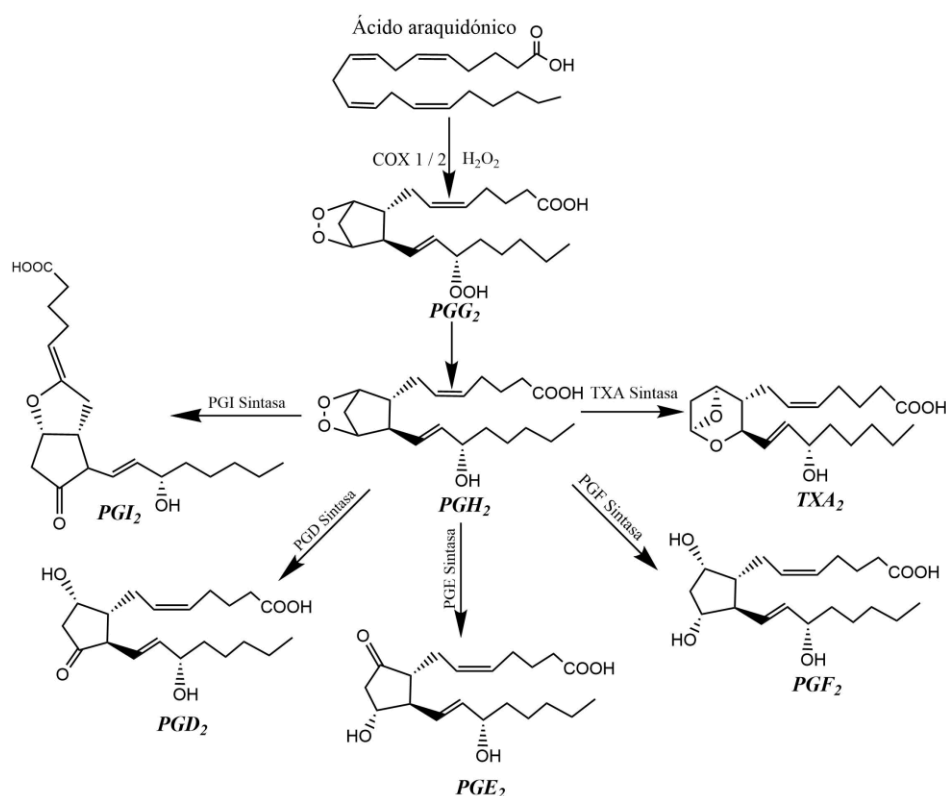


Figura 1. Esquema de la síntesis de prostaglandinas mediada por acción de la ciclooxygenasa (figura tomada y adaptada de Narumiya et al., 1999).

Las prostaglandinas y tromboxanos sintetizados por acción de las enzimas sintasas, cumplen su función dependiendo el tipo de receptor de prostaglandinas acoplados a la proteína G o receptores transmembrana (Narumiya et al., 1999). Existen cinco tipos de receptores de prostanoideos denominados como receptores IP, DP, EP, FP y TP, determinando de esta forma la acción intracelular debida al aumento de adenosín monofosfato cíclico (AMP_c) o disminución del AMP_c y aumento de Ca^{+2} (Lebender et al., 2018). La activación del receptor EP_3 debida a la producción de prostaglandinas E_2 , se encuentra asociado a la disminución intracelular de AMP_c , lo que estimula la producción de citoquinas proinflamatorias como IL-12, TNF- α , IL-1 α e IL-6, vía principal de la respuesta inflamatoria, mediada principalmente por la acción catalítica de la COX-2 (Ahmadi et al., 2022; Brune & Patrignani, 2015; Lebender et al., 2018).

Investigaciones realizadas han mostrado la evolución de los procesos de inflamación llevados a cabo en el desarrollo de diversas enfermedades como la osteoartritis, la artritis reumatoide y la hiperplasia prostática, siendo estas algunas de las patologías que involucran procesos de inflamación durante su proliferación (Huai et al., 2019; Khan et al., 2018). Adicionalmente, se ha identificado la sobreexpresión de la COX-2 en cáncer de seno, ovario, gástrico, próstata, hepatocelular y colon (Borges et al., 2018; El-Husseiny et al., 2020; Marzouk et al., 2021; Sağlık et al., 2021). Además, la síntesis de prostaglandinas mediada por la COX-2 juega un papel fundamental en la carcinogénesis, mediante la inducción de la mitosis de osteoblastos, fibroblastos y células epiteliales de las glándulas mamarias (Oniga et al., 2017), motivos que refuerzan el interés en la estructura y función de la COX-2 como medio para el desarrollo de nuevos fármacos.

5.3 Características Estructurales De La COX-2

La COX-2 cuenta con una masa molecular de 72 kDa distribuida en tres dominios; dominio de factor de crecimiento epidermal, dominio de unión membranal y la cavidad del sitio activo (Ahmadi et al., 2022).

Por su parte, el sitio activo de la COX-2 tiene tres regiones de importancia en las cuales los inhibidores se acoplan a la proteína. La primera región está conformada por los residuos Tyr385, Gly526, Trp387, Phe518, Leu384, y Ser530 siendo esta una región hidrofóbica; la segunda región está conformada por la Arg120 y la Tyr355 presentando afinidad a las regiones hidrofílicas del ligando; Finalmente, la tercera región se encuentra relacionada con las interacciones que establecen la selectividad de los ligandos por la COX-2, y está conformada por los residuos His90, Val523, Arg513, Leu352, Ser353 y Gln192 (**figura 2**) (Taidi et al., 2022). La identificación de dichas regiones importantes de la COX-2 ha sido un avance importante, permitiendo el diseño de compuestos con actividad inhibitoria de la COX como los AINS.

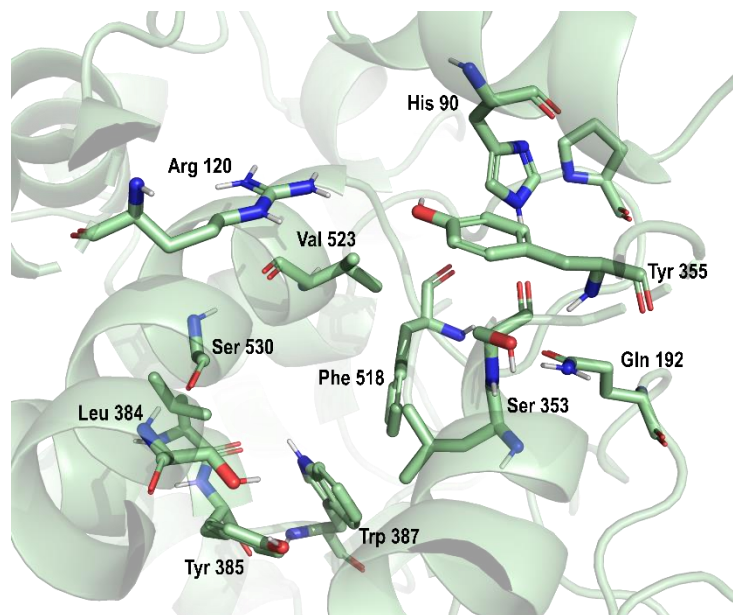


Figura 2. Residuos aminoacídicos involucrados en el acoplamiento de los ligandos a la enzima COX-2. En pale green se encuentran coloreados los átomos de carbono, en rojo el oxígeno y en azul las especies de nitrógeno (figura de autoría propia).

5.4 Antiinflamatorios No Esteroideos (AINS)

Los AINS constituyen una familia químicamente heterogénea de fármacos con efectos principalmente antiinflamatorios, analgésicos, y antipiréticos (Chen et al., 2021). En la actualidad se cuenta con diversos fármacos cuyo mecanismo de acción consiste en inhibir la COX (AINS), sin embargo, no se cuenta con ningún fármaco aprobado por la *FDA* que inhibe de forma selectiva la acción de la COX-2 y pueda ser usado por tiempo prolongado. Estudios realizados han demostrado una relación directa del modo de acción de los AINS con el desarrollo de complicaciones gastrointestinales y renales asociadas con la inhibición de la enzima constitutiva COX-1 (Brune & Patrignani, 2015; Chan et al., 2017); estimándose la venta anual de 30 billones de dosis y 16000 muertes anuales en los Estados Unidos debidas a complicaciones relacionadas con el uso de AINS (Chan et al., 2017; Wiegand & Shlamovitz, 2021).

Existen diversos tipos de AINS y se pueden clasificar de dos maneras; según el índice de selectividad por la COX-2; como inhibidores de acción reversible, o como lentamente reversibles e irreversibles (Ahmadi et al., 2022). Dentro de los inhibidores no selectivos se

encuentran los AINS clásicos como el ibuprofeno el cual es altamente reversible; mientras que la aspirina es el único inhibidor irreversible, debido a la interacción mediante un puente salino con la Arg120 e interacción del grupo acetyl con la Arg530 (Ahmadi et al., 2022). Por otro lado, está el celecoxib, el cual presenta un alto índice de selectividad y reversibilidad dependiente del tiempo, siendo este el AINS con mayor índice de selectividad por la COX-2 actualmente aprobado por la *FDA* (Blobaum & Marnett, 2007).

Los AINS no selectivos tienen su efecto inhibitorio interactuando principalmente con los residuos aminoacídicos Tyr355, Tyr385, Arg530 y Arg120 encontrados en el sitio activo de las dos isoformas de la COX (Blobaum & Marnett, 2007). Por otra parte, los inhibidores selectivos como el celecoxib, muestran interacciones con residuos aminoacídicos específicos de la COX-2 como la Arg513 y Val523, los cuales hacen que los inhibidores se acoplen fácilmente en el sitio catalítico de dicha enzima y se vean impedidos estéricamente para acceder al sitio activo de la COX-1 (Taidi et al., 2022). En la tabla 1 se muestran una serie de AINS aprobados por la *FDA* (Wiegand & Shlamovitz, 2021), y en la **figura 3** las estructuras de aspirina, ibuprofeno, diclofenaco y el celecoxib.

Tabla 1. Lista de antiinflamatorios no esteroideos aprobados por la *FDA* (Wiegand & Shlamovitz, 2021).

FAMILIA QUÍMICA	NOMBRE DEL AINS
Salicilato	Aspirina
Pirazol	Fenilbutazona
Ácido antranílico	Ácido mefenámico
Ácido acético	Diclofenaco
	Etodolaco
	Indometacina
	Ketorolaco
	Sulindaco
	Ibuprofeno

Ácido propiónico	Naproxeno
	Carprofeno
	Ketoprofeno
Oxicam	Piroxicam
Coxib	Celecoxib

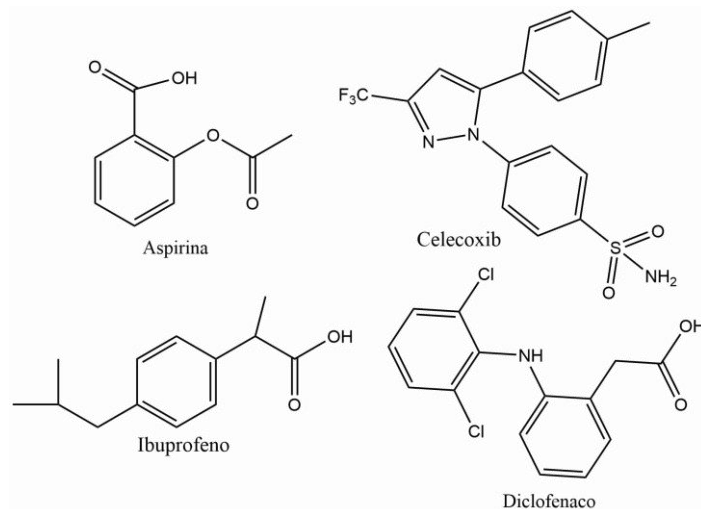


Figura 3. Estructura química de antiinflamatorios no esteroideos.

5.4.1 Celecoxib Y Su Mecanismo De Acción

Dentro de los inhibidores selectivos de la COX-2 se encuentran los fármacos de la familia de los coxib, donde están el rofecoxib, valdecoxib y celecoxib (**figura 3**). A pesar de la alta selectividad de los coxibs hacia la COX-2, estos presentan graves efectos cardiotóxicos, generando que hasta el momento el celecoxib sea el único coxib aprobado por la *FDA* después de que en los años 2004 y 2005 se sacarán del mercado el rofecoxib y valdecoxib, debido a su alta toxicidad (Zarghi & Arfaei, 2011). El mecanismo de acción del celecoxib consiste en bloquear la síntesis de prostaglandinas y tromboxanos mediante la inhibición de la COX-2, expresada debido a estímulos por citocinas, factores de crecimiento y promotores de tumor, etc (Ahmadi et al., 2022). Se ha demostrado que el celecoxib es un potente anti cáncer, considerado por la *FDA* como quimiopreventivo en cáncer de seno, próstata,

colorrectal, pulmón y vesícula, además, el celecoxib en una dosis diaria de 400 mg mostró reducir en un 48% la recurrencia en cáncer de seno (Gong et al., 2012).

La biodisponibilidad del celecoxib en los procesos que realiza como terapia en el organismo es del 84% después de pasadas 2 horas, y disminuye al 65% pasadas 4 horas; después de este tiempo se halló una mayor tasa de metabolitos en el torrente sanguíneo, productos de la oxidación por parte del citocromo P450 2C9 (CYP2C9) y citocromo P450 3A4 (CYP3A4), sin embargo, nueve de los metabolitos son inhibidores activos por lo que su tiempo de vida media está en un rango de 3 a 11 horas (Saxena et al., 2020).

El celecoxib es metabolizado en el hígado por acción del CYP2C9 y CYP3A4 en tres etapas. En la etapa inicial el celecoxib es transformado en hidroxí celecoxib, posteriormente por acción de la enzima alcohol deshidrogenasa 1 y 2 (ADH-1 y ADH-2) el hidroxí celecoxib es oxidado a carboxi celecoxib, el cual, es metabolizado por la glucurónosil transferasa (UGTs) para formar el 1-O-glucurónido celecoxib y ser eliminado a través de la bilis, mediante las heces y la orina (figura 4) (Gong et al., 2012).

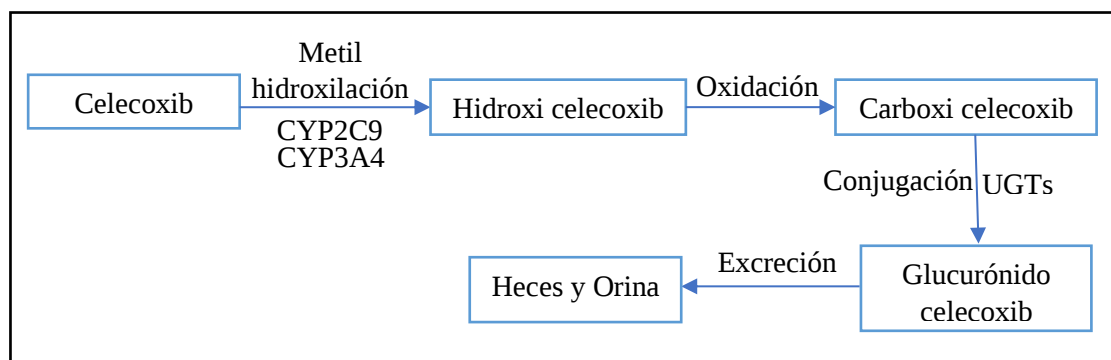


Figura 4. Metabolismo hepático del celecoxib (tomado y adaptado de Gong et al., 2012).

El celecoxib se ha asociado con un posible incremento en el riesgo de accidentes vasculares, el cual está relacionado con la inhibición de la síntesis de PGI_2 que llevan a cabo procesos de inhibición de la agregación plaquetaria, permitiendo un incremento de los TXA_2 sintetizadas por la COX-1, lo cual induce al paciente en un cuadro clínico protrombótico y un alto riesgo de eventos cardíacos y cerebrovasculares, además de posibles fallos renales (Brune & Patrignani, 2015; Divins, 2014). Debido a los efectos adversos causados por los AINS no

selectivos, así como por el celecoxib, existe la necesidad de evaluar nuevos compuestos con potencial para inhibir la COX-2, teniendo un enfoque importante derivados de plantas como los metabolitos secundarios debido a sus efectos terapéuticos, además, de posible reducción de las contraindicaciones como las reportadas por los coxibs.

5.4.2 Metabolitos Secundarios De Plantas

Las plantas en respuesta al estrés causado por fenómenos climatológicos como temperaturas extremas, sequía, salinidad, y contaminación por metales pesados, han desarrollado mecanismos de adaptación, los cuales están basados en la síntesis de compuestos estructuralmente pequeños, denominados metabolitos secundarios (Ogbe et al., 2020).

Los metabolitos secundarios extraídos de plantas han sido usados a través de la evolución del hombre, en el tratamiento de enfermedades; se han reportado diversos metabolitos con actividad inhibitoria de la COX-2 y actividad quimio preventiva (Kola et al., 2023). Investigaciones realizadas han permitido identificar metabolitos como la demethyleneberberine ($IC_{50}=16,79\mu M$) y palmatina ($IC_{50}=23,47\mu M$) evaluados en investigaciones empleando proteínas recombinantes y cromatografía líquida de alta resolución (UPLC-ESI-MS) (Huai et al., 2019), butenolides aromáticos denominados eutipoides (Taidi et al., 2022), triterpenoides y saponinas esteroideas presentes en extractos de *Waltheria Indica L.* (Termer et al., 2021), siendo estos algunos de los 321 compuestos naturales identificados entre los años 2009 y 2018, los cuales presentan propiedades antiinflamatorias e inhibición de la COX-2 (Qin et al., 2020). A pesar que se ha logrado identificar múltiples metabolitos que inhiben la COX-2 la efectividad y seguridad de estos no ha sido evaluada en ensayos clínicos, debido a la dificultad para obtener de forma sintética dichos productos de origen vegetal (Taidi et al., 2022). A pesar de la dificultad de la obtención de productos de origen vegetal, un enfoque importante en el desarrollo de fármacos es la evaluación de derivados de plantas como posibles terapias en el tratamiento de múltiples patologías (Jia et al., 2022). Adicionalmente, el desarrollo de las diversas herramientas computacionales enfocadas al diseño racional de fármacos permite la optimización de dichos compuestos en busca de potenciar sus efectos farmacológicos.

5.5 Diseño De Fármacos Asistido Por Computadora (CADD)

La creciente demanda de fármacos con mejores propiedades farmacológicas y menor toxicidad, ha llevado al desarrollo de algoritmos computacionales que permiten obtener una aproximación de estructuras químicas con potencial farmacológico; siendo el screening virtual uno de los métodos usados en el CADD, permitiendo el análisis de grandes cantidades de compuestos en tiempos de análisis cortos y menor costo en comparación con las técnicas experimentales in vitro (Onawole et al., 2020).

5.5.1 Métodos De Diseños De Fármacos Asistidos Por Computadora

Los métodos de diseño de fármacos empleando simulaciones computacionales, se pueden agrupar de dos formas: los métodos basados en la estructura de los fármacos o ligandos que inhiben la acción de una proteína, o los que se basan en la estructura química del receptor (Saldívar-González et al., 2017).

Dentro de los métodos computacionales basados en la estructura del receptor está el acoplamiento molecular o docking y las simulaciones de dinámica molecular. Por otro lado, algunos de los métodos para el desarrollo y diseño de fármacos basados en la estructura de los inhibidores, son los modelos Q-SAR y farmacofóricos, además de las propiedades ADME-Tox, que permiten establecer la viabilidad de un compuesto para ser usado como fármaco (Pettersson & Teixidó i Closa, 2009; Saldívar-González et al., 2017).

5.5.2 Absorción, Distribución, Excreción Y Metabolismo (ADME)

Cuando un fármaco ingresa al organismo hay dos procesos que se llevan a cabo de forma simultánea. Estos procesos son conocidos como farmacodinámica y farmacocinética; la farmacodinámica estudia la acción del fármaco sobre el cuerpo y la farmacocinética estudia la acción del cuerpo u organismo sobre el fármaco (Y. Wang et al., 2015).

La farmacocinética se asocia con la absorción, distribución, metabolismo y excreción (ADME) de los fármacos introducidos en el organismo (Y. Wang et al., 2015). La absorción de los AINS debido a que son suministrados de forma oral, se lleva a cabo en el organismo a través del intestino y posteriormente conducido al hígado, donde es distribuido el fármaco

a todos los órganos por medio del torrente sanguíneo, sin embargo, debido a la metabolización hepática de los AINS la distribución del fármaco se ve afectada por la rápida oxidación y eliminación de este (**figura 4**) (*Administración de Los Fármacos - Fármacos o Sustancias - Manuale Merck Versión Para El Público General*, n.d.), motivo por el cual las propiedades ADME son un parámetro importante que todos los fármacos deben superar.

Se han diseñado algoritmos computacionales con la capacidad de evaluar múltiples descriptores mediante los cuales se puede predecir las propiedades ADME, además de descriptores asociados con la toxicidad de los compuestos evaluados (ADME-Tox). En este trabajo se empleó el módulo QikProp del software Maestro de la compañía Schrödinger, el cual computa alrededor de 46 descriptores asociados con las propiedades ADME-Tox (*QikProp* | *Schrödinger*, n.d.). Los análisis se hicieron teniendo en cuenta la regla de 5 de Lipinski (masa molecular (WM), donadores de enlaces de hidrógenos (donorHB), aceptores de enlaces de hidrógeno (accptHB), coeficiente de partición octanol/agua (QPlogPo/w)), la regla de 3 de Jorgensen (solubilidad en agua (QPlogS), permeabilidad de las células Caco-2 (QPPCaco) y número de metabolitos primarios), la absorción oral humana, porcentaje de absorción oral humana, enlace a proteínas plasmáticas (QPlogK_{HSA}), permeabilidad de la barrera hematoencefálica (QPlogBB) y valor del IC₅₀ del bloqueo de los canales HERG K⁺ (QPlogHERG).

Las reglas de Lipinski determinan la probabilidad de que un fármaco sea soluble y sea absorbido por el organismo, por lo que si la estructura del ligando no supera los descriptores de las reglas de Lipinski es posible que el fármaco cuente con una biodisponibilidad que no lo haga viable (Duchowicz et al., 2007). La regla de tres de Jorgensen al igual que las de Lipinski, están relacionadas con la absorción y distribución de fármacos, sin embargo, en esta se tiene en cuenta la solubilidad en solución acuosa del compuesto, la permeabilidad de la línea celular Caco-2 la cual simula el tejido epitelial del intestino, además de establecer un número de metabolitos primarios con actividad farmacológica (Jorgensen & Duffy, 2002). La permeabilidad de la barrera hematoencefálica permite el acceso de los fármacos al sistema nervioso central involucrado en la señalización de la respuesta al dolor, por lo que se considera un parámetro relevante en el diseño de fármacos como los AINS (Y. Wang et al., 2015). El enlace a proteínas plasmáticas (QPlogK_{HSA}) es otro de los factores importantes en

el estudio farmacocinético debido a que, si la afinidad de las proteínas plasmáticas por los ligandos es alta, la probabilidad de que el fármaco atraviese las membranas celulares disminuye y por lo tanto la biodisponibilidad del compuesto se va a ver afectada (Hagemel et al., 2020). El IC₅₀ del bloqueo de los canales HERG K⁺ es un parámetro relevante en los análisis farmacodinámicos, ya que se encuentra asociado con el riesgo de arritmia ventricular y posible muerte por infarto cardíaco, siendo este el descriptor asociado con el posible efecto tóxico de los ligandos evaluados (Vandenberg et al., 2012).

Los descriptores mencionados en el párrafo anterior son medidos en diferentes rangos de aceptación, los cuales dependen del tipo de descriptor (**tabla 2**). Los rangos describen los valores aptos para establecer condiciones óptimas de absorción, biodisponibilidad, metabolismo y posible efecto tóxico de los compuestos evaluados, permitiendo discriminar estructuras con viabilidad farmacológica (QikProp | Schrödinger, n.d.).

Tabla 2. Descriptores empleados para la evaluación de la viabilidad farmacológica de las estructuras analizadas (tabla tomada y adaptada de QikProp User Manual Copyright © 2015 Schrödinger, LLC)

Descriptor	Descripción	Rangos recomendados
donorHB	Número de enlaces de hidrógeno que puede donar un ligando en un medio acuoso.	0.0-6.0
accptHB	Número de enlaces de hidrógeno que puede aceptar un ligando en un medio acuoso.	2.0-20
MW	Masa molecular del ligando.	<500
QPlogPo/w	Coeficiente de partición octanol/agua.	-2.0-6.5
QPlogS	Predice la solubilidad en medio acuoso.	-6.5-0.5
QPPCaco	Predice la permeabilidad de la línea celular Caco-2 en nm/s.	<25 pobre >500 alta

HumanOralAbsorption	Predice la absorción oral en escala cualitativa. Usa un set de reglas basadas en el número de metabolitos, número de enlaces rotantes, coeficientes de partición, solubilidad y permeabilidad celular.	1-bajo, 2-medio, 3-alto
PercentHumanOralAbsorp	Predice la absorción oral en escala de 0 a 100%.	>80% alto <25% pobre
QPlogBB	Predice el coeficiente de partición sangre/cerebro.	-3.0-1.2
QPlogKhsa	Predice el enlace del ligando a la albúmina sérica humana.	-1.5-1.5
QPlogHERG	Predice el valor IC50 del bloqueo de los canales HERG K ⁺ .	Preocupación por encima de -5
Reglas de Lipinski	Las reglas de Lipinski son: MW < 500, QPLogPo/w < 5, donorHB ≤ 5, accptHB ≤ 10.	Máximo 4
Reglas de Jorgensen	Las reglas de Jorgensen son: QPlogS > -5.7, QP PCaco > 22 nm/s, # Metabolitos primarios < 7.	Máximo 3

5.5.3 Modelo Farmacofórico

Un modelo farmacofórico son una serie de condiciones de distribución espacial de regiones claves de la superposición de compuestos, basado en el alineamiento de estructuras con actividad frente al receptor de interés. Las hipótesis de modelos farmacofóricos son construidas mediante una distribución de features las cuales describen las interacciones que puede establecer el ligando con el receptor (Pettersson & Teixidó i Closa, 2009).

En este trabajo se empleó el módulo Phase del software Maestro para la construcción del modelo farmacofórico. Phase facilita el desarrollo de hipótesis de modelos farmacofóricos mediante la comparación de compuestos activos y compuestos no activos, dando como resultado la conformación de una caja de compuestos con regiones de similitud, descritas por un punto, un vector o un grupo de átomos, las cuales están vinculadas al tipo de feacture determinada en el modelo farmacofórico (**tabla 3**). Los análisis de compuestos usando el modelo farmacofórico (virtual screening) se realizan de forma comparativa determinando el grado de acoplamiento de las moléculas analizadas, a cada una de las features de tres formas: el alignment score, vector score y volume score las cuales se agrupan en una sola medida denominada fitness, definida en la **ecuación 1** (Kchouk & Hegazy, 2022).

$$s = W_{\text{site}} \left(1 - \frac{S_{\text{align}}}{C_{\text{align}}} \right) + W_{\text{vec}} S_{\text{vec}} + W_{\text{vol}} S_{\text{vol}} \quad \text{Ecuación 1}$$

Donde S_{align} es la desviación de la raíz media cuadrática (RMS) entre los puntos de la superposición de las features del modelo y el ligando; C_{align} , valor por predeterminado de 1,2; W_{site} , valor predeterminado igual a 1,0; S_{vol} , es la relación entre el volumen de las zonas de similitud del ligando y el modelo farmacofórico, sobre el volumen total; W_{vol} , valor predeterminado igual a 1,0; S_{vec} , es el coseno medio entre los vectores coincidentes del modelo y el ligando; W_{vec} valor predeterminado igual a 1,0.

Tabla 3. Features estimadas en la construcción de modelos farmacofóricos.

Feacture	Símbolo	Apariencia
Aceptor de enlaces de hidrógeno	A	Esfera roja centrada en el átomo con flechas en dirección entrante de la esfera
Donador de enlaces de hidrógeno	D	Esfera azul claro centrada en el átomo de H con flecha saliendo de la esfera
Grupo hidrofóbico	H	Esfera verde

Grupo cargado negativamente	N	Esfera roja
Grupo cargado positivamente	P	Esfera azul
Anillo aromático	R	Toroide naranja en el plano del anillo aromático

El valor Fitness determina el grado de acoplamiento de los ligandos al modelo en una escala de -1 a 3, donde 3 es el mayor grado de acoplamiento (¿What Are the Ranges for Fitness, Vector, Volume, ¿and Site Scores in Phase? | Schrödinger, n.d.). Adicionalmente las estructuras analizadas usando modelos farmacofóricos pueden ser discriminadas estableciendo el número mínimo de features con las que debe coincidir. Los virtual screening usando modelos farmacofóricos son procesos que permiten descartar estructuras con un costo computación bajo, motivo por el cual fue usado como primer filtro en el tamizaje de la base de datos analizada, antes de llevar a cabo los análisis de docking molecular.

5.5.4 Docking Molecular

Las simulaciones de docking molecular son la herramienta más común usada en el diseño de fármacos asistido por computadora. Los procesos de docking molecular están basados en la predicción de la conformación de los ligandos, y la predicción de las interacciones con las regiones del sitio catalítico de la proteína, además, del cálculo de la puntuación del docking (docking score) asociado con la afinidad de unión de los complejos proteína-ligando, empleando funciones de energía (Zhou et al., 2007).

La afinidad de los ligandos por la proteína varía según la configuración en la cual se realice el docking. Los análisis de docking molecular pueden llevarse a cabo en tres configuraciones posibles; manteniendo el complejo proteína-ligando como cuerpos rígidos, la proteína rígida y el ligando flexible o el complejo proteína-ligando flexibles (Stanzione et al., 2021). En cada uno de los casos anteriores, los grados de libertad de los sistemas analizados son más complejos debido a la flexibilidad de los ligandos o flexibilidad de los complejos proteína-

ligando, lo cual lleva a determinar con un mayor nivel de precisión la afinidad de un compuesto por la diana molecular de interés (Repasky et al., 2007).

En este trabajo los análisis de docking molecular se realizaron en el módulo GLIDE del programa Maestro de la compañía Schrödinger. Los modos de precisión que ofrece el software para los análisis de complejos proteína-ligando son: el modo high-throughput virtual screening (HTVS), standard-precisión (SP) y extra-precisión (XP), los cuales mantienen la proteína como un cuerpo rígido y el ligando puede ser flexible o rígido. Cuando se establece el ligando como flexible, todos los grupos rotables del ligando son evaluados, aunque esto depende del modo de precisión debido a las diferencias en los algoritmos de muestreo (Repasky et al., 2007; *What Are the Main Differences between HTVS, SP, and XP Docking?* | Schrödinger, n.d.).

El modo de precisión HTVS es el método más rápido para realizar virtual screening de bases de datos con grandes cantidades de compuestos (Friesner et al., 2004). Los análisis realizados usando el modo HTVS emplean las mismas funciones de puntuación que el modo SP, sin embargo, las diferencias que presentan, se basan en la reducción del número de intermediarios conformacionales evaluadas en el sitio activo de la proteína, reducción del muestreo y del refinamiento torsional para el caso del modo de precisión HTVS, no obstante, el algoritmo empleado en los dos modos de precisión es el mismo (*What Are the Main Differences between HTVS, SP, and XP Docking?* | Schrödinger, n.d.).

El modo de precisión XP emplea un algoritmo de muestreo más exhaustivo que el modo SP, además, tiene la habilidad para discriminar entre ligandos que no se acoplan de forma adecuada al receptor, debido, a la capacidad para establecer faltas en la desolvatación de los grupos cargados y polares tanto del ligando como del receptor, además, del gran aporte hecho por los múltiples diseños estructurales realizados gracias a su eficacia en el muestreo (Friesner et al., 2004). La desolvatación es un proceso importante que es considerado en los análisis de docking XP, permitiendo considerar el efecto del cambio dieléctrico causado por el bloqueo de las interacciones ligando solvente y proteína solvente, debida al desplazamiento de este durante el acoplamiento proteína-ligando, lo cual incrementa la energía de interacción entre el receptor y el ligando, considerada en una función de docking score más compleja

que la del modo SP, permitiendo establecer faltas que reducen el número de falsos positivos en los análisis (Friesner et al., 2004, 2006).

La función de puntuación XP GScore (XP GlideScore) del docking XP, tiene en cuenta efectos entrópicos debido al desplazamiento de moléculas de agua de regiones hidrofóbicas ubicadas en el sitio catalítico del receptor, efectos de la desolvatación que pueden ser penalizados, además de la evaluación de un set grande de conformaciones estructurales del ligando en el sitio activo. La función XP GScore está definida en la **ecuación 2** (Friesner et al., 2004, 2006; Zhou et al., 2007).

$$XP\ GlideScore = E_{coul} + E_{vdW} + E_{bind} + E_{penalty} \quad \textbf{Ecuación 2}$$

$$E_{bind} = E_{hyd_enclosure} + E_{hb_nn_motif} + E_{hb_cc_motif} + E_{PI} + E_{hb_pair} + E_{phobic_pair} \quad \textbf{Ecuación 3}$$

$$E_{penalty} = E_{ligand_strain} + E_{desolv} \quad \textbf{Ecuación 4}$$

En la **ecuación 3** se presenta el aporte de cada una de las interacciones enlazantes (E_{bind}), incluidas en el tercer término de la **ecuación 2**. El cálculo del aporte al XP GScore de las interacciones de puente de hidrógeno depende de las características de las especies que interaccionan; si el donador y el aceptor son especies neutras ($E_{hb_nn_motif}$), cargada-neutra (E_{hb_pair}) o ambas especies están cargadas ($E_{hb_cc_motif}$). El aporte por las interacciones lipofílicas es estimado dependiendo las distancias entre los átomos lipofílicos del ligando y el receptor (E_{phobic_pair}). El término E_{PI} calcula el aporte realizado por las interacciones del tipo pi-cación y pi stacking realizado por halógenos ubicados en regiones hidrofóbicas del receptor. El hydrophobic enclosure score ($E_{hyd_enclosure}$) calcula el aporte por interacciones hidrofóbicas entre el ligando y receptor, incluyendo factores que no se tienen en cuenta en el término E_{phobic_pair} , como penalizar aportes de interacciones lipofílicas mayores a -4.5 kcal/mol, debido a la capacidad de las moléculas de agua para interaccionar con el ligando y la proteína en dicha región, entre otras (Friesner et al., 2004, 2006; Zhou et al., 2007).

En la **ecuación 4** se presenta el cuarto término de la **ecuación 1** que describe la puntuación del docking XP. El primer término de la **ecuación 4** (E_{ligand_strain}), penaliza la torsión del

ligando, debida a la deformación causada para acoplarse en el sitio activo de la estructura rígida del receptor (Guedes et al., 2014). El término E_{desolv} es un modelo de aguas, construido para evaluar la desolvatación en el sitio activo de la proteína, pudiendo penalizar fallas en grupos polares o cargados con una desolvatación baja (Friesner et al., 2006). Debido a cada una de las consideraciones mencionadas en este párrafo y el anterior, se considera al docking XP como el más preciso de los modos de precisión que establece Glide, permitiendo identificar estructuras con un alto potencial para inhibir un receptor, y dando paso a análisis más rigurosos como las simulaciones dinámicas molecular (DM) (Friesner et al., 2006).

5.5.5 Dinámica Molecular (DM)

La dinámica molecular es un proceso que simula el movimiento de los átomos, empleando la mecánica clásica o Newtoniana (Guedes et al., 2014). El movimiento de los átomos se encuentra asociado a la flexibilidad de las moléculas, la cual es una de las principales características de compuestos con actividad biológica como las proteínas, además, de poderse incluir durante las simulaciones parámetros como la temperatura, presión, pH y concentración de iones de NaCl en medio acuoso, permitiendo hacer el seguimiento del sistema en relación con las interacciones proteína-ligando a través del tiempo, obteniéndose una aproximación del comportamiento biológico experimental de forma *in silico* (Guedes et al., 2014; Namba et al., 2008).

Poder recrear el movimiento de cada una de las partículas de un sistema proteína-ligando en condiciones biológicas, implica el análisis de cada una de las interacciones intermoleculares e intramoleculares de los átomos del sistema. El cálculo de cada una de las interacciones es realizado empleando campos de fuerza, los cuales estiman el aporte energético realizado por los diversos tipos de interacciones entre moléculas o átomos (Namba et al., 2008).

Un campo de fuerza es un conjunto de ecuaciones descritas por la mecánica molecular que permiten reproducir el comportamiento de los átomos, mediante el cálculo de la energía potencial del sistema, y son parametrizadas para reproducir el comportamiento de moléculas como las proteínas, glucósidos, ácidos orgánicos, entre otras, motivo por el cual el análisis de sistemas de moléculas diferentes emplea campos de fuerza con funciones diferentes (Namba et al., 2008).

En este trabajo las simulaciones de DM se realizaron empleando suite Desmond, el cual emplea el campo de fuerza OPLS_2005 diseñado para el análisis de proteínas (Kaminski et al., 2001). El campo de fuerza OPLS_2005 calcula la sumatoria de las energías de interacción, como energías de interacción no enlazantes (E_{nb}), interacciones enlazantes de estiramiento (E_{bond}), flexión (E_{angle}) y torsión ($E_{torsion}$) (Kaminski et al., 2001; Sweere & Fraaije, 2017).

El cálculo de las energías no enlazantes es realizado estimando el potencial Coulomb y de Lennard Jones, donde ϵ_{ij} y σ_{ij} son los parámetros de energía y distancia entre los átomos i y j (**ecuación 5**) (Sweere & Fraaije, 2017).

$$E_{nb} = \sum_{i < j} \left[\frac{q_i q_j e^2}{r_{ij}} + 4\epsilon_{ij} \left(\frac{\sigma_{ij}^{12}}{r_{ij}^{12}} - \frac{\sigma_{ij}^6}{r_{ij}^6} \right) \right] f_{ij} \quad \text{Ecuación 5}$$

En las **ecuaciones 6, 7 y 8** se muestran las funciones usadas en el campo de fuerza OPLS_2005 para determinar las energías enlazantes. Los términos r_{eq} y θ_{eq} representan la longitud de enlace y el ángulo de equilibrio respectivamente. El término ϕ_i es el ángulo diedro, mientras V_1 , V_2 y V_3 son los coeficientes de las series de Fourier y f_1 , f_2 y f_3 son ángulos en fase (Jorgensen et al., 1996).

$$E_{bond} = \sum_{bonds} K_r (r - r_{eq})^2 \quad \text{Ecuación 6}$$

$$E_{angle} = \sum_{angle} K_\theta (\theta - \theta_{eq})^2 \quad \text{Ecuación 7}$$

$$E_{torsion} = \sum_i \left[\frac{V_1^i}{2} [1 + \cos(\phi_i)] + \frac{V_2^i}{2} [1 - \cos(2\phi_i)] + \frac{V_3^i}{2} [1 - \cos(3\phi_i)] \right] \quad \text{Ecuación 8}$$

Como resultado de una dinámica molecular se obtiene el comportamiento del complejo proteína-ligando por fragmentos de tiempo, calculado como trayectorias en las cuales el ligando interactúa con el receptor. Sin embargo, Las simulaciones de DM no tienen bien definidos procesos como la desolvatación, interacciones electrostáticas de largo alcance y

contribuciones entrópicas que actúan como aportes de energía libre, las cuales si están bien definidas en métodos especializados en el cálculo de la energía libre de los sistemas proteína-ligando (Forouzesh & Mishra, 2021).

5.5.6 Energía Libre

El método más rápido y conocido para la estimación de la energía libre es la Mecánica molecular generalizada Born/Área de superficie (MM/GBSA- Molecular Mechanics Generalized-Born Surface area) y la mecánica molecular Poisson-Boltzmann/área de superficie (MM/PBSA- Molecular Mechanics Poisson-Boltzmann Surface area), la cual emplea un modelo de solvatación polar/no polar y de entropía (Forouzesh & Mishra, 2021).

Los modelos para la determinación de la energía libre MM-GBSA y MM-PBSA emplean la misma función, en la cual la energía libre del ligando (L) y la energía libre de la proteína receptor (R) es estimada como un complejo RL (**ecuación 9**) (E. Wang et al., 2019).

$$\Delta G_{\text{unión}} = G_{\text{RL}} - G_{\text{R}} - G_{\text{L}} \quad \text{Ecuación 9}$$

La **ecuación 9**, es una contribución de diferentes interacciones, la cual es expresada en términos de la energía calculada mediante mecánica molecular (ΔE_{MM}) en fase gaseosa, la energía de desolvatación (ΔG_{sol}) y la entropía conformacional en el sitio de unión del sistema RL (**ecuación 10**) (E. Wang et al., 2019).

$$G_{\text{unión}} = \Delta H - T\Delta S \approx \Delta E_{\text{MM}} + \Delta G_{\text{sol}} - T\Delta S \quad \text{Ecuación 10}$$

$$\Delta E_{\text{MM}} \approx \Delta E_{\text{interna}} + \Delta E_{\text{elec}} + \Delta E_{\text{vdw}} \quad \text{Ecuación 11}$$

$$\Delta E_{\text{sol}} = \Delta G_{\text{PB/GB}} + \Delta G_{\text{SA}} \quad \text{Ecuación 12}$$

$$\Delta G_{\text{SA}} = \gamma * \text{SASA} + b \quad \text{Ecuación 13}$$

El término ΔE_{MM} incluye cambios en la energía interna ($\Delta E_{\text{interna}}$), que tiene en cuenta energías de enlaces, ángulos y diedros; también incluyen las contribuciones de las energías electrostáticas (ΔE_{elec}) y energía van der Waals (ΔE_{vdw}) (**ecuación 11**) (E. Wang et al., 2019). El término ΔG_{sol} , está compuesta por dos componentes: contribuciones polares

($\Delta G_{PB/GB}$) y contribuciones no polares ΔG_{SA} (**ecuación 12**); las contribuciones polares son calculadas usando los modelos PB y GB, mientras que las contribuciones no polares son estimadas generalmente usando el área de superficie accesible a disolventes (SASA) (**ecuación 13**) (E. Wang et al., 2019). Cada uno de los términos empleados en la determinación de la energía libre permiten hacer una aproximación al comportamiento real de los sistemas proteína-ligando, en un sistema biológico, permitiendo el desarrollo de nuevos y mejores fármacos.

El descubrimiento y desarrollo de nuevos fármacos es un proceso que tarda alrededor de 15 años; el diseño y evaluación de estructuras moleculares con actividad fármaco-biológica que pasan a la fase de ensayos preclínicos es una de las etapas que más tardan en el desarrollo de un medicamento (Vega de Leon, 2018). La constante mejora de las diversas técnicas in silico como las nombradas anteriormente, han permitido acortar las brechas de tiempo logrando evaluar grandes cantidades de datos en lapsos cortos, permitiendo una discriminación de las estructuras con posible actividad farmacológica sin necesidad de recurrir a técnicas experimentales. De esta manera, posibilita a los investigadores llevar a cabo un enfoque experimental únicamente en los compuestos que superaron las pruebas realizadas usando métodos computacionales, reduciendo el tiempo y costos de dicho proceso, facilitando el diseño de nuevos medicamentos (Sabe et al., 2021).

6 METODOLOGÍA

La metodología empleada en este trabajo de investigación se basó en el tamizaje molecular empleando técnicas computacionales. De esta manera, se analizó una base de datos de metabolitos mediante virtual screening por un modelo farmacofórico, docking molecular, energía libre MM-GBSA y dinámica molecular (**figura 5**). El sistema de filtrado fue diseñado en busca de descartar el mayor número de metabolitos empleando las técnicas in silico con menor costo computacional, permitiendo un enfoque con técnicas de mayor gasto computacional (MM-GBSA y dinámica molecular) a un grupo selecto de estructuras.

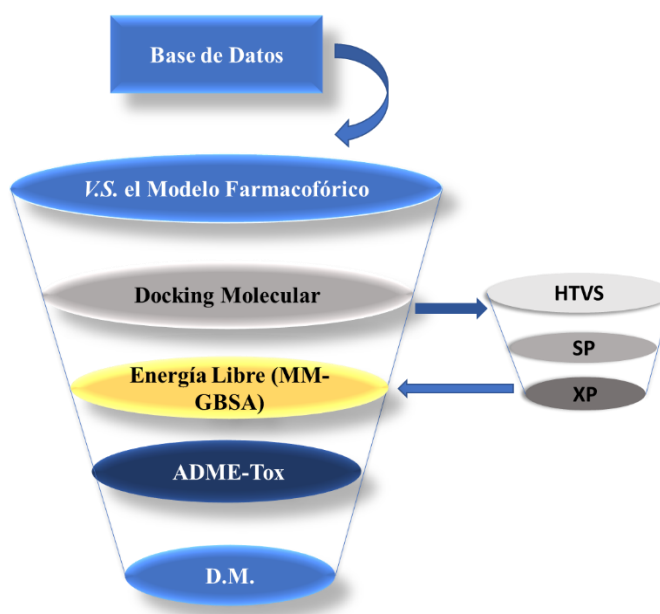


Figura 5. Esquema metodológico, estructurado en un sistema de tamizaje molecular para la posible identificación de nuevos inhibidores de la enzima COX-2.

6.1 Construcción De La Base De Datos

A partir de una revisión exhaustiva de la literatura se colectaron las estructuras químicas de metabolitos secundarios de plantas de la base de datos PubChem, en formato .sdf sin hacer ninguna discriminación por zona geográfica conservando los SMILES y códigos de referencia para su identificación.

6.2 Optimización De Las Estructura De Los Metabolitos

Cada una de las estructuras de la base de datos fue optimizada empleando el módulo LigPrep (Shelley et al., 2007) del software Maestro de Schrodinger-LLC, aplicando el campo de

fuerza OPLS_2005 para generar las estructuras tridimensionales de mayor estabilidad y ajustar los estados de protonación a pH $7,0 \pm 0,2$ con ayuda del módulo Epik. Adicionalmente, se conservó la quiralidad de cada uno de los metabolitos.

6.3 Modelo Farmacofórico y Virtual Screening Por El Modelo

Para la construcción del modelo farmacofórico se recolectaron 20 estructuras de compuestos evaluados de forma *in vitro* los cuales presentan índices de selectividad similares a los del celecoxib o rofecoxib. Adicionalmente se recopilaron 6 estructuras con índices de selectividad por debajo del fármaco de referencia (celecoxib) (ver tabla en el **anexo 1**). Las estructuras se construyeron empleando el software Maestro y fueron optimizadas empleando la misma metodología aplicada en la optimización de las estructuras recopiladas en la base de datos construida.

El modelo farmacofórico fue construido en el módulo Phase del software Maestro (Dixon, Smondryev, Knoll, et al., 2006), empleando la función Develop Pharmacophor Model en la cual se estableció como ligandos activos a las 20 estructuras con índice de selectividad similar o superior al de los fármacos de referencia (Abdellatif et al., 2021; Zhang et al., 2020; El-Sayed et al., 2011; Beswick et al., 2004; Zarghi et al., 2009; Ghodsi et al., 2010; Kalgutkar et al., 2005; Abdel-Aziz et al., 2020; El-Azab et al., 2018; Marzouk et al., 2021; Ahmadi et al., 2022; Tacconelli et al., 2002; Oniga et al., 2017; El-Husseiny et al., 2018), y se estableció como inactivos a las 6 estructuras con bajo índice de selectividad hacia la COX-2 (**anexo 1**), y adicionalmente, el número de features para la construcción del modelo farmacofórico fue establecido en un rango de 4 a 7.

El virtual screening de las estructuras recopiladas en la base de datos fue realizado empleando la función Phase Ligand Screening (Dixon, Smondryev, & Rao, 2006), configurado para discriminar las estructuras que no tuvieron coincidencia con cada una de las features del modelo farmacofórico, además, mediante la puntuación Fitness se determinaron las estructuras con mayor grado de acoplamiento al modelo. Las estructuras que coincidieron con todas las features del modelo fueron pasadas al siguiente filtro molecular.

6.4 Docking Molecular

Inicialmente en los preparativos para llevar a cabo los análisis de docking molecular se llevó a cabo la búsqueda de una estructura cristalina de la enzima COX-2 cristalizada con un AINS selectivo, además de haber sido extraída de la especie animal homo sapiens. La estructura cristalina de la enzima COX-2, junto con su ligando co-cristalizado (rofecoxib) con código de la Protein Data Bank (PDB:5KIR, resolución 2.7 Å) fue el receptor empleado en los análisis de docking molecular (Madhavi Sastry et al., 2013). La estructura con código 5KIR fue optimizada en el módulo Protein Preparation Wizard de Schrödinger, LLC Protein Preparation Tools (Shelley et al., 2007), agregando átomos de hidrógeno de acuerdo al pH fisiológico (7.0 ± 0.2), e identificando cadenas laterales y residuos faltantes, para ser completados con ayuda del módulo Prime de Schrödinger, Inc, además se corrigieron estados de protonación con el campo de fuerza OPLS_2005, con ayuda del módulo Epik (Halgren et al., 2004).

Una vez la estructura 5KIR optimizada, se empleó la función Receptor Grid Generation del software Maestro para determinar la caja o grid para ensayos de docking molecular. La caja o grid, fue ubicado en las coordenadas del sitio de unión del rofecoxib co-cristalizado con la enzima COX-2 (5KIR), estableciendo una caja cúbica con aristas de 23 Å, incluyendo todos los residuos del sitio activo de la COX-2. El receptor generado se evaluó mediante el redocking del rofecoxib, obteniendo la raíz de la desviación media cuadrática (RMSD) entre el sitio de unión del rofecoxib co-cristalizado en la estructura 5KIR y la pose obtenida del redocking del rofecoxib.

El receptor validado fue empleado en los ensayos de docking molecular en los tres modos de precisión, usando la función Ligand Docking de Glide del software Maestro. Para esto, se realizó el virtual screening de los ligandos que superaron el modelo farmacofórico en el modo de precisión HTVS, seguido por el docking en el modo de precisión SP (Halgren et al., 2004). Los resultados del docking en modo SP fueron analizados comparando los valores del Docking score e interacciones entre los residuos importantes del sitio activo (Arg513, Val523, Tyr385, Arg120, etc), seleccionando las estructuras con puntuaciones de Docking score e interacciones similares a las de los fármacos de referencia (rofecoxib y celecoxib), las cuales fueron empleadas para los análisis de docking en el modo de precisión XP.

Los análisis de docking XP fueron configurados para describir el aporte a la puntuación del GScore XP debido a las interacciones entre cada residuo aminoacídico del sitio de unión (Guedes et al., 2014; Halgren et al., 2004). Los resultados del docking XP fueron analizadas según los valores del GScore y el aporte energético realizado por los residuos Arg513, Val523, Tyr385. Posteriormente, las mejores estructuras seleccionadas según los análisis de docking XP, fueron analizadas mediante el método de energía libre MM-GBSA.

6.5 Energía Libre Por El Método Mecánica Molecular Generalizada Born/Área (MM-GBSA)

La energía libre de los complejos proteína-ligando se determinó usando el módulo Prime MM-GBSA del software Maestro de Schrödinger, LLC. Los complejos proteína ligando obtenidos del docking XP fueron analizados utilizando el campo de fuerza OPLS_2005, el modelo de solvatación VSGB; calculando la energía libre a 8 Å de distancia de cada uno de los átomos del ligando, en el sitio de unión de a la COX-2 (Mulakala & Viswanadhan, 2013).

6.6 Propiedades ADME-Tox

A estas últimas estructuras mediante el módulo QikProp del software Maestro se le estimaron las propiedades ADME-Tox, determinando los descriptores establecidos en las reglas de Lipinski, la regla de tres de Jorgensen, permeabilidad de la línea celular Caco2, entre otros, mostrados en la **tabla 2**, estableciendo de esta forma la viabilidad de dichas estructuras para ser analizadas mediante dinámica molecular.

6.7 Dinámica Molecular

Las simulaciones de dinámica molecular de los complejos proteínicos fueron realizadas en el software Desmond de la suite Schrödinger, LLC. Cada uno de los complejos COX-2/ligando fueron parametrizados empleando el campo de fuerza OPLS_2005 y solvatados en medio acuoso con el modelo explícito de aguas TIP3P, además, el sistema fue neutralizado con iones de Na⁺ o Cl⁻ de acuerdo a cada sistema, y se configuró a una temperatura de 300 K y 1 atm con un ensamble isotérmico e isobárico (NPT).

Las simulaciones fueron corridas por 200 ns con un intervalo de integración cada 200 ps, y se realizaron cuatro réplicas para el complejo COX-2/Celecoxib, y cinco réplicas para los

complejos teniendo como ligando el rofecoxib, crisina, apigenina, galangina y la 5,7-dihidroxi-3-isoprenil flavona. Adicionalmente, cada una de las réplicas fue corrida con el mismo archivo de entrada y diferentes valores de siembra (random seeds). Las energías libres fueron calculadas por el método MM-GBSA empleando las trayectorias durante el intervalo de simulación en el cual el RMSD fue más estable (Güngör et al., 2021).

7 RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

7.1 Base De Datos

Se lograron recopilar 5000 estructuras de metabolitos secundarios de plantas los cuales conformaron la base de datos, empleada en los diversos análisis realizados en esta investigación (**anexo 2**). En esta, se depositaron compuestos como el carbazol (ID:6854), ácido malvalico (10416), andrografidina (ID:11968627), crisina (ID:5281607), Buddlenol B (ID:21627696), entre otros; provenientes de especies de plantas como la *Hibiscus syriacus*, *Glycosmis mauritiana*, *Andrographis paniculat* y *Populus tremuloides*, por mencionar algunas de las especies productoras de los metabolitos recopilados en nuestra base de datos. Posteriormente se llevó a cabo el diseño del modelo farmacofórico empleado en el virtual screening de la base de datos, construido a partir de inhibidores de la COX-2 reportados en la literatura.

7.2 Modelo Farmacofórico

El modelo farmacofórico construido contiene 4 features las cuales están dadas por 2 anillos aromáticos y 2 grupos aceptores de enlaces de hidrógeno, abreviados como hipótesis AARR. La hipótesis construida empleando inhibidores reportados en la literatura y fármacos con alto índice de selectividad, encontró una relación de similitud con 16 estructuras activas, donde el mayor valor de acoplamiento fitness lo tuvieron los inhibidores rofecoxib, valdecoxib y celecoxib (3, 2,57, 2,26 respectivamente). De acuerdo con los resultados anteriores, el rofecoxib y valdecoxib se acoplan mejor al modelo farmacofórico que el celecoxib, lo cual coincide con lo reportado en la literatura sobre la selectividad (rofecoxib>valdecoxib>celecoxib) de dichos coxibs (Brune y Patrignani; 2015).

Los coxibs son compuestos con diversos efectos adversos para la salud humana, no obstante, son los inhibidores con mayor índice de selectividad por la COX-2 razón por la cual dichos compuestos fueron usados en la construcción del modelo farmacofórico, mediante el cual se

realizó el virtual screening de la base de datos en la búsqueda de metabolitos de plantas con características estructurales capaces de mantener la alta selectividad mostrada por los coxibs.

El acoplamiento de los coxibs al modelo farmacofórico se debe a dos oxígenos presentes en el grupo sulfonilo los cuales se acoplan a las feactures **A** del modelo; y a dos anillos aromáticos característicos de los coxibs envueltos en el acoplamiento con las feactures **R** del modelo (**figura 6**). Por otro lado, compuestos no selectivos de la COX-2 (inactivos) como el naproxeno e ibuprofeno se acoplaron a 3 feactures del modelo farmacofórico, mediante los oxígenos del grupo -COOH acoplados a las feactures **A**; y un anillo aromático acoplado a una de las feactures **R** (**figura 7**). Debido a esto, el virtual screening por el modelo farmacofórico fue configurado para desechar los metabolitos que no coincidieran con cada una de las 4 feactures del modelo, descartando de esta manera compuestos como el ibuprofeno y naproxeno los cuales solo se acoplan a 3 de las 4 feactures del modelo farmacofórico.

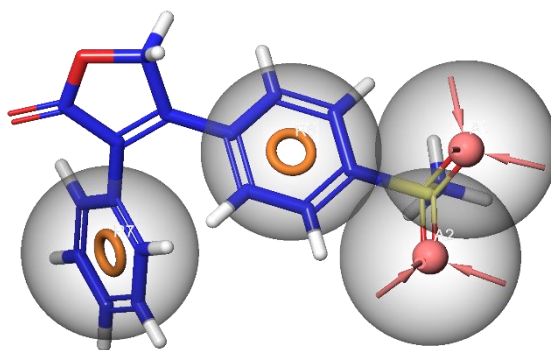


Figura 6. Modelo farmacofórico generado con las feactures AARR. La estructura de color azul representa al rofecoxib. Las esferas rosadas con flechas entrantes, representa los grupos aceptores de enlaces de hidrogeno (A), y los anillos color naranja representan los grupos aromáticos (R).

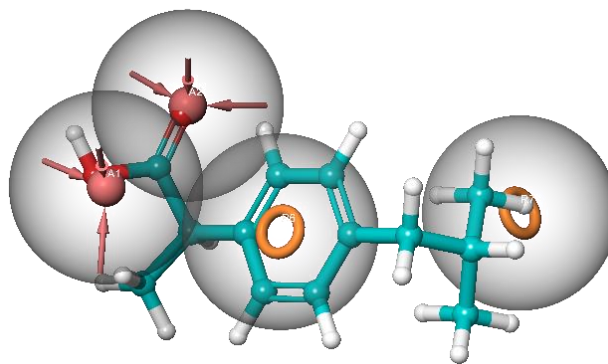
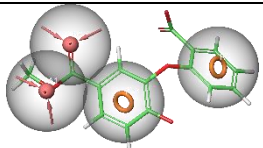
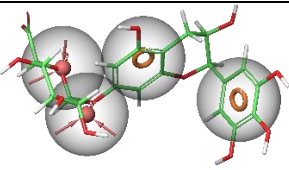
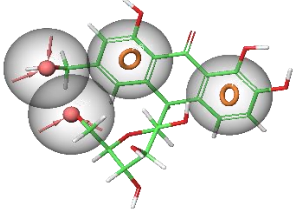
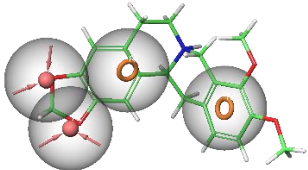
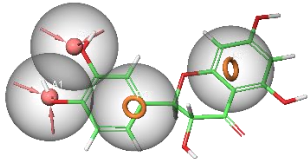


Figura 7. Acoplamiento del ibuprofeno al modelo farmacofórico. Los átomos coloreados de cian, rojo y blanco representan los carbonos, oxígenos e hidrógenos del ibuprofeno; las esferas rosadas con flechas entrantes representan los grupos aceptores de enlaces de hidrógeno (A), y los anillos color naranja representan los grupos aromáticos (R).

El virtual screening de la base de datos compuesta por 5000 metabolitos secundarios de plantas a través del modelo farmacofórico permitió descartar 3874 de los compuestos de la base de datos. En la **tabla 4**, se presentan los metabolitos identificados en la base de datos PUBCHEM con el ID 71532239, 76959109, 158096, 21171, 439533 los cuales tuvieron los valores fitness más altos, gracias a la composición de sus estructuras químicas conformadas por grupos carbonilos, éter e hidroxilo que permiten el acoplamiento a las feactures **A** del modelo farmacofórico, además de tener en su estructura principal al menos dos anillos aromáticos que facilitan el acoplamiento a las feactures **R**. De forma similar como los compuestos presentados en la **tabla 4**, un total de 1126 metabolitos hicieron matched con las 4 feactures del modelo, las cuales fueron sometidas al virtual screening de docking molecular.

Tabla 4. Metabolitos con mejor acoplamiento al modelo farmacofórico, según los valores fitness obtenidos. Los círculos de color rosa representan a las feactures **A**, y los círculos naranjas representan a las feactures **R**, indicando el acoplamiento con cada una de estas.

ID PUBCHEM	Fitness	Matched	Ligando-Farmacóforo
71532239	2,178		
76959109	2,101		
158096	2,101		
21171	2,039		
439533	1,982		

7.3 Docking molecular

Una vez realizado el virtual screening por el modelo farmacofórico, 1126 moléculas fueron evaluadas como posibles inhibidores de la enzima COX-2 mediante ensayos de docking molecular. Para esto, inicialmente se realizó el redocking del rofecoxib como método de validación de los parámetros del docking en dicha estructura cristalina. En la pose obtenida por el rofecoxib, este se acopló en un sitio de unión conformado principalmente por cuatro cadenas establecidas entre los residuos Tyr348-Tyr355; Leu384-Trp387; Arg513-Leu518; y Met522-Leu531 las cuales forman un sitio de unión altamente hidrofóbico. Sin embargo, en

dicha región se localizan residuos polares y cargados como la His90, Arg120, Gln192, Arg513 y Ser530 (**figura 8**), los cuales forman interacciones claves entre los grupos polares del rofecoxib y la COX-2. Como se observa en la **figura 8**, el rofecoxib presenta una interacción tipo puente de hidrógeno entre el grupo metilsulfonilo y la Arg513, que junto con el aporte de las interacciones de Van der Waals y electrostáticas permitieron obtener un docking GScore XP de -9,317 y un RMSD de 0,38 Å (**figura 9**) entre la posición cristalográfica del rofecoxib y la posición obtenida en el docking molecular. Según Cole et al., 2005; Hevener et al., 2009, son considerados óptimos los valores de la RMSD menores a 2 Å con respecto a la pose cristalográfica del ligando, demostrando que la metodología aplicada en este trabajo para los ensayos de docking fue óptima y satisfactoria. Por otro lado, adicional al rofecoxib en los ensayos de docking molecular se empleó como segundo fármaco de referencia al celecoxib, el cual es único inhibidor selectivo de la COX-2 aprobado por la FDA en la actualidad.

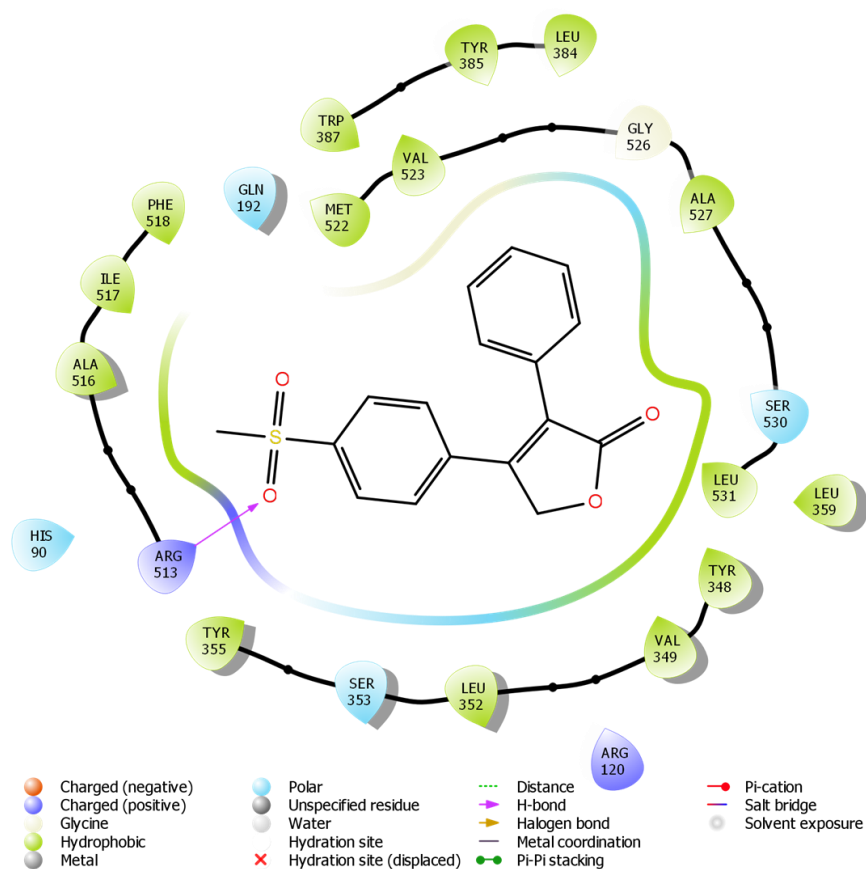


Figura 8. Pose representativa del redocking del rofecoxib en el sitio de unión de la COX-2.

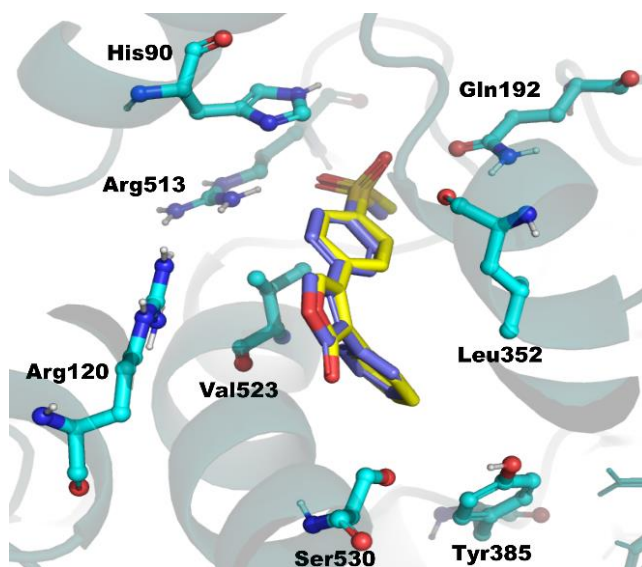


Figura 9. Superposición (RMSD) del rofecoxib en el sitio de unión estimado experimentalmente, y el sitio de unión establecido en los análisis de docking molecular. Los átomos de color cian, amarillo y morado representan los carbonos de la enzima COX-2, rofecoxib co-cristalizado con la enzima, y rofecoxib acoplado a al receptor 5KIR, respectivamente.

Por su parte, el celecoxib tuvo una puntuación GScore XP de -11,443 establecida mediante interacciones tipo puentes de hidrógeno entre el grupo sulfonamida y los residuos aminoacídicos Phe518, Leu352, Ser353 y Gln192, además de interacciones electrostáticas y de Van der Waals con los residuos Val523, Arg513, Tyr385, Trp387 y Arg120 (**figura 10**), involucrados en la inhibición selectiva de la enzima COX-2 (Taidi et al., 2022). La pose obtenida para en el celecoxib en el docking molecular, es consistente con el sitio de unión establecido por un análogo del celecoxib según los resultados de la co-cristalización de la enzima COX-2 con dicho compuesto (**figura 11**) reportado por Kurumbail Ravi G. et al., 1996, durante el estudio de la inhibición selectiva de la COX-2 , validando de esta manera la pose del celecoxib obtenida en nuestros resultados y confirmando que los parámetros del docking fueron óptimos, dando paso al virtual screening de docking molecular.

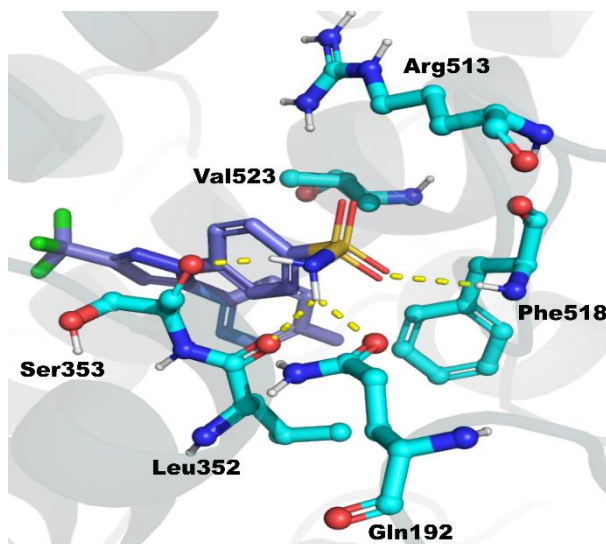


Figura 10. Pose representativa del celecoxib en el sitio de unión de la enzima COX-2 (PDB:5KIR). Los átomos con figura de sticks de color cian pertenecen a los carbonos de los residuos aminoacídicos de la proteína, y los átomos de color morado pertenecen a los carbonos del celecoxib. Las líneas punteadas en amarillo representan las interacciones tipo puentes de hidrógeno entre el celecoxib (estructura morada) y la proteína.

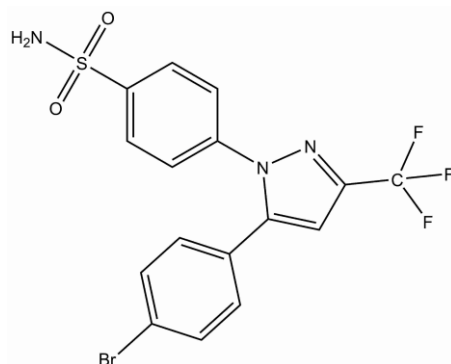


Figura 11. Análogo del celecoxib evaluado en la investigación sobre la inhibición selectiva de la COX-2, realizada por Kurumbail et al., 1996.

7.4 Virtual Screening de Docking Molecular

Los compuestos que pasaron a los análisis de docking molecular fueron cribados mediante docking HTVS, SP y XP. A través del docking HTVS fueron analizados 1126 compuestos seleccionados por el modelo farmacofórico, permitiendo descartar 759 metabolitos y dejar un total de 367 compuestos, los cuales fueron aprobados debido a sus valores de docking score. Los 367 metabolitos seleccionados mediante el docking HTVS fueron sometidos al docking SP, y los resultados obtenidos de este fueron evaluados mediante inspección visual,

donde se tuvieron en cuenta las interacciones con los residuos Arg513, Val530, Arg120 y Gln192, similares a las interacciones mostradas por el celecoxib y rofecoxib, además, valores de docking score menores a -9,00; dejando como resultado un total de 10 estructuras para ser analizadas mediante docking XP. Después de obtener los resultados del docking XP fueron descartadas 2 estructuras debido a que ninguna de las poses calculadas mejoro las puntuaciones e interacciones del docking SP, dejando como posibles candidatos los metabolitos (-)-catequina, epigallocatequina galato, cianidina 3- α -arabinósido, helioxantina, crisina, apigenina y galangina (**figura 12**) los cuales mostraron interacciones con residuos que juegan un rol importante en la inhibición de la COX-2 y puntuaciones GScore XP similares a los compuestos de referencia (**tabla 5**). Después de identificar los posibles candidatos para ser sometidos a los análisis computacionales posteriores (propiedades ADME-Tox y dinámica molecular), se llevó a cabo una revisión sobre la actividad biológica reportada de dichos compuestos, en busca de información que ayudara a validar o descartar los metabolitos identificados en este punto de la investigación.

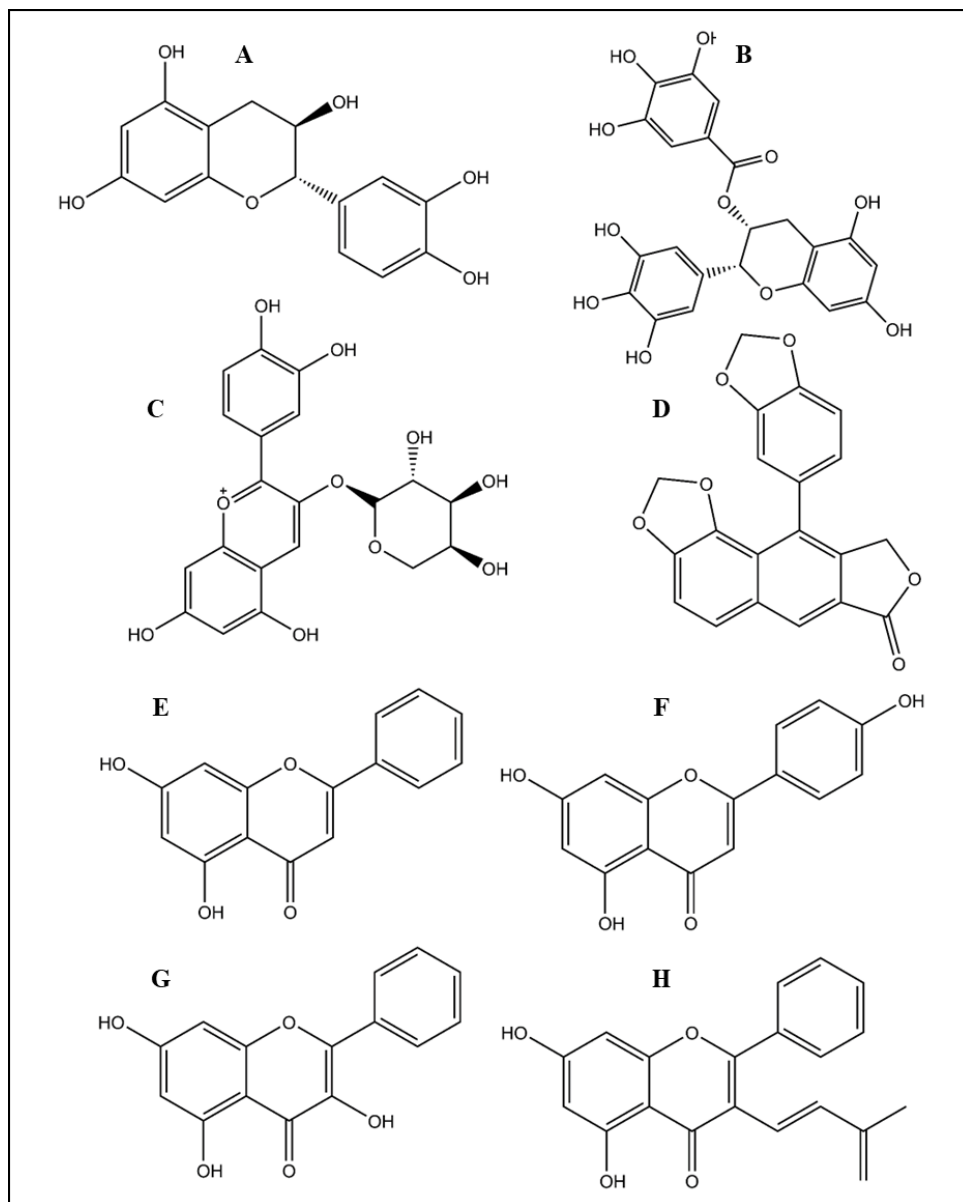


Figura 12. Metabolitos identificados con posible efecto inhibitorio frente a la COX-2; donde **A)** es la estructura química de la (-)-catequina, **B)** epigallocatequina galato, **C)** cianidina 3- α -arabinósido, **D)** helioxantina, **E)** crisina, **F)** apigenina, **G)** galangina **H)** corresponde al metabolito 5,7-dihidroxi-3-isoprenil flavona.

Tabla 5. Resultados de las puntuaciones de energía e interacciones COX-2/Ligando determinadas mediante los análisis del docking XP.

Ligando	XP Gscore	Interacciones Proteína-Ligando	
		Puentes de Hidrógeno	π - π
(-)-Catequina	-10,563	His90, Gln192, Tyr385, Ser530	
Epigallocatequina galato	-10,001	Arg120, Tyr385, Phe518	Tyr355
Cianidina 3- α -arabinósido	-9,505	Gln192, Phe518, Tyr355	
Helioxantina	-10,076	Arg120, Ser530	Tyr355
Crisina	-9,017	His90, Gln192, Tyr355, Arg513, Phe518	Trp387
Apigenina	-10,483	His90, Gln192, Leu352, Tyr355, Arg513, Phe518, Ser530	
Galangina	-9,943	His90, Gln192, Tyr355, Arg513, Phe518	Trp387
5,7dihidroxi-3-isoprenil flavona	-10,466	His90, Gln192, Tyr355, Arg513, Phe518	
Rofecoxib (Referencia)	-9,317	Arg513	
Celecoxib (Referencia)	-11,526	Gln192, Leu352, Ser353, Phe518	

Durante la revisión bibliográfica se pudo encontrar que los metabolitos (-)-catequina; epigallocatequina galato; cianidina 3- α -arabinosa; helioxantina; crisina; apigenina y galangina han sido evaluados en modelos experimentales *in vivo* e *in vitro* demostrando que presentan las siguientes actividades biológicas.

7.4.1 Catequina y epigallocatequina galato

Según Oriakhi & Orumwensodia, 2021 la catequina (**figura 12-A**) en combinación 1:1 con el ácido gálico mostró efecto regulador de lesiones hepáticas inducidas por tetracloruro de carbono (CCl₄) en ratas, mediante la regulación de citoquinas proinflamatorias y proteínas inflamatorias como la COX-2, no obstante, de acuerdo con lo reportado por Sookvanichsilp & Poemsantitham la catequina no presentó efecto anti proliferativo sobre las líneas celulares MCF-7 y LTED MCF-7 en comparación con el diclofenaco y el celecoxib los cuales son

inhibidores de la COX-2. Por otro lado, el derivado de la catequina con mayor actividad biológica es la epigallocatequina galato (**figura 12-B**), la cual presenta actividad anti proliferativa sobre la línea celular MCF-7 según Huang et al., 2017, sin embargo, se ha reportado como un inhibidor de la expresión de la enzima óxido nítrico sintasa (iNOS) y COX-2 a través de la inhibición de la fosforilación y degradación de la proteína I κ B α , impidiendo de esta manera la activación del factor de transcripción NF- κ B involucrado en la transcripción del ADN (Ahmed et al., 2002). La evidencia científica demuestra que la epigallocatequina galato tiene efecto antiinflamatorio debido a la inhibición de la expresión de genes involucrados en la expresión de proteínas como iNOS, COX-2 e IL-1 β , demostrando que su efecto antiinflamatorio no está vinculado con la vía de las ciclooxygenasas, motivo por el cual dichos metabolitos fueron descartados en este punto de la investigación.

7.4.2 Cianidina 3- α -arabinósido

La cianidina 3- α -arabinósido es un metabolito perteneciente a la familia de las antocianinas, las cuales son características por tener en su estructura un átomo de oxígeno trivalente (O⁺) como se puede observar en la **figura 12-C**, además de estar asociada con tener efectos antioxidantes, antiinflamatorios y anticáncer (Hou et al., 2005). Según Mulabagal et al., 2007 derivados de la cianidina 3- α -glucosil inhibieron a la COX-2 en porcentajes superiores a la COX-1, no obstante, ninguno de los compuestos evaluados tuvo porcentajes de inhibición cercanos al fármaco de referencia (celecoxib). Por otro lado, se ha demostrado que las antocianinas tienen poder antiinflamatorio debido a la inhibición del factor nuclear κ B (NF- κ B) y citoquinas proinflamatorias, además, se ha reportado que la inhibición de la enzima NF- κ B es logrado gracias a la activación de la proteína Nrf2 involucrada en la expresión de genes con efecto antioxidante, así como también por inhibir de forma directa proteínas proinflamatorias como la COX-2 e iNOS (Hwang et al., 2011; Karlsen et al., 2007). Las diversas investigaciones llevadas a cabo empleando modelos experimentales *in vivo* e *in vitro*, revelan que las cianidinas muestran efecto antiinflamatorio a través de mecanismos como los mencionados anteriormente, sin embargo, han mostrado habilidad para inhibir a la COX-1 (Seeram et al., 2005) y adicionalmente su efecto antiinflamatorio no se aproxima al del celecoxib, razones por las cuales fueron descartadas las cianidinas como objeto de nuestra investigación.

7.4.3 Helioxantina

La helioxantina (**figura 12-D**) y derivados de este, tienen actividad antiviral sobre la línea celular HepA2 mediante la supresión de la enzima HBsAg diana principal de los fármacos antivirales de la hepatitis B (Janmanchi et al., 2013). Por otro lado, derivados de la helioxantina mostraron actividad sobre la regeneración ósea; según Amano et al., 2019 se observaron cantidades elevadas de óxido nítrico (NO) que inhibe la actividad de osteoclastos involucrados en la pérdida de tejido óseo, sin embargo, la síntesis de NO es llevada a cabo por proteínas proinflamatorias como la enzima inducible iNOS, la cual es la vía principal por la cual se lleva a cabo la síntesis de NO a partir de la helioxantina y su derivados nitrogenados, permitiéndonos inferir que dichos compuestos están asociados con reacciones opuestas a las de los antiinflamatorios no esteroideos motivo por el cual se descartó dicho metabolito de nuestra investigación.

7.4.4 5,7-dihidroxi flavonas

Finalmente se identificó a la crisina (**figura 12-E**), apigenina (**figura 12-F**), galangina (**figura 12-G**) y 5,7-dihidroxi-3-isoprenil flavona (**figura 12-H**), un conjunto de metabolitos con estructuras análogas pertenecientes a la familia de las 5,7-dihidroxi flavonas. Durante la revisión bibliográfica no se halló reporte sobre la actividad antiinflamatoria del metabolito 5,7-dihidroxi-3-isoprenil flavona, sin embargo, la crisina, apigenina y galangina han sido asociadas con tener actividad inhibitoria frente a la COX-2. Los resultados del docking molecular de los metabolitos de interés mostraron interacciones tipo puentes de hidrógeno con los residuos aminoacídicos His90, Gln192, Leu352, Tyr355, Arg513, Phe518 y Ser530 e interacciones de tipo π - π presentadas por la crisina y galangina con el residuo Trp387 (**figura 13**). Además, las puntuaciones de docking GScore XP fueron -9,017, -9,943, -10,483 y -10,466 para los metabolitos crisina, galangina, apigenina y 5,7-dihidroxi-3-isoprenil flavona, respectivamente (**tabla 5**), las cuales en comparación con las puntuaciones GScore XP obtenidas por el rofecoxib y celecoxib, sugieren que las flavonas podrían inhibir de forma selectiva a la enzima COX-2.

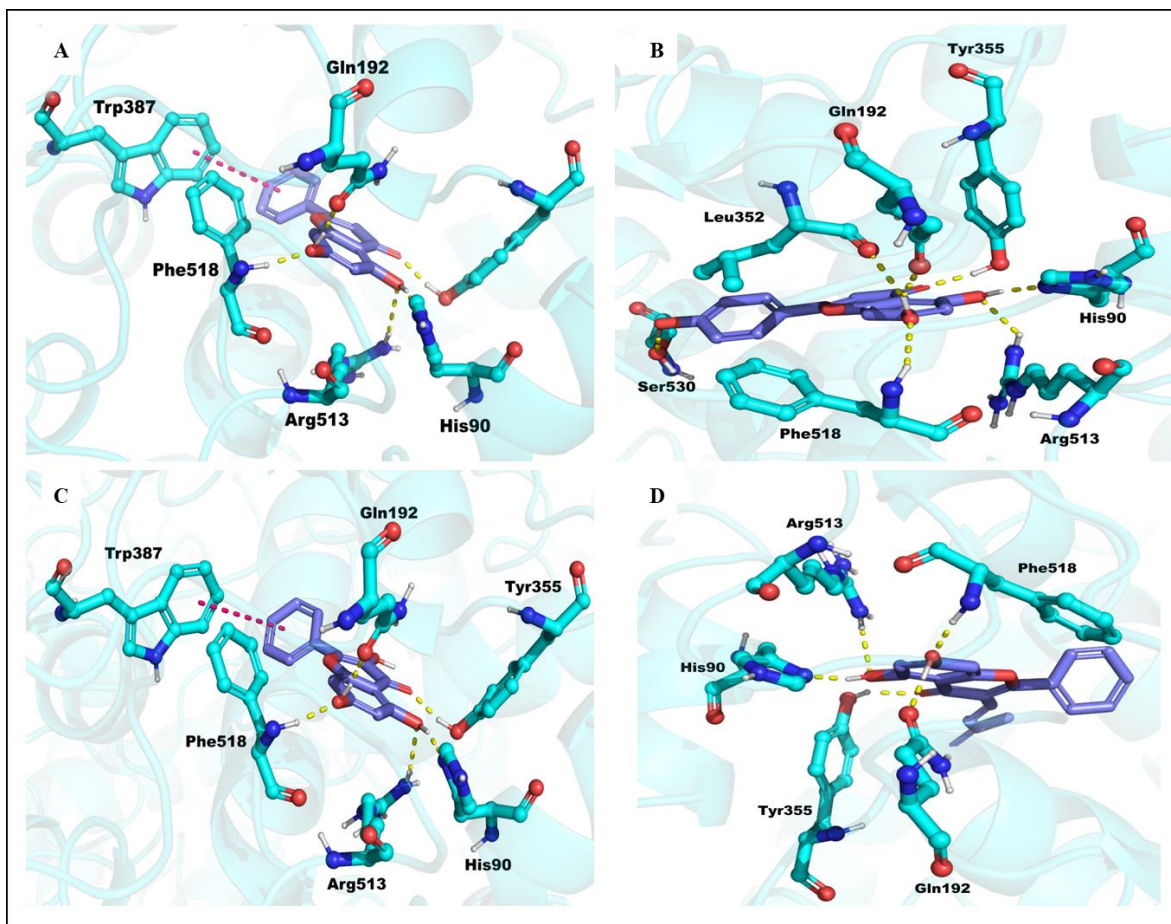


Figura 13. Pose representativa de los ligandos A) crisina, B) apigenina, C) galangina y D) 5,7-dihidroxi-3-isoprenil flavona, en el sitio catalítico de la enzima COX-2 (PDB:5KIR).

Los átomos con figura de sticks de color cian pertenecen a los carbonos de los residuos aminoácidos de la proteína, y los átomos en morado pertenecen a los carbonos de los metabolitos; las líneas punteadas en amarillo representan las interacciones tipo puentes de hidrogeno y las líneas de color fucsia representan las interacciones π - π .

7.4.4.1 Crisina

De acuerdo con lo reportado por Cho et al., 2004 derivados de la crisina sustituidos en las posiciones 5 y 7 mostraron ser 10 veces más selectivos por la COX-2 que por la COX-1 según los ensayos *in vitro* (Cho et al., 2004); Dao et al., 2004 reportó que derivados de la crisina lograron inhibir hasta en un 97.4% la síntesis de prostaglandina E_2 (PGE_2) llevada a cabo por la acción catalítica de la COX-2. Adicionalmente, un derivado de 1,5-diarilpirazol y crisina tuvo un índice de selectividad con respecto a la COX-2 mayor que el del celecoxib ($SI_{derivado}=206.45$; $SI_{celecoxib}=130.25$) (Ren et al., 2018), lo que demuestra que análogos de la

crisina (5,7-dihidroxi flavona) como la apigenina son de alta importancia en el desarrollo de AINS selectivos.

7.4.4.2 Apigenina

La apigenina en una dosis de 20 μ M logró la reducción de la proliferación de células tumorales inducidas por DMBA/TPA en piel de ratones, mecanismo asociado principalmente con la inhibición selectiva de la COX-2 y receptores de prostaglandina EP₁ y EP₂ que promueven la diferenciación terminal inhibiendo la proliferación de células tumorales, además, dosis de 20 μ M inhibieron de forma completa las prostaglandinas de tipo PGE₁ las cuales son sintetizadas por la acción catalítica de la COX-2 y son el principal mediador en la respuesta inflamatoria (Kiraly et al., 2016). Los resultados experimentales mencionados anteriormente, sugieren que la apigenina es una alternativa viable en el desarrollo de nuevos inhibidores de la COX-2.

7.4.4.3 Galangina

Por otro lado, según Honmore et al., 2016 extractos etanólicos de *Alpinia officinarum* con contenido de galangina redujeron de forma significativa la inflamación causada por un edema inducido por carragenina en ratas; adicionalmente, los estudios de docking molecular muestran que dicho efecto antiinflamatorio sobre el edema se debe a la inhibición de la COX-2 por acción de la galangina. Por otro lado, se demostró que la galangina pudo reducir las convulsiones inducidas por PGE₂/PTZ suministradas sobre la corteza cerebral en ratones, lo cual sugiere que dicho metabolito inhibe la producción de prostanoïdes asociados con la acción catalítica de la enzima COX-2, permitiendo establecer que la galangina un derivado de la 5,7-dihidroxi flavona tiene la capacidad de modular el efecto catalítico de la COX-2 (de Zorzi et al., 2019).

7.4.4.4 5,7-dihidroxi-3-isoprenil flavona

El metabolito 5,7-dihidroxi-3-isoprenil flavona fue reportado por primera vez por Sutradhar et al., 2008 durante el estudio de extractos de la planta *Sida cordifolia*, donde el efecto antiinflamatorio de este metabolito fue evaluado experimentalmente a través de la inducción de un edema por carragenina en ratas, mostrando una reducción del 56,92% del edema. Por otro lado, nuestros resultados mostraron que el docking molecular de la 5,7-dihidroxi-3-isoprenil flavona tuvo una puntuación GScore XP de -10,466, la cual indica una posible

mayor afinidad que la puntuación obtenida por el rofecoxib (-9,317), crisina (-9,017) y galangina (-9,943). Además, dicho metabolito mostró interacciones tipo puentes de hidrógeno entre los residuos His90, Gln192, Tyr355, Arg513 y Phe518, los cuales se observaron en las poses obtenidas por el rofecoxib y celecoxib (**figura 13-D**). De acuerdo con Ferreira et al., 2017 los extractos de la planta *Sida cordifolia* (50 µg/ml) permitieron reducir la producción de PGE₂ en un 69,08 %, efecto atribuido principalmente a la vía de la COX, y posibles inhibidores selectivos de la COX-2 presentes en dicho extracto.

La evidencia anteriormente presentada sobre la actividad biológica de las flavonas como inhibidores de la COX-2, junto con los resultados obtenidos computacionalmente en esta investigación, nos llevó a un enfoque en busca de establecer la eficacia y selectividad del metabolito 5,7-dihidroxi-3-isoprenil flavona como posible inhibidor de la COX-2, en comparación con la crisina, apigenina y galangina. Para esto, inicialmente los cuatro metabolitos y los compuestos de referencia fueron evaluados mediante la estimación de la energía libre por el método MM-GBSA de las mejores poses obtenidas mediante el docking molecular.

7.5 Energía Libre Por El Método MM-GBSA De Las Poses Obtenidas Mediante Docking Molecular

Como se observa en la **tabla 6**, las energías libres de los fármacos de referencia el celecoxib y rofecoxib fueron de -65,25 y -71,33 kcal/mol, respectivamente, las cuales son más consistentes que las puntuaciones obtenidas en el docking XP debido a que el rofecoxib tiene mayor afinidad por la COX-2 en comparación con el celecoxib, según lo reportado por Ahmadi et al., 2022. Respecto a los metabolitos de plantas, la energía libre de la crisina -45,68 kcal/mol y apigenina -45,17 kcal/mol fue mayor a las energías libres de la galangina -53,52 kcal/mol y el metabolito 5,7-dihidroxi-3-isoprenil flavona -75,03 kcal/mol, sugiriendo que estos dos últimos son más afines al sitio de unión de la COX-2. Además, el metabolito 5,7-dihidroxi-3-isoprenil flavona mostró mejor energía libre que los fármacos de referencia (**tabla 6**), indicando que podría llegar a ser un posible inhibidor selectivo de la enzima COX-2.

Tabla 6. Energías libres de enlace para cada uno de los metabolitos de interés y compuestos de referencia, estimadas por el método MM-GBSA.

Ligando	Energía Libre (kcal/mol)
Crisina	-45,68
Apigenina	-45,17
Galangina	-53,52
5,7-dihidroxi-3-isoprenil Flavona	-75,03
Rofecoxib (referencia)	-71,33
Celecoxib (referencia)	-65,25

Una vez analizados los resultados obtenidos de docking y energía de afinidad, se pudo evidenciar que la galangina y el metabolito 5,7-dihidroxi-3-isoprenil flavona tienen una mayor afinidad que la crisina y apigenina, lo cual nos llevó a plantear la hipótesis que los sustituyentes presentes en el carbono 3 (C-3) de dichos metabolitos (**figura 14**) juegan un rol importante en la estabilidad de acoplamiento a la enzima COX-2, además, la naturaleza química del sustituyente es fundamental para lograr alcanzar cavidades hidrofóbicas específicas de la COX-2. Adicionalmente se planteó que los sustituyentes ubicados en el C-3 conformados por hidrocarburos alifáticos podrían mejorar la estabilidad de las 5,7-dihidroxi flavonas en el sitio activo de la COX-2, en comparación con grupos polares.

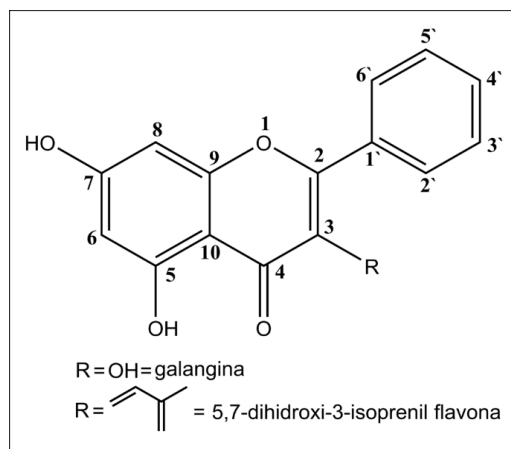


Figura 14. Estructura química de los metabolitos sustituidos en el carbono 3 de la 5,7-dihidroxi flavona.

En busca de corroborar la hipótesis anteriormente planteada se llevó a cabo el análisis de una serie de análogos de la 5,7-dihidroxi flavona con diversos sustituyentes en el **C-3**, nombrados como análogos **M-1**, **M-2**, **M-3**, **M-4**, **M-5**, **M-6** y **M-7**, mostrados en la **figura 15**. Los sustituyentes fueron planteados con fines de hacer una aproximación de las características que deben tener los sustituyentes para mejorar la acción inhibitoria frente a la COX-2, por lo cual se propusieron estructuras de hidrocarburos alifáticos con insaturaciones como los derivados **M-1** y **M-2**, hidrocarburos con grupos cíclicos e insaturaciones como los derivados **M-7** y **M-4** e hidrocarburos alifáticos saturados como el derivado **M-3**. Adicionalmente, se propusieron los derivados **M-5** y **M-6** los cuales tienen grupos polares alifáticos y cíclicos, que permitió determinar si se logran interacciones con los residuos aminoácidos con cadena lateral polar.

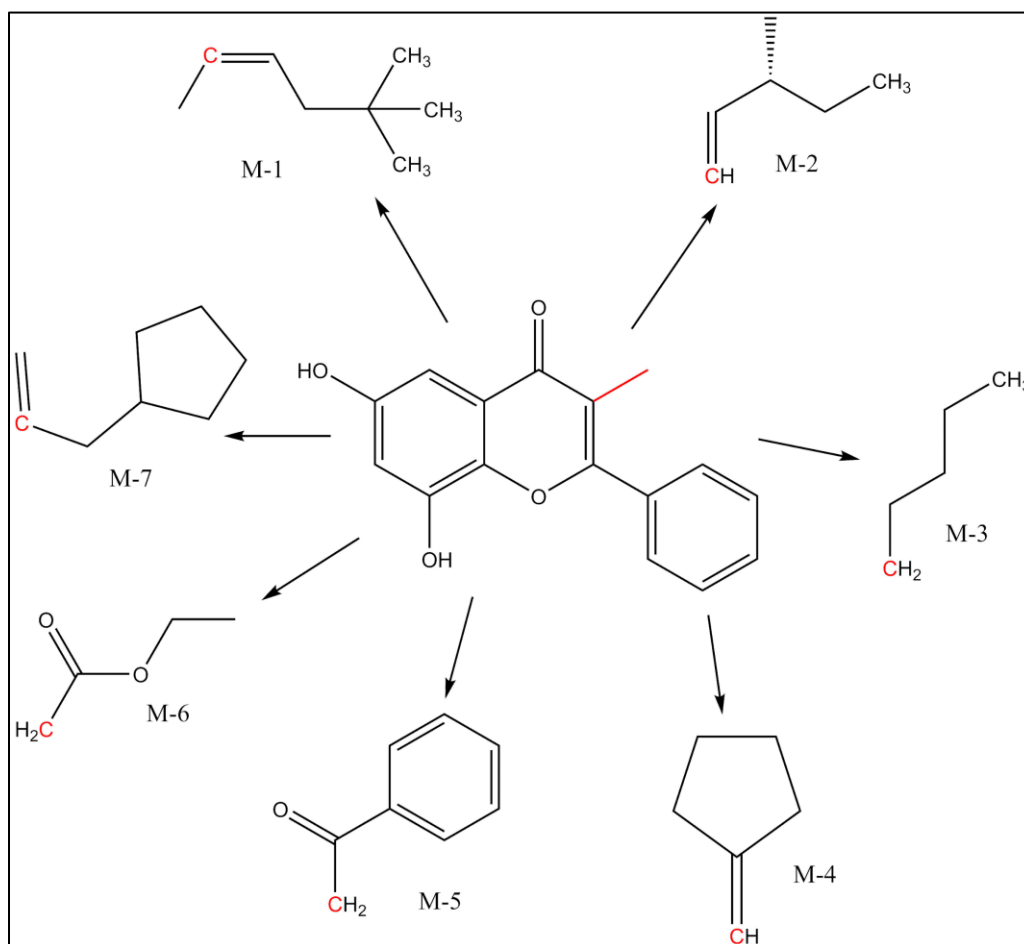


Figura 15. Análogos de la crisina (5,7-dihidroxi flavona) sustituidos en el carbono 3 (C-3) y nombrados como **M-1**, **M-2**, **M-3**, **M-4**, **M-5**, **M-6** y **M-7**.

Curiosamente los resultados obtenidos del docking XP indicaron que los derivados con sustituyente con estructuras cíclicas tuvieron peores valores en las puntuaciones de docking score, en comparación con los derivados con sustituyentes en el **C-3** con cadenas alifáticas. Posiblemente esto se debe a que la posición en la cual se orientan dichos derivados dentro del sitio activo de la COX-2, dirige los grupos polares hacia regiones hidrofóbicas conformadas por residuos aminoacídicos como la Val523, Val349, Tyr348, Met522, Phe518, entre otros, de modo que hace inestable el acoplamiento de dichas estructuras en el sitio activo de la COX-2, lo cual fue evidenciado en la pose obtenida del docking XP del derivado **M-5** (**figura 16**), y la posible razón por la que el derivado **M-4** fue descartado en los análisis de docking debido a que obtuvo una puntuación en el docking score mayor a cero.

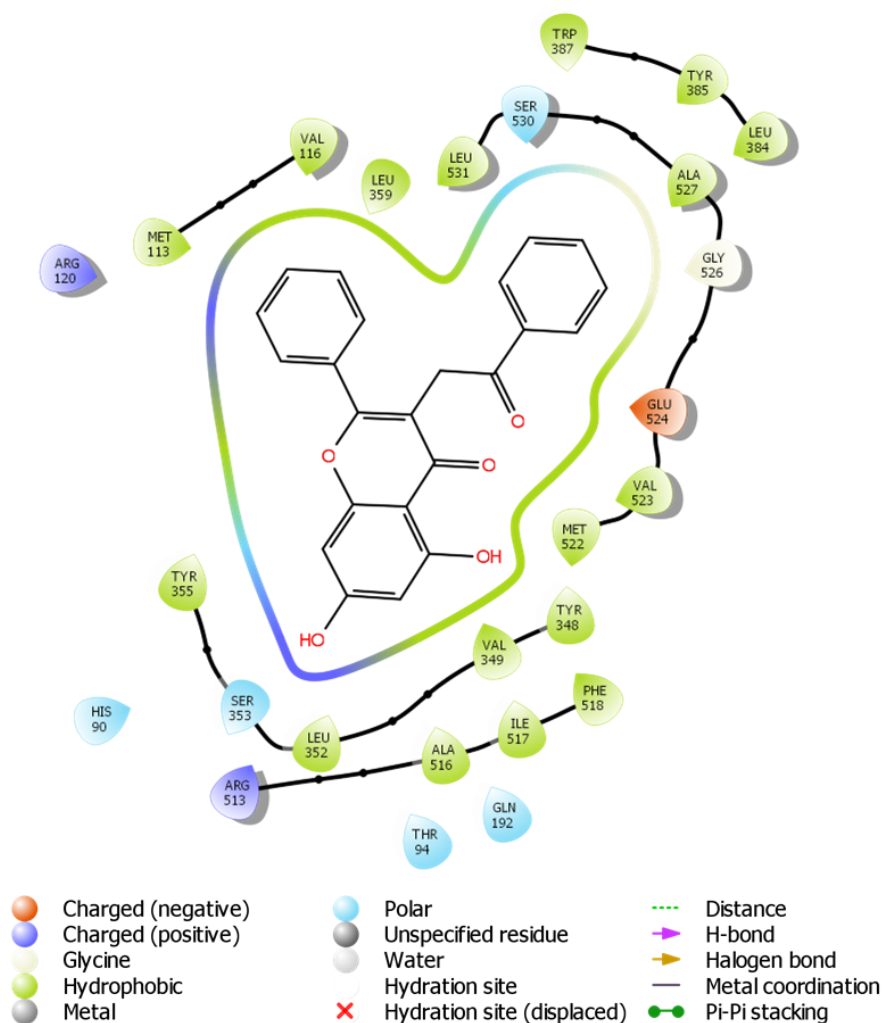


Figura 16. Pose representativa del docking XP del derivado **M-5**, estructura sustituida en **C-3** con un grupo cíclico.

Contrario a los resultados observados para los derivados con sustituyentes cíclicos, los derivados con sustituyentes alifáticos mostraron mejores resultados en las puntuaciones GScore XP. Los derivados **M-1** y **M-2** presentaron interacciones mediante puentes de hidrogeno con los residuos His90, Gln192, Tyr355, Arg513 y Phe518 (**figura 17**), las cuales fueron establecidas por los compuestos de referencia y el metabolito 5,7-dihidroxi-3-isoprenil flavona, lo que permitió obtener puntuaciones de docking XP y valores de energía libre similares al rofecoxib y celecoxib.

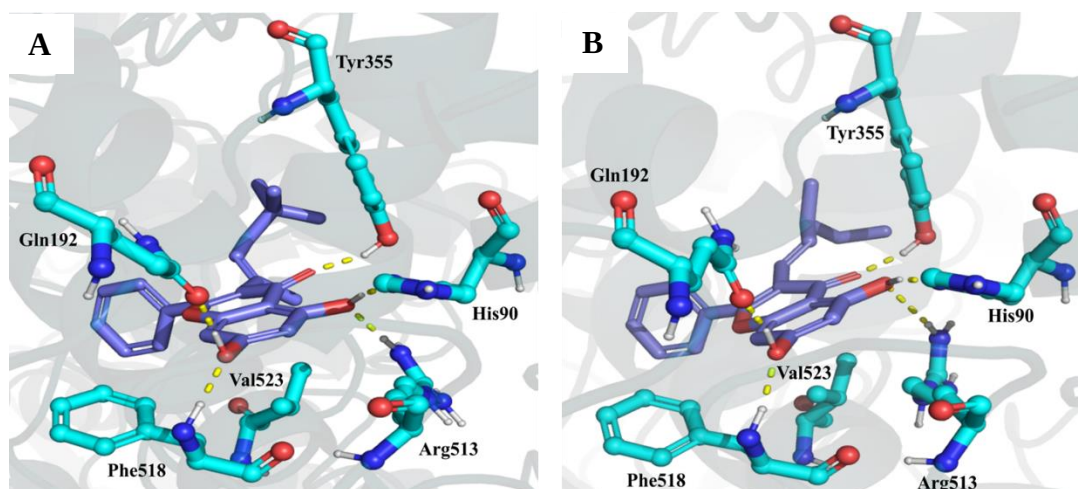


Figura 17. Pose representativa de los ligandos A) **M-1** y B) **M-2**, en el sitio catalítico de la enzima COX-2 (PDB:5KIR). Los átomos con figura de sticks de color cian pertenecen a los carbonos de los residuos aminoácidos de la proteína, y los átomos en morado pertenecen a los carbonos de los metabolitos; las líneas punteadas en amarillo representan las interacciones tipo puentes de hidrogeno.

En la **tabla 7** se presenta los valores de las puntuaciones de docking XP y energía libre de las poses obtenidas por los derivados. El docking molecular y energía libre por el método MM-GBSA indicaron que el compuesto **M-1** tuvo una puntuación de docking GScore XP de -10,897, siendo esta la mejor puntuación de los derivados diseñados, mostrando incluso mejor puntuación de docking que las flavonas identificadas en esta investigación y que el rofecoxib (**Tabla 6**). Por otro lado, el compuesto **M-2** tuvo un valor de energía libre de -105,62 kcal/mol siendo esta la mejor energía libre de los 7 derivados, además de presentar una mejor energía libre que las flavonas identificadas y los compuestos de referencia (**tabla 7**).

Tabla 7. Puntuaciones del docking XP y valores de las energías libres de cada uno de los derivados de la 5,7-dihidroxi flavona sustituidos en el C-3.

Estructura	GScore XP	Energía Libre (kcal/mol)
M-1	-10,897	-104,64
M-2	-10,795	-105,62
M-3	-10,43	-67,62
M-4	>0	-
M-5	-10,209	-37,83
M-6	-10,375	-65,75
M-7	-7,682	-

-Energías no estimadas debido a los altos valores obtenidos en las puntuaciones del docking XP.

Los resultados obtenidos de la energía libre y puntuaciones del docking XP mostraron que los derivados con grupos polares como los compuesto **M-5** y **M-6** tuvieron una energía de -37,83 y -65,75 kcal/mol respectivamente, peores en comparación con los derivados sustituidos con grupos no polares como los derivados **M-1**, **M-2** y **M-3** los cuales tuvieron energías libres de -104,64, -105,62 y -67,62 kcal/mol respectivamente. Por otro lado, los compuestos con sustituyentes con grupos cíclicos como los derivados **M-4**, **M-5** y **M-7** presentaron energías libres altas en comparación con los derivados con grupos no polares y alifáticos como los derivados **M-1**, **M-2** y **M-3**, sugiriendo que estos últimos presentan mayor afinidad por la enzima COX-2, lo cual es un indicio que ayuda a soportar la hipótesis planteada anteriormente. No obstante, con los métodos empleados hasta este punto de la investigación no se podría afirmar que la hipótesis planteada sobre la optimización de las 5,7-dihidroxi flavonas con sustituciones en el **C-3**, por grupos no polares y alifáticos es totalmente acertada. Por esto, los metabolitos 5,7-dihidroxi-3-isoprenil flavona, apigenina, galangina, crisina, rofecoxib, celecoxib y el derivado **M-2** fueron sometidos a análisis mediante dinámica molecular, sin embargo, previamente se llevó a cabo el cálculo de las propiedades ADME-Tox, como medio para corroborar que las estructuras propuestas como posibles inhibidores selectivos de la COX-2 presentan viabilidad farmacológica.

7.6 Propiedades ADME-Tox

Los metabolitos seleccionados estuvieron dentro de los rangos establecidos de aprobación de los 4 descriptores establecidos en las reglas de Lipinski, que permiten establecer una relación entre la solubilidad en medio acuoso y la capacidad para permear de forma pasiva las membranas celulares (Benet et al., 2016). Por otro lado, el celecoxib y el compuesto M-7 tuvieron valores por fuera del rango establecido para el descriptor QPlogS asociado con la solubilidad en medio acuoso, sin embargo, las flavonas crisina, apigenina, galangina y 5,7-dihidroxi-3-isoprenil flavona no violaron ninguna de las 3 reglas establecidas por Jorgensen. Por su parte, el metabolito 5,7-dihidroxi-3-isoprenil flavona tuvo una puntuación de 565,639 en el descriptor QPPCaco superior a sus metabolitos análogos y fármacos de referencia, indicando que tiene una alta habilidad para permear la línea celular Caco-2 asociada con la capacidad para atravesar las membranas del intestino delgado (**anexo 3**) (Van Breemen & Li, 2005).

La permeabilidad de la línea celular Caco-2 puede vincularse con la absorción de fármacos administrados por vía oral y de acuerdo con los resultados mencionados anteriormente (Paixão et al., 2010), todos los ligandos evaluados mostraron valores altos en los descriptores de absorción oral, además, la 5,7-dihidroxi-3-isoprenil flavona indicó un 100% de absorción oral siendo este el único metabolito en alcanzar dicho porcentaje de absorción. Los coeficientes de reparto cerebro/sangre (QPlogBB) de todos los ligandos evaluados en esta investigación incluyendo los compuestos de referencia tuvieron valores negativos, lo cual indica que no permean la barrera hematoencefálica y por lo tanto no representan un riesgo a nivel cerebral (Y. J. Li et al., 2021). Por otro lado, todos los ligandos tuvieron valores dentro del rango óptimo de enlace a albúmina sérica (QPlogKhsa), lo cual sugiere que no se enlazan a proteínas séricas y por lo tanto incrementa la posibilidad de permear las membranas celulares (Hage-Melim et al., 2020). Por último, todos los compuestos evaluados mostraron valores dentro del rango que no causan preocupación sobre el efecto del bloqueo de los canales HERG K⁺, indicando que no poseen cardiotoxicidad asociada al bloqueo de dichos canales (**anexo 4**) (Vandenberg et al., 2012).

De acuerdo con los resultados mencionados anteriormente para cada uno de los descriptores empleados en la evaluación de las propiedades ADME-Tox, se puede afirmar que los metabolitos de interés y en particular el metabolito 5,7-dihidroxi-3-isoprenil flavona tienen

viabilidad farmacológica como lo soportan los resultados de la medición de las propiedades ADME-Tox, justificando de esta manera los ensayos realizados empleando simulaciones de dinámica molecular.

7.7 Dinámica Molecular

Las simulaciones de dinámica molecular permiten evaluar el comportamiento de un complejo proteína-ligando a través del tiempo, dando como resultado un perfil de estabilidad durante el tiempo de simulación, el cual está dado por la desviación de la raíz media cuadrática (RMSD) y registra las desviaciones de la posición inicial del ligando durante la simulación (Kulkarni et al., 2022), facilitando un análisis de estabilidad basado en las fluctuaciones con respecto a la posición inicial del ligando (De Vivo et al., 2016). Como se observa en la **figura 16**, las simulaciones de dinámica molecular para los complejos de referencia COX-2/rofecoxib y COX-2/celecoxib indican valores de RMSDs con fluctuaciones similares a las registradas por la apoproteína (**Figura 16**). Adicionalmente después de haberse estabilizado el movimiento de los residuos aminoacídicos una vez iniciadas las simulaciones, las fluctuaciones más grandes registradas para el celecoxib y rofecoxib fueron de 0,765 y 0,374 Å, respectivamente, definiendo el rango de fluctuación dentro del cual deben estar los residuos aminoacídicos de los complejos teniendo como ligando a los metabolitos evaluados y el derivado **M-2**.

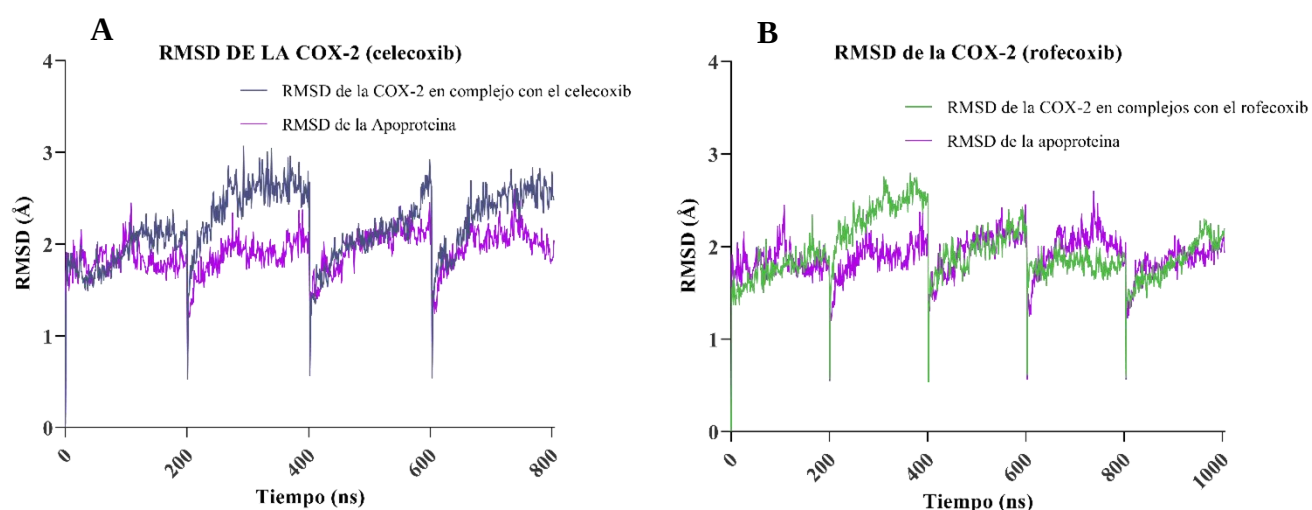


Figura 16. RMSD de las fluctuaciones de los residuos aminoacídicos de la enzima COX-2 después de la unión de los compuestos de referencia A) celecoxib y B) rofecoxib (200 ns por réplica).

En cuanto a los valores de RMSD de los complejos teniendo como ligando la 5,7-dihidroxi-3-isoprenil flavona, apigenina, crisina, galangina y el derivado M-2 presentaron fluctuaciones de 0,515, 0,347, 0,374, 0,390 y 0,426 Å, respectivamente (**tabla 8**). Los metabolitos y el derivados **M-2** tuvieron fluctuaciones en el sitio activo menores a las registradas por los compuestos de referencia, sugiriendo que los residuos aminoacídicos del sitio de unión se reajustan y se estabilizan después del acoplamiento de los metabolitos durante la dinámica molecular como lo demuestran los RMSDs presentados en la **figura 17**.

Tabla 8. Fluctuaciones más grandes registradas por los carbonos alfa de los residuos aminoacídicos de la COX-2, teniendo en cuenta todas las réplicas realizadas.

Compuesto	Mayor fluctuación (Å)
Celecoxib	0,765
Rofecoxib	0,374
5,7-dihidroxi-3-isoprenil flavona	0,515
Apigenina	0,347
Crisina	0,374
Galangina	0,39
M-2	0,426

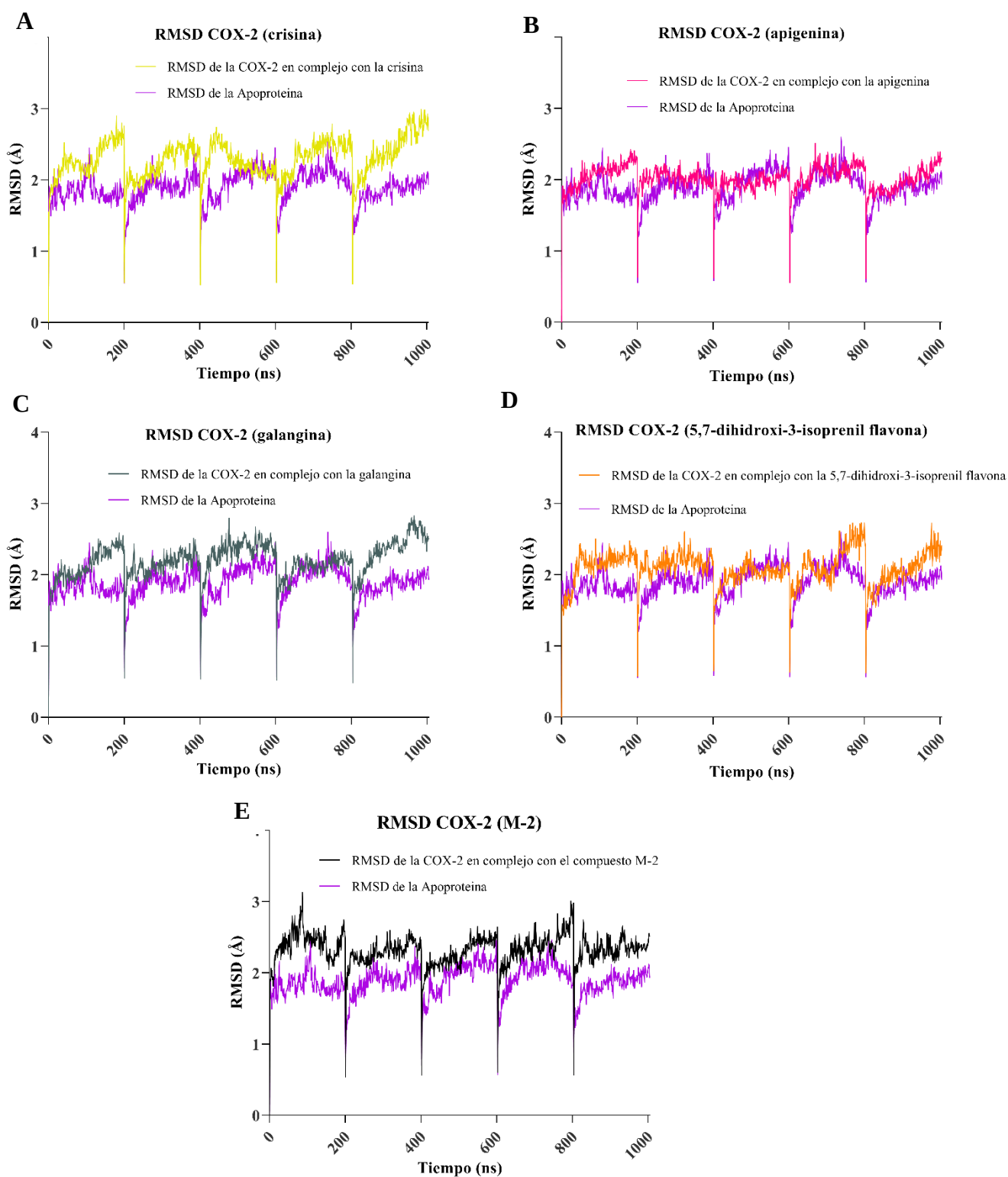


Figura 17. RMSD de las fluctuaciones de los carbonos alfa de la enzima COX-2 después del acoplamiento de la A) crisina, B) apigenina, C) galangina, D) 5,7-dihidroxi-3-isoprenil flavona y E) M-2 en comparación con la apoproteína (200 ns por réplica).

Las fluctuaciones registradas por los residuos aminoacídicos de la COX-2 mostraron que la proteína no sufre ninguna desnaturalización conservando su actividad catalítica, sugiriendo que los metabolitos se acoplan de forma estable. La fluctuación más grande mostrada en el RMSD del celecoxib y rofecoxib fue de 0,681 y 0,975 Å (**figura 18**), mientras que la 5,7-dihidroxi-3-isoprenil flavona, apigenina, crisina, galangina y el derivado M-2 presentaron fluctuaciones de 3,003, 3,982, 2,922, 2,788 y 2,212 Å respectivamente (**tabla 9**), las cuales, aunque superiores a las fluctuaciones de los compuestos de referencia, son estables de acuerdo con lo reportado durante los análisis de estabilidad de diversos eutipoides (Taidi et al., 2022).

Tabla 9. Fluctuaciones más grandes registradas por los ligandos acoplados en el sitio activo de la COX-2, teniendo en cuenta todas las réplicas realizadas.

Compuesto	Mayor fluctuación (Å)
Celecoxib	0,681
Rofecoxib	0,975
5,7-dihidroxi-3-isoprenil flavona	3,003
Apigenina	3,982
Crisina	2,922
Galangina	2,788
M-2	2,212

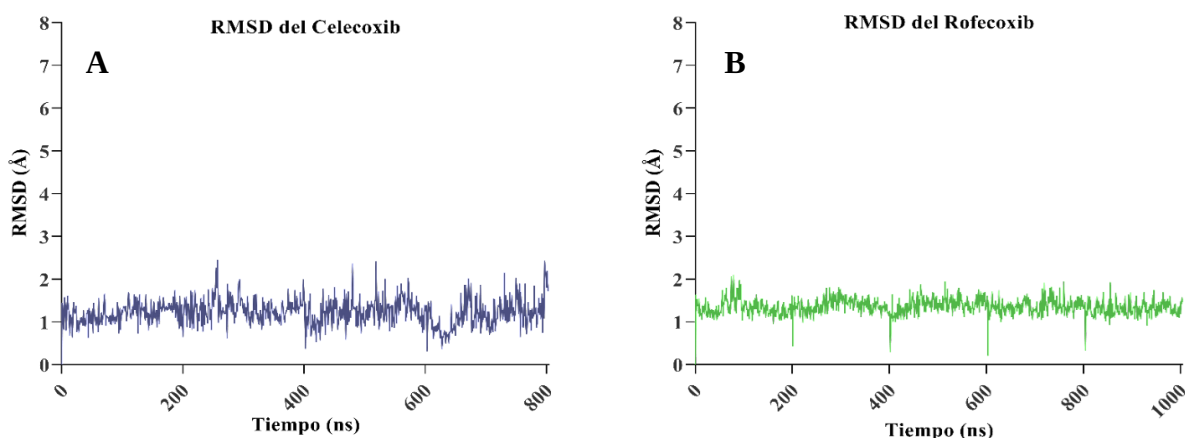


Figura 18. RMDS de las fluctuaciones de los compuestos de referencia A) celecoxib y B) rofecoxib acoplados en el sitio de unión de la enzima COX-2 (200 ns por réplica).

Por otro lado, una vez iniciada cada una de las simulaciones y réplicas, se observó una alta fluctuación en los primeros nanosegundos para el caso de la crisina, apigenina y galangina, lo cual se debe a que las poses halladas durante el docking molecular no fueron las más estables obligando a los ligandos a encontrar un sitio de mayor estabilidad, no obstante, después de aproximadamente 4 ns todos los sistemas mostraron fluctuaciones iguales o menores a las mostradas en la **tabla 9**, sugiriendo que se acoplan de manera estable a la COX-2. Adicionalmente, la apigenina fue el compuesto que mostró la mayor fluctuación (3,982 Å), sin embargo, dicho metabolito es uno de los compuestos que presenta menos fluctuaciones a través de toda la simulación en comparación con sus metabolitos análogos y el derivado M-2, indicando que el sustituyente -OH ubicado en la posición 4 del grupo fenil de la apigenina estabiliza el acoplamiento a la COX-2 (**figura 19**), lo cual se debe a las interacciones mediante puentes de hidrógeno establecidas por el grupo -OH con los residuos Trp387 y Leu384 e interacciones π - π con los residuos Tyr385 y Phe518, sugiriendo que dicha sustitución optimiza el acoplamiento de las flavonas a la enzima COX-2.

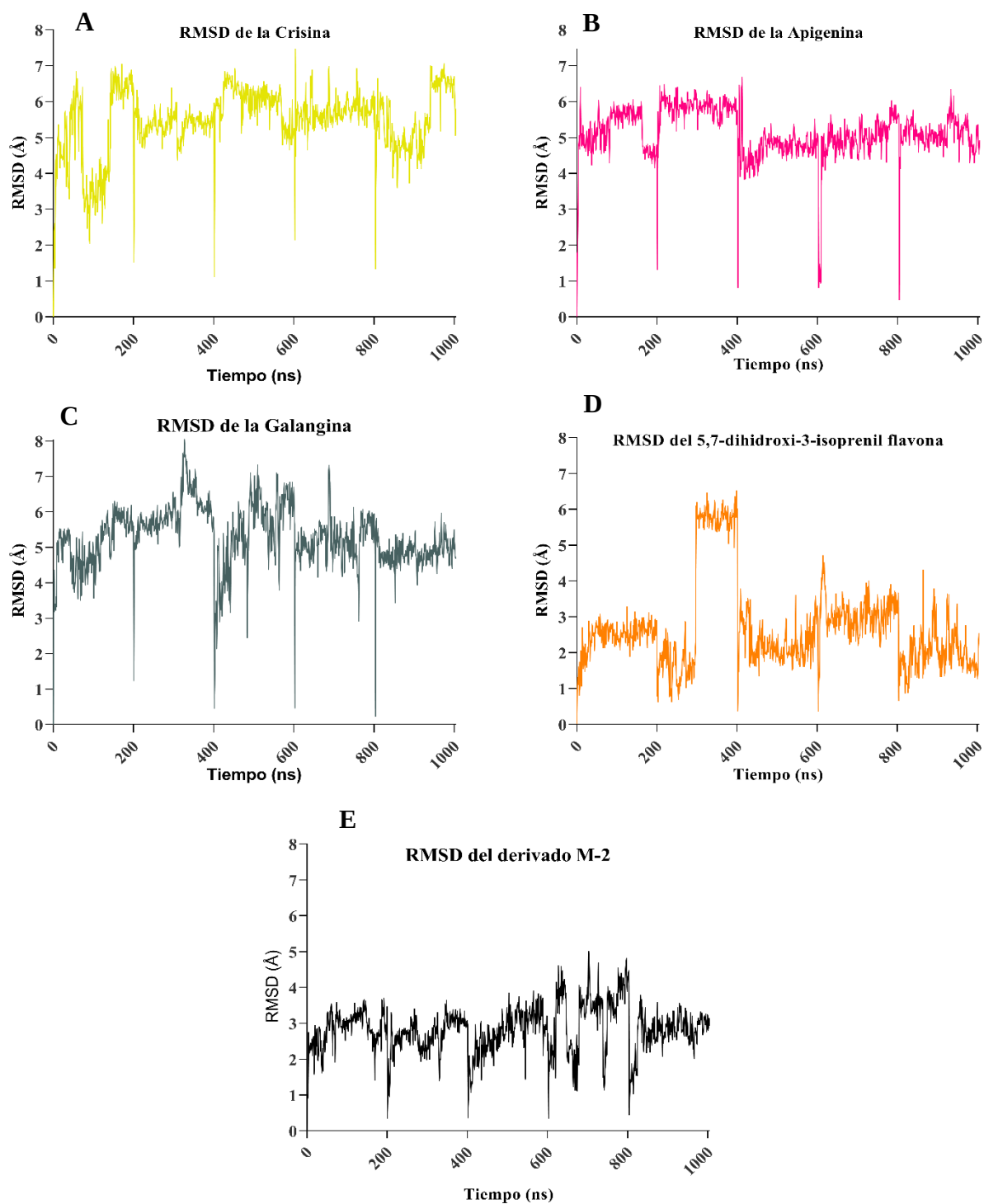


Figura 19. RMDS de las fluctuaciones de los metabolitos A) crisina, B) apigenina, C) galangina, D) 5,7-dihidroxi-3-isoprenil flavona y E) M-2 acoplados en el sitio de unión de la enzima COX-2 (200 ns por réplica).

Los resultados y análisis de los RMSDs presentados anteriormente como método de análisis de estabilidad de cada uno de los complejos estudiados fue uno de los tres métodos empleados en el análisis de los complejos COX-2-ligandos, permitiéndonos establecer que el metabolito 5,7-dihidroxi-3-isoprenil flavona fue el compuesto más estable en la posición obtenida en los análisis de docking molecular. Como segundo parámetro de análisis de la estabilidad de los complejos mencionados anteriormente, se analizó la raíz media cuadrática de las fluctuaciones (RMSF), las cuales indican las regiones de la proteína que fluctúan durante la dinámica molecular como resultado de las interacciones establecidas con el ligando (Kulkarni et al., 2022). Los RMSFs indicaron fluctuaciones similares en todos los sistemas analizados incluyendo los compuestos de referencia y metabolitos (**anexo 4**), demostrando que dichas estructuras son capaces de establecer interacciones con la proteína durante la simulación, que permiten estabilizar los ligandos dentro de la cavidad del sitio activo.

La energía libre de enlace es una medida que permite hacer una aproximación de la estabilidad de los complejos proteína-ligando, la cual es comúnmente usada en el diseño y desarrollo de fármacos (Cournia et al., 2017). En este trabajo, la energía libre fue evaluada mediante el método MM-GBSA, empleando la réplica más estable presentada por cada complejo proteína-ligando durante la simulación. La energía libre estimada para el rofecoxib (-119,597) y celecoxib (-65,063 kcal/mol) mostraron la alta estabilidad del rofecoxib en comparación al celecoxib mientras que los metabolitos 5,7-dihidroxi-3-isoprenil flavona (-54,944 kcal/mol), apigenina (-56,604 kcal/mol), crisina (-56,713 kcal/mol), galangina (-51,891 kcal/mol) y el derivado M-2 (-58,367 kcal/mol) tuvieron energías libres mayores que las obtenidas por el rofecoxib y celecoxib (**tabla 10**), sin embargo, complejos proteína-ligando con energías libres más negativas no indican mayor selectividad que compuestos con energías libres mayores (Güngör et al., 2021), por lo que solo se puede inferir mayor estabilidad en el sitio activo de la COX-2. Por lo anterior, es posible que las flavonas analizadas en esta investigación interactúen con los residuos aminoacídicos del sitio activo de la COX-2 de forma estable como lo soportan los análisis de los RMSD, RMSF y energía libre de enlace, presentados en el texto anterior. Después de establecer la estabilidad de los complejos proteína-ligando y la energía libre de enlace de los ligandos acoplados en el sitio de unión de la COX-2, se procedió al análisis de las interacciones intermoleculares que

permitieron la estabilización de los ligandos en el sitio de unión de la proteína durante la simulación.

Tabla 10. Energías libres calculadas usando las trayectorias de las dinámicas moleculares; estimadas por el método MM-GBSA para los compuestos de interés.

Complejo	ΔG (kcal/mol)
Celecoxib	-65,063
Rofecoxib	-119,597
5,7-dihidroxi-3-isoprenil flavona	-54,944
Apigenina	-56,604
Crisina	-56,713
Galangina	-51,891
M-2	-58,367

Como se observa en la **figura 21**, los metabolitos seleccionados al igual que los fármacos de referencia presentaron interacciones de tipo hidrofóbicas, puentes de hidrógeno, π - π y puentes de agua con residuos aminoacídicos de interés a lo largo de los 1000 ns de simulación (excepto para el complejo COX-2/celecoxib ya que para este se simularon 800 ns).

En cuanto a las interacciones establecidas mediante puentes de hidrogeno, el celecoxib presentó interacciones con los residuos Leu352 (94%), Ser353 (89%), Arg513 (42%) y Phe518 (58%); y el rofecoxib interactuó con la Arg513 (88%) y Ser530 (41%). El metabolito 5,7-dihidroxi-3-isoprenil flavona interactuó con la Phe518 (19%), mientras que la galangina, apigenina y el derivado M-2 interactuaron mediante puentes de hidrógeno con la Ser530 en un 46, 17 y 17%, respectivamente (**figura 21-A**). Dentro de los residuos mencionados anteriormente se encuentra la Ser530 la cual es de gran relevancia ya que está asociada con el mecanismo de acción por el cual fármacos como el diclofenaco logran tener mayor selectividad hacia la COX-2 en comparación con AINS clásicos (Ahmadi et al., 2022), además, con los resultados obtenidos de las frecuencias de interacción se puede inferir que la Arg513 desempeña un rol importante en la selectividad hacia la COX-2, como ya ha sido reportado en investigaciones previas (El-Sayed et al., 2011; Güngör et al., 2021).

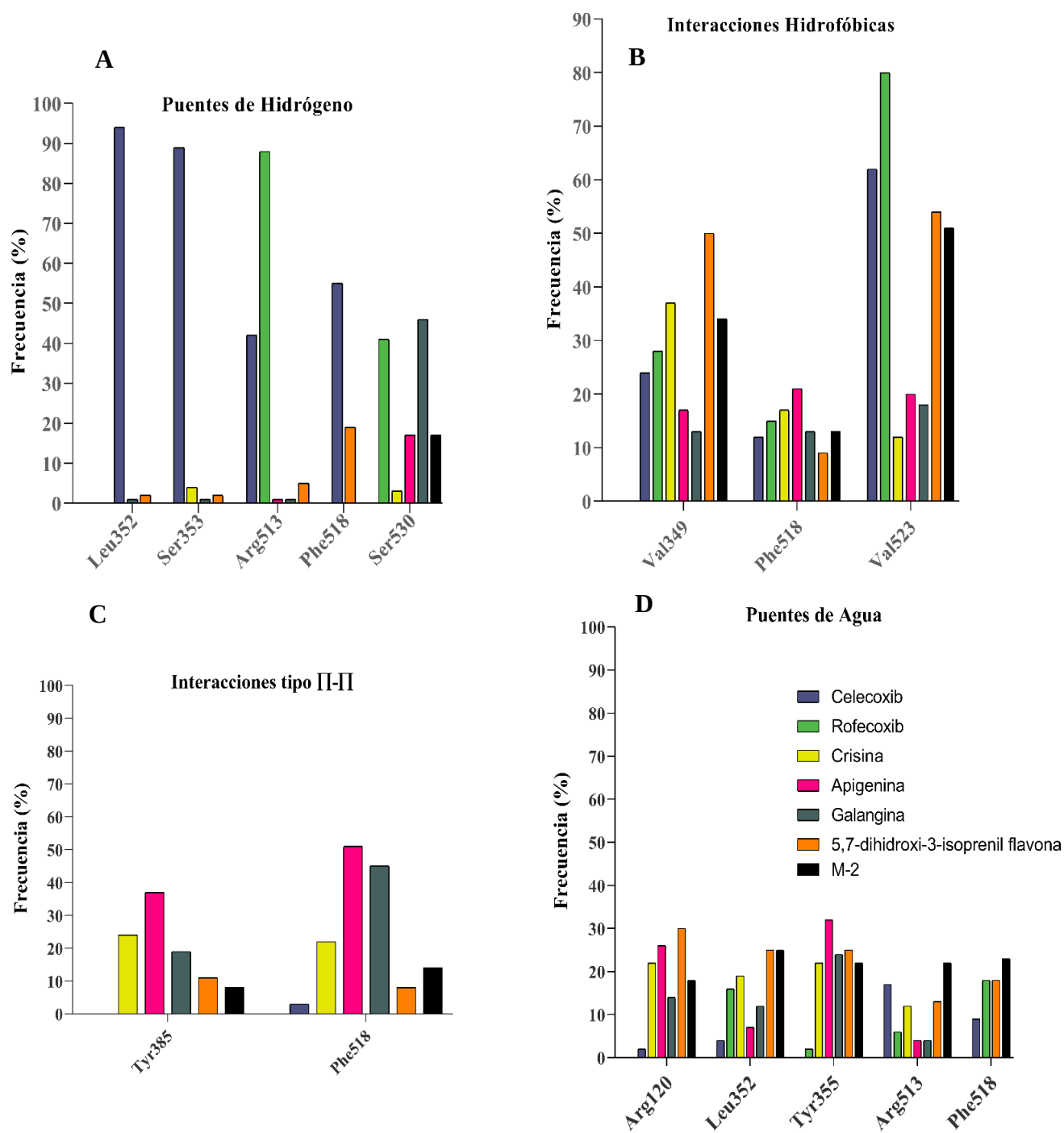


Figura 21. Interacciones tipo A) puentes de hidrógeno, B) hidrofóbicas, C) π - π y D) puentes de agua entre los metabolitos, derivado M-2 y compuestos de referencia con los residuos aminoacídicos del sitio activo de la COX-2.

En cuanto a las interacciones hidrofóbicas, el celecoxib y el rofecoxib presentaron un 62 y 80% de frecuencia con el residuo aminoacídico Val523 durante la dinámica molecular,

mientras que la crisina (12%), apigenina (20%), galangina (18%), 5,7-dihidroxi-3-isoprenil flavona (54%) y el derivado M-2 (51%) interactuaron con menor frecuencia que los compuestos de referencia. De forma interesante, el metabolito 5,7-dihidroxi-3-isoprenil flavona y el derivado M-2, presentaron frecuencias de interacciones hidrofóbicas con la Val523 que se aproximan a la presentada por el celecoxib, siendo estas las flavonas con sustituyentes alifáticos no polares en el C-3. Curiosamente, las interacciones con la Val523 son claves ya que el residuo aminoacídico 523 presente en las isoformas de la COX, causa la apertura de una cavidad en la COX-2 a la cual no se tiene accesibilidad en la isoforma COX-1 (Chavatte & Farce, 2006), por lo que es posible que el grupo isoprenil ubicado en el C-3 del metabolito 5,7-dihidroxi-3-isoprenil flavona, le permita alcanzar dicha cavidad de la COX-2 y ser menos estable en el sitio activo de la COX-1, sugiriendo que dicho compuesto es selectivo (Ferreira et al., 2017; Sutradhar et al., 2008). Por otro lado, Ferreira et al., 2017 destacó la importancia de llevar a cabo nuevas investigaciones sobre los extractos etanólicos de la planta *Sida cordifolia*, debido a la alta reducción de PGE₂ (69,08%) sintetizadas por la acción catalítica de la COX-2, lo cual puede ser asociado con el metabolito 5,7-dihidroxi-3-isoprenil flavona presente en dichos extractos, como se menciona en el apartado **7.4.4.4**.

Por otra parte, se evidenciaron interacciones de tipo π - π logradas por las flavonas crisina, apigenina, galangina, 5,7-dihidroxi-3-isoprenil flavona y el derivado M-2 con los residuos Tyr385 y Phe518, las cuales no fueron evidenciadas en los compuestos de referencia, siendo sin duda alguna la apigenina el metabolito con mayor frecuencia de interacciones π - π , logrando un 51% de frecuencia con el residuo Phe518 y un 37% con el residuo Tyr385 (**figura 21-C**). Adicionalmente, se presentaron interacciones mediante puentes de agua logradas por todos los compuestos evaluados incluyendo al rofecoxib y celecoxib, con los residuos Arg120, Leu352, Tyr355, Arg513 y Phe518 (**figura 21-D**), en menos proporción que las frecuencias observadas en las interacciones de tipo π - π e hidrofóbicas mostradas por los metabolitos analizados. No obstante, el metabolito 5,7-dihidroxi-3-isoprenil logro interactuar con un 30% de frecuencia mediante puentes de agua con el residuo Arg120, de alta importancia en la estabilización de diversos AINS clásicos como la aspirina y el naproxeno (Ahmadi et al., 2022).

Finalmente, se puede establecer que las flavonas crisina, apigenina, galangina y la 5,7-dihidroxi-3-isoprenil flavona presentaron interacciones con residuos del sitio activo claves en la inhibición de la COX-2. De forma interesante, se pudo evidenciar que el metabolito 5,7-dihidroxi-3-isoprenil flavona presento interacciones con la Val523 las cuales no son logradas por sus flavonas análogas, permitiéndonos sugerir que dicho compuesto podría ser selectivo hacia la isoforma COX-2.

8 CONCLUSIONES

- Se logró la construcción de una base de datos compuesta por 5 mil metabolitos secundarios de plantas, que fueron empleados en ensayos de virtual screening, permitiendo la identificación de una serie de metabolitos secundarios como posibles inhibidores selectivos de la enzima COX-2.
- Los análisis de las dinámicas moleculares facilitaron identificar al metabolito 5,7-dihidroxi-3-isoprenil flavona, como posible inhibidor selectivo hacia la enzima COX-2, debido a las interacciones con residuos específicos de la COX-2.
- Se pudo evidenciar que la hipótesis planteada sobre la optimización de la 5,7-dihidrorxi flavonas (crisina), mediante la adición de sustituyentes en el carbono 3 (C-3), es apropiada, de acuerdo con los resultados obtenidos en esta investigación.
- Finalmente, la identificación del metabolito 5,7-dihidroxi-3-isoprenil flavona, así como los cambios estructurales en el C-3 de las 5,7-dihidroxi flavonas, podrían jugar un rol importante en el desarrollo y diseño de nuevos antiinflamatorios no esteroideos, con efectos menos contraproducentes que los AINS empleados en la actualidad.

9 RECOMENDACIONES

Los resultados computacionales dan indicios sobre la posible inhibición selectiva de la COX-2 por parte del metabolito 5,7-dihidroxi-3-isoprenil flavona y los derivados de las 5,7-dihidroxi flavonas con sustituyentes alifáticos no polares en el C-3, sin embargo, se recomienda llevar a cabo nuevas investigaciones empleando técnicas experimentales que permitan hacer una aproximación del comportamiento biológico de dichos compuestos y así

poder llegar a proponerlos como posibles antiinflamatorios no esteroideos selectivos hacia la COX-2.

10 DIVULGACION DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS

Los resultados obtenidos durante esta investigación fueron presentados en el congreso internacional LatinXChem el 28 de noviembre del 2022 (**anexo 5**), además, serán presentados en el V congreso Colombiano de Bioquímica y Biología molecular C2B2. Adicionalmente, los resultados obtenidos en este proyecto se publicarán en una revista indexada u homologa por Minciencias bajo el nombre “**FLAVONE DERIVATIVES AT C-3 AS SELECTIVE CYCLOOXYGENASE-2 (COX-2) INHIBITORS: *in silico* STUDIES FOR RATIONAL DRUG DESIGN**”.

11 BIBLIOGRAFIA

- Abdel-Aziz, A. A. M., El-Azab, A. S., AlSaif, N. A., Alanazi, M. M., El-Gendy, M. A., Obaidullah, A. J., Alkahtani, H. M., Almhizia, A. A., & Al-Suwaidan, I. A. (2020). Synthesis, anti-inflammatory, cytotoxic, and COX-1/2 inhibitory activities of cyclic imides bearing 3-benzenesulfonamide, oxime, and β -phenylalanine scaffolds: a molecular docking study. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 35(1), 610–621. <https://doi.org/10.1080/14756366.2020.1722120>
- Abdellatif, K. R. A., Abdelall, E. K. A., Elshemy, H. A. H., Philoppes, J. N., Hassanein, E. H. M., & Kahk, N. M. (2021). Optimization of pyrazole-based compounds with 1,2,4-triazole-3-thiol moiety as selective COX-2 inhibitors cardioprotective drug candidates: Design, synthesis, cyclooxygenase inhibition, anti-inflammatory, ulcerogenicity, cardiovascular evaluation, and mol. *Bioorganic Chemistry*, 114(June), 105122. <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2021.105122>
- Administración de los fármacos - Fármacos o sustancias - Manuale Merck versión para el público general.* (n.d.). Retrieved October 24, 2022, from <https://www.merckmanuals.com/es-us/hogar/f%C3%A1rmacos-o-sustancias/administraci%C3%B3n-y-cin%C3%A9tica-de-los-f%C3%A1rmacos/administraci%C3%B3n-de-los-f%C3%A1rmacos>
- Ahmadi, M., Bekeschus, S., Weltmann, K. D., von Woedtke, T., & Wende, K. (2022). Non-steroidal anti-inflammatory drugs: recent advances in the use of synthetic COX-2 inhibitors. *RSC Medicinal Chemistry*, 13(5). <https://doi.org/10.1039/d1md00280e>
- Ahmed, S., Rahman, A., Hasnain, A., Lalonde, M., Goldberg, V. M., & Haqqi, T. M. (2002). *Original Contribution GREEN TEA POLYPHENOL EPIGALLOCATECHIN-3-GALLATE INHIBITS THE IL-1-INDUCED ACTIVITY AND EXPRESSION OF*

CYCLOOXYGENASE-2 AND NITRIC OXIDE SYNTHASE-2 IN HUMAN CHONDROCYTES.

- Amano, H., Iwaki, F., Oki, M., Aoki, K., & Ohba, S. (2019). An osteogenic helioxanthin derivative suppresses the formation of bone-resorbing osteoclasts. *Regenerative Therapy*, 11, 290–296. <https://doi.org/10.1016/j.reth.2019.08.007>
- Benet, L. Z., Hosey, C. M., Ursu, O., & Oprea, T. I. (2016). BDDCS, the Rule of 5 and drugability. In *Advanced Drug Delivery Reviews* (Vol. 101, pp. 89–98). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2016.05.007>
- Beswick, P., Bingham, S., Bountra, C., Brown, T., Browning, K., Campbell, I., Chessell, I., Clayton, N., Collins, S., Corfield, J., Guntrip, S., Haslam, C., Lambeth, P., Lucas, F., Mathews, N., Murkit, G., Naylor, A., Pegg, N., Pickup, E., ... Wiseman, J. (2004). Identification of 2,3-diaryl-pyrazolo[1,5-b]pyridazines as potent and selective cyclooxygenase-2 inhibitors. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 14(21), 5445–5448. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2004.07.089>
- Blobaum, A. L., & Marnett, L. J. (2007). Structural and functional basis of cyclooxygenase inhibition. In *Journal of Medicinal Chemistry* (Vol. 50, Issue 7, pp. 1425–1441). <https://doi.org/10.1021/jm0613166>
- Borges, A., Casoti, R., e Silva, M. L. A., da Cunha, N. L., da Rocha Pissurno, A. P., Kawano, D. F., & da Silva de Laurentiz, R. (2018). COX Inhibition Profiles and Molecular Docking Studies of the Lignan Hinokinin and Some Synthetic Derivatives. *Molecular Informatics*, 37(12). <https://doi.org/10.1002/minf.201800037>
- Brune, K., & Patrignani, P. (2015). New insights into the use of currently available non-steroidal anti-inflammatory drugs. In *Journal of Pain Research* (Vol. 8, pp. 105–118). Dove Medical Press Ltd. <https://doi.org/10.2147/JPR.S75160>
- Chan, F. K. L., Ching, J. Y. L., Tse, Y. K., Lam, K., Wong, G. L. H., Ng, S. C., Lee, V., Au, K. W. L., Cheong, P. K., Suen, B. Y., Chan, H., Kee, K. M., Lo, A., Wong, V. W. S., Wu, J. C. Y., & Kyaw, M. H. (2017). Gastrointestinal safety of celecoxib versus naproxen in patients with cardiothrombotic diseases and arthritis after upper gastrointestinal bleeding (CONCERN): an industry-independent, double-blind, double-dummy, randomised trial. *The Lancet*, 389(10087), 2375–2382. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(17\)30981-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(17)30981-9)
- Chavatte, P., & Farce, A. (2006). *A Computational View of COX-2 Inhibition* (Vol. 6). <http://www.rcsb.org/pdb/index>.
- Chen, C., Wang, C., Zhou, X., Xu, L., Chen, H., Qian, K., Jia, B., Su, G., & Fu, J. (2021). Nonsteroidal anti-inflammatory drugs for retinal neurodegenerative diseases. *Prostaglandins and Other Lipid Mediators*, 156(November 2020), 106578. <https://doi.org/10.1016/j.prostaglandins.2021.106578>

- Cho, H., Yun, C. W., Park, W. K., Kong, J. Y., Kim, K. S., Park, Y., Lee, S., & Kim, B. K. (2004). Modulation of the activity of pro-inflammatory enzymes, COX-2 and iNOS, by chrysin derivatives. *Pharmacological Research*, 49(1), 37–43. [https://doi.org/10.1016/S1043-6618\(03\)00248-2](https://doi.org/10.1016/S1043-6618(03)00248-2)
- Cole, J. C., Murray, C. W., Nissink, J. W. M., Taylor, R. D., & Taylor, R. (2005). Comparing protein-ligand docking programs is difficult. In *Proteins: Structure, Function and Genetics* (Vol. 60, Issue 3, pp. 325–332). <https://doi.org/10.1002/prot.20497>
- Cournia, Z., Allen, B., & Sherman, W. (2017). Relative Binding Free Energy Calculations in Drug Discovery: Recent Advances and Practical Considerations. In *Journal of Chemical Information and Modeling* (Vol. 57, Issue 12, pp. 2911–2937). American Chemical Society. <https://doi.org/10.1021/acs.jcim.7b00564>
- Dao, T. T., Chi, Y. S., Kim, J., Kim, H. P., Kim, S., & Park, H. (2004). Synthesis and inhibitory activity against COX-2 catalyzed prostaglandin production of chrysin derivatives. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 14(5), 1165–1167. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2003.12.087>
- De Vivo, M., Masetti, M., Bottegoni, G., & Cavalli, A. (2016). Role of Molecular Dynamics and Related Methods in Drug Discovery. In *Journal of Medicinal Chemistry* (Vol. 59, Issue 9, pp. 4035–4061). American Chemical Society. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.5b01684>
- de Zorzi, V. N., Haupenthal, F., Cardoso, A. S., Cassol, G., Facundo, V. A., Bállico, L. J., Lima, D. K. S., Santos, A. R. S., Furian, A. F., Oliveira, M. S., Royes, L. F. F., & Figuera, M. R. (2019). Galangin Prevents Increased Susceptibility to Pentylene-tetrazol-Stimulated Seizures by Prostaglandin E2. *Neuroscience*, 413, 154–168. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2019.06.002>
- Divins, M.-J. (2014). Antiinflamatorios. *Farmacia Profesional*, 28(5), 19–22. <https://www.elsevier.es/es-revista-farmacia-profesional-3-articulo-antiinflamatorios-X0213932414516582>
- Dixon, S. L., Smondyrev, A. M., Knoll, E. H., Rao, S. N., Shaw, D. E., & Friesner, R. A. (2006). PHASE: A new engine for pharmacophore perception, 3D QSAR model development, and 3D database screening: 1. Methodology and preliminary results. *Journal of Computer-Aided Molecular Design*, 20(10–11), 647–671. <https://doi.org/10.1007/s10822-006-9087-6>
- Dixon, S. L., Smondyrev, A. M., & Rao, S. N. (2006). PHASE: A novel approach to pharmacophore modeling and 3D database searching. In *Chemical Biology and Drug Design* (Vol. 67, Issue 5, pp. 370–372). <https://doi.org/10.1111/j.1747-0285.2006.00384.x>
- Duchowicz, P. R., Talevi, A., Bellera, C., Bruno-Blanch, L. E., & Castro, E. A. (2007). Application of descriptors based on Lipinski's rules in the QSPR study of aqueous

- solubilities. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 15(11), 3711–3719. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2007.03.044>
- El-Azab, A. S., Abdel-Aziz, A. A. M., Abou-Zeid, L. A., El-Husseiny, W. M., ElMorsy, A. M., El-Gendy, M. A., & El-Sayed, M. A. A. (2018). Synthesis, antitumour activities and molecular docking of thiocarboxylic acid ester-based NSAID scaffolds: COX-2 inhibition and mechanistic studies. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 33(1), 989–998. <https://doi.org/10.1080/14756366.2018.1474878>
- El-Husseiny, W. M., El-Sayed, M. A. A., Abdel-Aziz, N. I., El-Azab, A. S., Asiri, Y. A., & Abdel-Aziz, A. A. M. (2018). Structural alterations based on naproxen scaffold: Synthesis, evaluation of antitumor activity and COX-2 inhibition, and molecular docking. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 158, 134–143. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2018.09.007>
- El-Husseiny, W. M., El-Sayed, M. A. A., El-Azab, A. S., AlSaif, N. A., Alanazi, M. M., & Abdel-Aziz, A. A. M. (2020). Synthesis, antitumor activity, and molecular docking study of 2-cyclopentylloxylanisole derivatives: mechanistic study of enzyme inhibition. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 35(1), 744–758. <https://doi.org/10.1080/14756366.2020.1740695>
- El-Sayed, M. A. A., Abdel-Aziz, N. I., Abdel-Aziz, A. A. M., El-Azab, A. S., Asiri, Y. A., & Eltahir, K. E. H. (2011). Design, synthesis, and biological evaluation of substituted hydrazone and pyrazole derivatives as selective COX-2 inhibitors: Molecular docking study. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 19(11), 3416–3424. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2011.04.027>
- Ferreira, C. A., Campos, M. L., Irioda, A. C., Stremel, D. P., Trindade, A. C. L. B., & Pontarolo, R. (2017). Anti-Inflammatory Effect of *Malva sylvestris*, *Sida cordifolia*, and *Pelargonium graveolens* Is Related to Inhibition of Prostanoid Production. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 22(11). <https://doi.org/10.3390/molecules22111883>
- Forouzesh, N., & Mishra, N. (2021). An effective MM/GBSA protocol for absolute binding free energy calculations: A case study on SARS-CoV-2 spike protein and the human ACE2 receptor. *Molecules*, 26(8). <https://doi.org/10.3390/molecules26082383>
- Friesner, R. A., Banks, J. L., Murphy, R. B., Halgren, T. A., Klicic, J. J., Mainz, D. T., Repasky, M. P., Knoll, E. H., Shelley, M., Perry, J. K., Shaw, D. E., Francis, P., & Shenkin, P. S. (2004). Glide: A New Approach for Rapid, Accurate Docking and Scoring. 1. Method and Assessment of Docking Accuracy. *Journal of Medicinal Chemistry*, 47(7), 1739–1749. <https://doi.org/10.1021/jm0306430>
- Friesner, R. A., Murphy, R. B., Repasky, M. P., Frye, L. L., Greenwood, J. R., Halgren, T. A., Sanschagrin, P. C., & Mainz, D. T. (2006). Extra precision glide: Docking and scoring incorporating a model of hydrophobic enclosure for protein-ligand complexes. *Journal of Medicinal Chemistry*, 49(21), 6177–6196. <https://doi.org/10.1021/jm051256o>

- García Meijide, J. A., & Gómez-Reino Carnota, J. J. (2000). Fisiopatología de la ciclooxigenasa-1 y ciclooxigenasa-2. *Revista Española de Reumatología*, 27(1), 33–35. <http://www.elsevier.es/es-revista-revista-espanola-reumatologia-29-articulo-fisiopatologia-ciclooxigenasa-1-ciclooxigenasa-2-8546>
- Ghodsi, R., Zarghi, A., Daraei, B., & Hedayati, M. (2010). Design, synthesis and biological evaluation of new 2,3-diarylquinoline derivatives as selective cyclooxygenase-2 inhibitors. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 18(3), 1029–1033. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2009.12.060>
- Ghosh, R., Garcia, G. E., Crosby, K., Inouez, H., Thompson, I. M., Troyer, D. A., & Kumar, A. P. (2007). Regulation of Cox-2 by cyclic AMP response element binding protein in prostate cancer: Potential role for nexrutine. *Neoplasia*, 9(11), 893–899. <https://doi.org/10.1593/neo.07502>
- Gong, L., Thorn, C. F., Bertagnolli, M. M., Grosser, T., Altman, R. B., & Klein, T. E. (2012). Celecoxib pathways: Pharmacokinetics and pharmacodynamics. In *Pharmacogenetics and Genomics* (Vol. 22, Issue 4, pp. 310–318). Lippincott Williams and Wilkins. <https://doi.org/10.1097/FPC.0b013e32834f94cb>
- Gowayed, M. A., El Achy, S., Kamel, M. A., & El-Tahan, R. A. (2020). Polymyxin B prevents the development of adjuvant arthritis via modulation of TLR/Cox-2 signaling pathway. *Life Sciences*, 259. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2020.118250>
- Guedes, I. A., Magalhães, C. S., & Dardene, L. E. (2014). Bioinformática : da biologia à flexibilidade molecular. *Bioinformática - Da Biologia à Flexibilidade Molecular*, 189–208. <https://lume.ufrgs.br/handle/10183/166105>
- Güngör, T., Ozleyen, A., Yılmaz, Y. B., Siyah, P., Ay, M., Durdağı, S., & Tumer, T. B. (2021). New nimesulide derivatives with amide/sulfonamide moieties: Selective COX-2 inhibition and antitumor effects. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 221. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2021.113566>
- Hage-Melim, L. I. da S., Federico, L. B., de Oliveira, N. K. S., Francisco, V. C. C., Correia, L. C., de Lima, H. B., Gomes, S. Q., Barcelos, M. P., Francischini, I. A. G., & da Silva, C. H. T. de P. (2020). Virtual screening, ADME/Tox predictions and the drug repurposing concept for future use of old drugs against the COVID-19. *Life Sciences*, 256. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2020.117963>
- Halgren, T. A., Murphy, R. B., Friesner, R. A., Beard, H. S., Frye, L. L., Pollard, W. T., & Banks, J. L. (2004). Glide: A New Approach for Rapid, Accurate Docking and Scoring. 2. Enrichment Factors in Database Screening. *Journal of Medicinal Chemistry*, 47(7), 1750–1759. <https://doi.org/10.1021/jm030644s>
- Hevener, K. E., Zhao, W., Ball, D. M., Babaoglu, K., Qi, J., White, S. W., & Lee, R. E. (2009). Validation of molecular docking programs for virtual screening against

- dihydropteroate synthase. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 49(2), 444–460. <https://doi.org/10.1021/ci800293n>
- Honmore, V. S., Kandhare, A. D., Kadam, P. P., Khedkar, V. M., Sarkar, D., Bodhankar, S. L., Zangwar, A. A., Rojatkar, S. R., & Natu, A. D. (2016). Isolates of *Alpinia officinarum* Hance as COX-2 inhibitors: Evidence from anti-inflammatory, antioxidant and molecular docking studies. *International Immunopharmacology*, 33, 8–17. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2016.01.024>
- Hootman, J. M., Helmick, C. G., Barbour, K. E., Theis, K. A., & Boring, M. A. (2016). Updated Projected Prevalence of Self-Reported Doctor-Diagnosed Arthritis and Arthritis-Attributable Activity Limitation Among US Adults, 2015–2040. *Arthritis and Rheumatology*, 68(7), 1582–1587. <https://doi.org/10.1002/art.39692>
- Hou, D. X., Yanagita, T., Uto, T., Masuzaki, S., & Fujii, M. (2005). Anthocyanidins inhibit cyclooxygenase-2 expression in LPS-evoked macrophages: Structure-activity relationship and molecular mechanisms involved. *Biochemical Pharmacology*, 70(3), 417–425. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2005.05.003>
- Huai, J., Zhao, X., Wang, S., Xie, L., Li, Y., Zhang, T., Cheng, C., & Dai, R. (2019). Characterization and screening of cyclooxygenase-2 inhibitors from Zi-shen pill by affinity ultrafiltration-ultra performance liquid chromatography mass spectrometry. *Journal of Ethnopharmacology*, 241(January), 111900. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2019.111900>
- Huang, C. Y., Han, Z., Li, X., Xie, H. H., & Zhu, S. S. (2017). Mechanism of egcg promoting apoptosis of MCF-7 cell line in human breast cancer. *Oncology Letters*, 14(3), 3623–3627. <https://doi.org/10.3892/ol.2017.6641>
- Hwang, Y. P., Choi, J. H., Yun, H. J., Han, E. H., Kim, H. G., Kim, J. Y., Park, B. H., Khanal, T., Choi, J. M., Chung, Y. C., & Jeong, H. G. (2011). Anthocyanins from purple sweet potato attenuate dimethylnitrosamine-induced liver injury in rats by inducing Nrf2-mediated antioxidant enzymes and reducing COX-2 and iNOS expression. *Food and Chemical Toxicology*, 49(1), 93–99. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2010.10.002>
- Janmanchi, D., Lin, C. H., Hsieh, J. Y., Tseng, Y. P., Chen, T. A., Jhuang, H. J., & Yeh, S. F. (2013). Synthesis and biological evaluation of helioxanthin analogues. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 21(7), 2163–2176. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2012.11.037>
- Jia, P., Pei, J., Wang, G., Pan, X., Zhu, Y., Wu, Y., & Ouyang, L. (2022). The roles of computer-aided drug synthesis in drug development. In *Green Synthesis and Catalysis* (Vol. 3, Issue 1, pp. 11–24). KeAi Communications Co. <https://doi.org/10.1016/j.gresc.2021.11.007>

- Jorgensen, W. L., & Duffy, E. M. (2002). Prediction of drug solubility from structure. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 54(3), 355–366. [https://doi.org/10.1016/S0169-409X\(02\)00008-X](https://doi.org/10.1016/S0169-409X(02)00008-X)
- Jorgensen, W. L., Maxwell, D. S., & Tirado-Rives, J. (1996). *Development and Testing of the OPLS All-Atom Force Field on Conformational Energetics and Properties of Organic Liquids*.
- Kalgutkar, A. S., Crews, B. C., Saleh, S., Prudhomme, D., & Marnett, L. J. (2005). Indolyl esters and amides related to indomethacin are selective COX-2 inhibitors. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 13(24), 6810–6822. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2005.07.073>
- Kaminski, G. A., Friesner, R. A., Tirado-Rives, J., & Jorgensen, W. L. (2001). Evaluation and reparametrization of the OPLS-AA force field for proteins via comparison with accurate quantum chemical calculations on peptides. *Journal of Physical Chemistry B*, 105(28), 6474–6487. <https://doi.org/10.1021/jp003919d>
- Karlsen, A., Retterstøl, L., Laake, P., Paur, I., Kjølrsrud-Bøhn, S., Sandvik, L., & Blomhoff, R. (2007). The Journal of Nutrition Nutrition and Disease Anthocyanins Inhibit Nuclear Factor- κ B Activation in Monocytes and Reduce Plasma Concentrations of Pro-Inflammatory Mediators in Healthy Adults 1-3. In *J. Nutr* (Vol. 137). <https://academic.oup.com/jn/article-abstract/137/8/1951/4664955>
- Kchouk, S., & Hegazy, L. (2022). Pharmacophore modeling for biological targets with high flexibility: LXR β case study. *Medicine in Drug Discovery*, 15. <https://doi.org/10.1016/j.medidd.2022.100135>
- Khan, S. A., Imam, S. M., Ahmad, A., Basha, S. H., & Husain, A. (2018). Synthesis, molecular docking with COX 1& II enzyme, ADMET screening and in vivo anti-inflammatory activity of oxadiazole, thiadiazole and triazole analogs of felbinac. *Journal of Saudi Chemical Society*, 22(4), 469–484. <https://doi.org/10.1016/j.jscs.2017.05.006>
- Kiraly, A. J., Soliman, E., Jenkins, A., & Van Dross, R. T. (2016). Apigenin inhibits COX-2, PGE2, and EP1 and also initiates terminal differentiation in the epidermis of tumor bearing mice. *Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, 104, 44–53. <https://doi.org/10.1016/j.plefa.2015.11.006>
- Kola, P., Manjula, S. N., Metowogo K., Madhunapantula, S. V., & EKlu-Gadegbeku, K. (2023). Four Togolese plant species exhibiting cytotoxicity and antitumor. *Heliyon*. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2023.e13869>
- Kulkarni, A. M., Parate, S., Lee, G., Kim, Y., Jung, T. S., Lee, K. W., & Ha, M. W. (2022). Computational Simulations Highlight the IL2R α Binding Potential of Polyphenol Stilbenes from Fenugreek. *Molecules*, 27(4). <https://doi.org/10.3390/molecules27041215>

- Kurumbail Ravi G., Stevens Anna M., Gierse James K., McDonald Joseph J., Stegeman Roderick A., Pak Jina Y., Gildehaus Daniel, Miyashiro Julie M., Penning Thomas D., Seibert Karen, Isakson Peter C., & Stallings William C. (1996). Structural basis for selective inhibition of cyclooxygenase-2 by anti-inflammatory agents. *NATURE*, 384, 644–648. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1038/384644a0>
- Lebender, L. F., Prünke, L., Rumzhum, N. N., & Ammit, A. J. (2018). Selectively targeting prostanoid E (EP) receptor-mediated cell signalling pathways: Implications for lung health and disease. In *Pulmonary Pharmacology and Therapeutics* (Vol. 49, pp. 75–87). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/j.pupt.2018.01.008>
- Li, X., Chen, L., Gao, Y., Zhang, Q., Chang, A. K., Yang, Z., & Bi, X. (2021). Black raspberry anthocyanins increased the antiproliferative effects of 5-Fluorouracil and Celecoxib in colorectal cancer cells and mouse model. *Journal of Functional Foods*, 87. <https://doi.org/10.1016/J.JFF.2021.104801>
- Li, Y. J., Wu, J. Y., Liu, J., Qiu, X., Xu, W., Tang, T., & Xiang, D. X. (2021). From blood to brain: blood cell-based biomimetic drug delivery systems. *Drug Delivery*, 28(1), 1214–1225. <https://doi.org/10.1080/10717544.2021.1937384>
- López Parra, Marta., Clària i Enrich, J., Rodés, J., & Universitat de Barcelona. Departament de Medicina. (2007). Efectos renales de los inhibidores selectivos de la ciclooxigenasa-2 (COX-2) en la cirrosis. Estudios “in vivo” en ratas inducidas a cirrosis y estudios “in vitro” en células mesangiales. *TDX (Tesis Doctorals En Xarxa)*. <https://www.tdx.cat/handle/10803/2223>
- Madhavi Sastry, G., Adzhigirey, M., Day, T., Annabhimoju, R., & Sherman, W. (2013). Protein and ligand preparation: Parameters, protocols, and influence on virtual screening enrichments. *Journal of Computer-Aided Molecular Design*, 27(3), 221–234. <https://doi.org/10.1007/s10822-013-9644-8>
- Martínez-Canabal, A., & Rivas-Arancibia, S. (2005). Funciones de las prostaglandinas en el sistema nervioso central. *Revista de La Facultad de Medicina*, 48(5), 210–216. <https://www.medigraphic.com/pdfs/facmed/un-2005/un055i.pdf>
- Marzouk, A. A., Taher, E. S., Shaykoon, M. S. A., Lan, P., Abd-Allah, W. H., Aboregela, A. M., & El-Behairy, M. F. (2021). Design, synthesis, biological evaluation, and computational studies of novel thiazolo-pyrazole hybrids as promising selective COX-2 inhibitors: Implementation of apoptotic genes expression for ulcerogenic liability assessment. *Bioorganic Chemistry*, 111(January), 104883. <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2021.104883>
- Modica, M., Vanhems, P., & Tebib, J. (2005). Comparison of conventional NSAIDs and cyclooxygenase-2 inhibitors in outpatients. *Joint Bone Spine*, 72(5), 397–402. <https://doi.org/10.1016/j.jbspin.2005.05.002>

- Mulabagal, V., Van Nocker, S., Dewitt, D. L., & Nair, M. G. (2007). Cultivars of apple fruits that are not marketed with potential for anthocyanin production. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(20), 8165–8169. <https://doi.org/10.1021/jf0718300>
- Mulakala, C., & Viswanadhan, V. N. (2013). Could MM-GBSA be accurate enough for calculation of absolute protein/ligand binding free energies? *Journal of Molecular Graphics and Modelling*, 46, 41–51. <https://doi.org/10.1016/j.jmglm.2013.09.005>
- Nakata, K., Hanai, T., Take, Y., Osada, T., Tsuchiya, T., Shima, D., & Fujimoto, Y. (2018). Disease-modifying effects of COX-2 selective inhibitors and non-selective NSAIDs in osteoarthritis_ a systematic review. *Osteoarthritis AND Cartilage* . <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.joca.2018.05.021>
- Namba, A. M., Da Silva, V. B., & Da Silva, C. H. T. P. (2008). Dinâmica molecular: teoria e aplicações em planejamento de fármacos. *Eclética Química*, 33(4), 13–24. <https://doi.org/10.1590/S0100-46702008000400002>
- Narumiya, S., Sugimoto, Y., & Ushikubi, F. (1999). Prostanoid receptors: Structures, properties, and functions. *Physiological Reviews*, 79(4), 1193–1226. <https://doi.org/10.1152/physrev.1999.79.4.1193>
- Ogbe, A. A., Finnie, J. F., & Van Staden, J. (2020). The role of endophytes in secondary metabolites accumulation in medicinal plants under abiotic stress. *South African Journal of Botany*, 134, 126–134. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2020.06.023>
- Onawole, A. T., Sulaiman, K. O., Kolapo, T. U., Akinde, F. O., & Adegoke, R. O. (2020). COVID-19: CADD to the rescue. *Virus Research*, 285(February), 198022. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2020.198022>
- Oniga, S. D., Pacureanu, L., Stoica, C. I., Palage, M. D., Crăciun, A., Rusu, L. R., Crisan, E. L., & Araniciu, C. (2017). COX inhibition profile and molecular docking studies of some 2-(Trimethoxyphenyl)-Thiazoles. *Molecules*, 22(9), 1–15. <https://doi.org/10.3390/molecules22091507>
- Oriakhi, K., & Orumwensodia, K. O. (2021). Combinatorial effect of Gallic acid and Catechin on some biochemical and pro-inflammatory markers in CCl4-mediated hepatic damage in rats. *Phytomedicine Plus*, 1(1). <https://doi.org/10.1016/j.phyplu.2020.100017>
- Osteoarthritis (OA) | Arthritis | CDC*. (n.d.). Retrieved January 9, 2023, from <https://www.cdc.gov/arthritis/basics/osteoarthritis.htm>
- Paixão, P., Gouveia, L. F., & Morais, J. A. G. (2010). Prediction of the in vitro permeability determined in Caco-2 cells by using artificial neural networks. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 41(1), 107–117. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2010.05.014>
- Parolini, M. (2020). Toxicity of the Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs (NSAIDs) acetylsalicylic acid, paracetamol, diclofenac, ibuprofen and naproxen towards

- freshwater invertebrates: A review. *Science of the Total Environment*, 740, 140043. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.140043>
- Pettersson, S. H., & Teixidó i Closa, J. (2009). *Diseño, selección y síntesis de nuevos inhibidores de entrada del VIH*. <https://www.tesisenred.net/handle/10803/9298;jsessionid=D057BF8535D813556141C9FC68D9BD9CD.tdx2#page=1>
- QikProp | Schrödinger. (n.d.). Retrieved October 24, 2022, from <https://www.schrodinger.com/products/qikprop>
- Qin, F. Y., Zhang, H. X., Di, Q. Q., Wang, Y., Yan, Y. M., Chen, W. L., & Cheng, Y. X. (2020). Ganoderma cochlear Metabolites as Probes to Identify a COX-2 Active Site and as in Vitro and in Vivo Anti-Inflammatory Agents. *Organic Letters*, 22(7), 2574–2578. <https://doi.org/10.1021/acs.orglett.0c00452>
- Ren, S. Z., Wang, Z. C., Zhu, X. H., Zhu, D., Li, Z., Shen, F. Q., Duan, Y. T., Cao, H., Zhao, J., & Zhu, H. L. (2018). Design and biological evaluation of novel hybrids of 1, 5-diarylpyrazole and Chrysin for selective COX-2 inhibition. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 26(14), 4264–4275. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2018.07.022>
- Repasky, M. P., Shelley, M., & Friesner, R. A. (2007). Flexible ligand docking with Glide. *Current Protocols in Bioinformatics*, Chapter 8(1). <https://doi.org/10.1002/0471250953.BI0812S18>
- Sabe, V. T., Ntombela, T., Jhamba, L. A., Maguire, G. E. M., Govender, T., Naicker, T., & Kruger, H. G. (2021). Current trends in computer aided drug design and a highlight of drugs discovered via computational techniques: A review. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 224, 113705. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2021.113705>
- Sadeghi-Aliabadi, H., Aliasgharluo, M., Fattahi, A., Mirian, M., & Ghannadian, M. (2013). In vitro cytotoxic evaluation of some synthesized COX-2 inhibitor derivatives against a panel of human cancer cell lines. *Research in Pharmaceutical Sciences*, 8(4), 299–304.
- Sağlık, B. N., Osmaniye, D., Levent, S., Çevik, U. A., Çavuşoğlu, B. K., Özkay, Y., & Kaplancıklı, Z. A. (2021). Design, synthesis and biological assessment of new selective COX-2 inhibitors including methyl sulfonyl moiety. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 209(xxxx). <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2020.112918>
- Saldívar-González, F., Prieto-Martínez, F. D., Medina-Franco, J. L., Saldívar-González, F., Prieto-Martínez, F. D., & Medina-Franco, J. L. (2017). Descubrimiento y desarrollo de fármacos: un enfoque computacional. *Educación Química*, 28(1), 51–58. <https://doi.org/10.1016/J.EQ.2016.06.002>
- Saxena, P., Sharma, P. K., & Purohit, P. (2020). A journey of celecoxib from pain to cancer. In *Prostaglandins and Other Lipid Mediators* (Vol. 147). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/j.prostaglandins.2019.106379>

- Seeram, N. P., Momin, R. A., Nair, M. G., & Bourquin L. D. (2005). Cyclooxygenase inhibitory and antioxidant cyanidin. *Phytomedicine*, 8(5), 362–369. <https://doi.org/https://doi.org/10.1078/0944-7113-00053>
- Shelley, J. C., Cholleti, A., Frye, L. L., Greenwood, J. R., Timlin, M. R., & Uchimaya, M. (2007). Epik: A software program for pKa prediction and protonation state generation for drug-like molecules. *Journal of Computer-Aided Molecular Design*, 21(12), 681–691. <https://doi.org/10.1007/s10822-007-9133-z>
- Siegel, R. L., Miller, K. D., Fuchs, H. E., & Jemal, A. (2021). Cancer Statistics, 2021. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 71(1), 7–33. <https://doi.org/10.3322/caac.21654>
- Sookvanichsilp, N., & Poemsantitham, K. (2011). Effects of catechin, diclofenac and celecoxib on the proliferation of MCF-7 and LTED MCF-7 cells. *Biomedicine and Preventive Nutrition*, 1(3), 202–206. <https://doi.org/10.1016/j.bionut.2011.06.003>
- Stanzione, F., Giangreco, I., & Cole, J. C. (2021). Use of molecular docking computational tools in drug discovery. In *Progress in Medicinal Chemistry* (Vol. 60, pp. 273–343). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/bs.pmch.2021.01.004>
- Sutradhar, R. K., Rahman, A. K. M. M., Ahmad, M. U., & Bachar, S. C. (2008). Bioactive flavones of *Sida cordifolia*. *Phytochemistry Letters*, 1(4), 179–182. <https://doi.org/10.1016/j.phytol.2008.09.004>
- Sweere, A. J. M., & Fraaije, J. G. E. M. (2017). Accuracy Test of the OPLS-AA Force Field for Calculating Free Energies of Mixing and Comparison with PAC-MAC. *Journal of Chemical Theory and Computation*, 13(5), 1911–1923. <https://doi.org/10.1021/acs.jctc.6b01106>
- Tacconelli, S., Capone, M. L., Sciulli, M. G., Ricciotti, E., & Patrignani, P. (2002). *CURRENT MEDICAL RESEARCH AND OPINION® V O L . 1 8 , N O . 8 , 2 0 0 2 , 5 0 3-5 1 1 The Biochemical Selectivity of Novel COX-2 Inhibitors in Whole Blood Assays of COX-isozyme Activity Keywords: Cyclo-oxygenase-1-Cyclo-oxygenase-2-Etoricoxib-Human whole blood-Rofecoxib-Valdecoxib.*
- Taidi, L., Maurady, A., & Britel, M. R. (2022). Molecular docking study and molecular dynamic simulation of human cyclooxygenase-2 (COX-2) with selected eutypoids. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, 40(3), 1189–1204. <https://doi.org/10.1080/07391102.2020.1823884>
- Termer, M., Carola, C., Salazar, A., Keck, C. M., Hemberger, J., & von Hagen, J. (2021). Identification of plant metabolite classes from *Waltheria Indica* L. extracts regulating inflammatory immune responses via COX-2 inhibition. *Journal of Ethnopharmacology*, 270. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2020.113741>
- Van Breemen, R. B., & Li, Y. (2005). Caco-2 cell permeability assays to measure drug absorption. In *Expert Opinion on Drug Metabolism and Toxicology* (Vol. 1, Issue 2, pp. 175–185). <https://doi.org/10.1517/17425255.1.2.175>

- Vandenberg, J. I., Perry, M. D., Perrin, M. J., Mann, S. A., Ke, Y., Hill, A. P., & hERG K, H. A. (2012). hERG K CHANNELS: STRUCTURE, FUNCTION, AND CLINICAL SIGNIFICANCE. *Physiol Rev*, 92, 1393–1478. <https://doi.org/10.1152/physrev.00036.2011>. -The
- Vega de Leon, A. (2018, September 20). *El proceso de desarrollo de medicamentos - Sruk*. Society of Spanish Researches in the United Kingdom. <https://sruk.org.uk/es/el-proceso-de-desarrollo-de-medicamentos/>
- Wang, E., Sun, H., Wang, J., Wang, Z., Liu, H., Zhang, J. Z. H., & Hou, T. (2019). End-Point Binding Free Energy Calculation with MM/PBSA and MM/GBSA: Strategies and Applications in Drug Design. In *Chemical Reviews* (Vol. 119, Issue 16, pp. 9478–9508). American Chemical Society. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.9b00055>
- Wang, Y., Xing, J., Xu, Y., Zhou, N., Peng, J., Xiong, Z., Liu, X., Luo, X., Luo, C., Chen, K., Zheng, M., & Jiang, H. (2015). In silico ADME/T modelling for rational drug design. In *Quarterly Reviews of Biophysics* (Vol. 48, Issue 4, pp. 488–515). Cambridge University Press. <https://doi.org/10.1017/S0033583515000190>
- What are the main differences between HTVS, SP, and XP docking? | Schrödinger. (n.d.). Retrieved April 9, 2023, from <https://www.schrodinger.com/kb/1013>
- What are the ranges for fitness, vector, volume, and site scores in Phase? | Schrödinger. (n.d.). Retrieved October 24, 2022, from <https://www.schrodinger.com/kb/1646>
- Wiegand, T. J., & Shlamovitz. (2021). *Nonsteroidal Anti-inflammatory Drug (NSAID) Toxicity Overview Practice Essentials*. <https://emedicine.medscape.com/article/816117-print>
<https://emedicine.medscape.com/article/816117-print>
- Zarghi, A., & Arfaei, S. (2011). *Selective COX-2 Inhibitors : A Review of Their Structure-Activity Relationships*. 10(October), 655–683.
- Zarghi, A., Ghodsi, R., Azizi, E., Daraie, B., Hedayati, M., & Dadrass, O. G. (2009). Synthesis and biological evaluation of new 4-carboxyl quinoline derivatives as cyclooxygenase-2 inhibitors. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 17(14), 5312–5317. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2009.05.084>
- Zhang, B., Hu, X. T., Gu, J., Yang, Y. S., Duan, Y. T., & Zhu, H. L. (2020). Discovery of novel sulfonamide-containing aminophosphonate derivatives as selective COX-2 inhibitors and anti-tumor candidates. *Bioorganic Chemistry*, 105(July), 104390. <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2020.104390>
- Zhou, Z., Felts, A. K., Friesner, R. A., & Levy, R. M. (2007). Comparative performance of several flexible docking programs and scoring functions: Enrichment studies for a diverse set of pharmaceutically relevant targets. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 47(4), 1599–1608. <https://doi.org/10.1021/ci7000346>