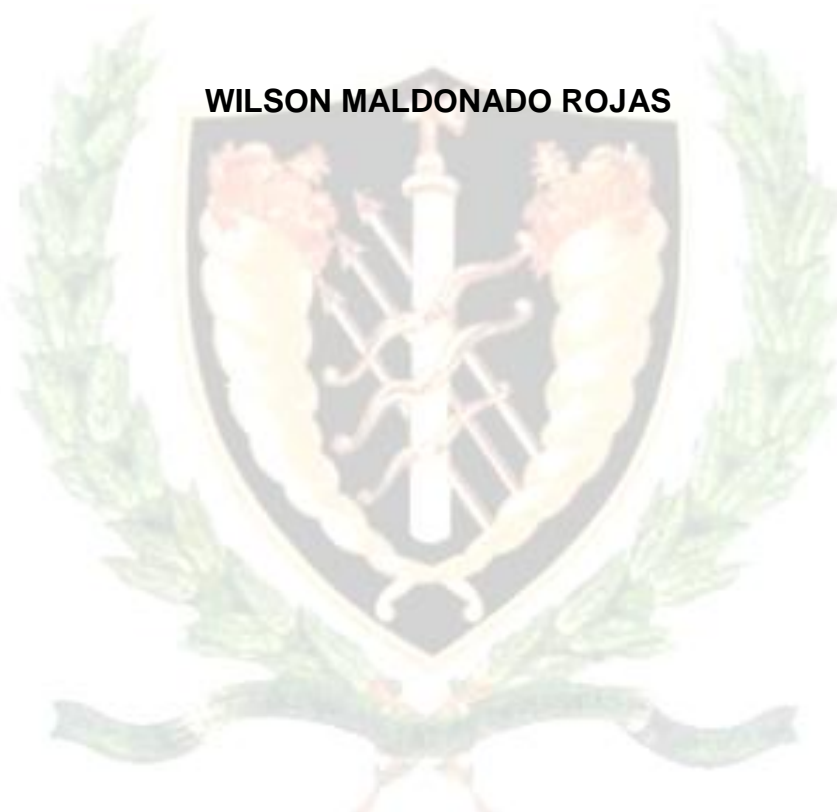


**INTERACCIÓN POTENCIAL DE COMPUESTOS NATURALES BIOACTIVOS DE  
LA DIETA CON LA CICLOOXIGENASA-2 Y BÚSQUEDA DE BLANCOS  
POTENCIALES PARA EL ÁCIDO ALFA LIPOICO**

**WILSON MALDONADO ROJAS**



**UNIVERSIDAD DE CARTAGENA  
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES  
MAESTRIA EN QUÍMICA  
CARTAGENA DE INDIAS D.T Y C  
2012**

**INTERACCIÓN POTENCIAL DE COMPUESTOS NATURALES BIOACTIVOS DE  
LA DIETA CON LA CICLOOXIGENASA-2 Y BÚSQUEDA DE BLANCOS  
POTENCIALES PARA EL ÁCIDO ALFA LIPOICO**

**WILSON MALDONADO ROJAS**

**Trabajo de grado presentado como requisito para optar el título de Magíster  
en Química.**

**Director**

**JESÚS OLIVERO VERBEL, Q.F. Ph.D.**

**UNIVERSIDAD DE CARTAGENA  
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES  
MAESTRÍA EN QUÍMICA  
CARTAGENA DE INDIAS D.T Y C  
2012**

**Nota de Aceptación**

---

---

---

**Presidente del Jurado**

---

**Jurado**

---

**Jurado**

---

**Director de trabajo de grado**

**CARTAGENA DE INDIAS, 2012**

## DEDICATORIA

*A Dios creador del universo, gestor y partícipe de cada uno de mis planes y sueños, por los cuales fue posible alcanzar este logro...*

*A mi madre Emilse Rojas Blanco y a mi padre Antonio Maldonado Rodríguez por ser motivación de superación en todo momento, enseñarme el verdadero valor de las cosas y la constancia para conseguir las metas propuestas, aunque no estén conmigo, pero recordándolos mucho les dedico este triunfo desde lo más profundo de mi corazón...*

*A mis hermosas hijas Carolina y Paula Andrea, mi motivación principal, mis tesoros más preciados, fuente constante de cariño, ternura y amor...*

*A mis hermanos Oscar, Antonio, Luis Alfonso y Luz Marina, y a toda mi familia por el apoyo incondicional brindado en todos estos años de gran esfuerzo y dedicación a pesar de las adversidades...*

*A mis amigos y compañeros por su gran ayuda...*

*Esto es para ustedes y por ustedes*

## **AGRADECIMIENTOS**

En este espacio expreso mi gratitud principalmente a Dios, por darme la vida, la fortaleza y para seguir adelante en cada etapa de mi formación personal, por su inmensa misericordia e incomparable amor, que no tengo como pagarle; a Él sea la gloria y la honra para siempre.

A mis hermanos y a mi familia por su apoyo, motivación, confianza y tiempo, en verdad mil gracias, han sido cada uno de ustedes constructores de este logro.

Al Profesor Jesús Olivero Verbel por sus enseñanzas, consejos, paciencia, apoyo incondicional, por darme la oportunidad de conocerle y permitirme ser parte de su grupo de trabajo, por los conocimientos impartidos y consideración, mil gracias por todo. A todos los integrantes del Grupo de Química Ambiental y Computacional, un excelentísimo grupo de personas y profesionales gracias a todos sin excepción, por su inmensa colaboración.

A todos mis profesores de la maestría en química, en especial al profesor Boris Gabriel Johnson Restrepo, por su valioso apoyo durante todo el proceso de formación, la confianza depositada, los consejos y conocimientos transmitidos, a todo el personal de Laboratorio, a todos los administrativos, y a todo el personal en general. A la Universidad de Cartagena, alma mater, muchas gracias por brindarme las opciones para continuar mi proceso de formación profesional.

Y a todas aquellas personas que me apoyaron y creyeron en mí, un millón de gracias.

## LISTA DE TABLAS

	<b>Página</b>
<b>Tabla 1.</b> Productos naturales bioactivos a evaluar y sus fuentes.	.....19
<b>Tabla 2.</b> Resultados del acoplamiento molecular para los compuestos naturales bioactivos sobre las estructuras de COX-2 utilizando diferentes programas.	.....28
<b>Tabla 3.</b> Afinidades calculadas (AutoDock Vina, AV), valores de las puntuaciones de enlace (GOLD, G, y Surflex Dock, S) y los promedios de las concentraciones inhibitorias (CI50) para compuestos reportados como inhibidores de COX-2.	.....34
<b>Tabla 4.</b> Afinidad (AutoDock Vina) y los valores de puntuación (GOLD y Surflex Dock) para la curcumina (formas cetónica y enólica) y celecoxib (inhibidor), en diferentes sitios de unión predichos (1, 2 y 3) sobre la COX-2.	..... 39
<b>Tabla 5.</b> Proteínas predichas por TarFisDock para interactuar con las formas del ALA (R-ALA, S-ALA y DHLA).	.....42
<b>Tabla 6.</b> Afinidades calculadas con AutoDock Vina para inhibidores conocidos de proteínas blanco para el R-ALA.	.....47

## LISTA DE FIGURAS

	<b>Página</b>
<b>Figura 1.</b> Formas existentes del ácido alfa lipoico.	.....7
<b>Figura 2.</b> Conversión del ácido araquidónico a prostaglandinas y tromboxanos por acción de las ciclooxigenasas (COX-1/COX-2).	.....9
<b>Figura 3.</b> Estructuras 3D de las ciclooxigenasas COX-1 y COX-2.	.....10
<b>Figura 4.</b> Diferencias entre los sitios activos de las ciclooxigenasas 1 y 2.	.....11
<b>Figura 5.</b> Inhibición selectiva de celecoxib para COX-2.	.....12
<b>Figura 6.</b> Superposición tridimensional de las estructuras COX-2 (1CVU, 1PXX y 1CX2).	.....27
<b>Figura 7.</b> Estructura 3D de los complejos COX-2 (1CVU)-ligandos.	.....30
<b>Figura 8.</b> Conformación de acoplamiento de la curcumina y el sustrato ácido araquidónico (experimental) en el sitio activo de la COX-2 (1CVU).	.....31
<b>Figura 9.</b> Correlación entre los datos calculados de acoplamiento para los inhibidores de la COX-2 (PDB: 1CX2, 1PXX y 1CVU) y la media de la concentración máxima inhibitoria (LogIC50).	.....35
<b>Figura 10.</b> Sitios de unión de celecoxib(A) y curcumina (cetónica, C; enónica E) sobre la COX-2, y las preferencias del ligando por cada uno de ellos (B, D y F, respectivamente).	.....38
<b>Figura 11.</b> Diagrama de cajas y bigotes, para los datos de afinidades de unión obtenidos para el R-ALA con veinte proteínas seleccionadas al azar de la base de datos PDB.	.....41
<b>Figure 12.</b> Complejos proteínas-ligando mostrando los sitios de unión con R-ALA (izquierda), y los principales residuos participantes en la interacción proteína-ligando (derecha), de R-ALA con leucotrieno A4 hidrolasa (A,B), canal de potasio dependiente de voltaje (C,D), alfa hidroxisteroide deshidrogenasa (E,F) y epóxido hidrolasa (G,H), respectivamente.	.....46

**Figura 13.** Estructuras 2D de inhibidores para las proteínas .....48  
seleccionadas (izquierda) y su superposición 3D con R-ALA  
(derecha).



## LISTA DE ANEXOS

	<b>Página</b>
<b>Anexo A:</b> Estructura de los compuestos naturales bioactivos evaluados.	.....72
<b>Anexo B:</b> Artículo titulado “Potential interaction of natural dietary bioactive compounds with COX-2”.	.....75
<b>Anexo C:</b> Artículo titulado “Searching of Protein Targets for Alpha Lipoic Acid”.	.....86

## ABREVIATURAS Y SIMBOLOS UTILIZADOS

**COX:** Ciclooxygenasa

**COX-1:** Ciclooxygenasa-1

**COX-2:** Ciclooxygenasa-2

**COX-3:** Ciclooxygenasa-3

**ALA:** Ácido alfa lipoico

**R-ALA:** Ácido R-alfa lipoico

**S-ALA:** Ácido S-alfa lipoico

**DHLA:** Ácido dihidrolipoico

**AINEs:** Antiinflamatorios no esteroideos

**GOLD:** Genetic Optimization for Ligand Docking

**TFDk:** TarFisDock

**TFD:** Teoría funcional de la densidad

**DDDC:** Centro de Diseño y Descubrimiento de Fármacos

**PDB:** Protein Data Bank

**CI<sub>50</sub>:** Media (el 50%) de la concentración inhibitoria máxima

**LogCI<sub>50</sub>:** Logaritmo de la media concentración inhibitoria máxima

**ANOVA:** Análisis de varianza

**kcal/mol:** Kilocalorías por mol

**RMSD:** Desviación de la media cuadrada de la raíz

**PDTD:** Potential Drug Target Database

**μM:** Concentración micromolar

**nM:** Concentración nanomolar

**NFκβ:** Factor nuclear-kappa B

**STAT-1:** Transductores de señales y activación de la transcripción-1

**PPARγ:** Receptor activado por proliferadores de peroxisoma gamma

**Nrf2:** Factor relacionado con el factor nuclear eritoide-2

**MAPK:** Proteína quinasa activada por mitógenos

**LTA4 hidrolasa:** Leucotrieno A4 hidrolasa

**K<sub>i</sub>:** Constante de inhibición

**CDU:** 1-ciclohexil-3-dodecil urea

**Å:** Amstrong ( $1 \times 10^{-10}$  m)

## DEFINICIONES

Con relación al presente trabajo se entenderá por:

**Ligando:** Moléculas que pueden interaccionar con bolsillos específicos presentes en la estructura de una proteína.

**Receptor:** Macromolécula que interacciona con un ligando específico para iniciar un proceso de transducción de señales que concluye con un cambio en la función celular.

**Acoplamiento molecular in silico:** Método computacional que busca formas de unión entre ligandos potenciales (un fármaco) y un blanco macromolecular (normalmente células, proteínas o procesos químicos), cuya estructura es conocida experimentalmente. Esta herramienta permite encontrar la orientación y posición de un ligando en el sitio activo de su blanco macromolecular.

**Interacción Proteína-Ligando:** Medida en términos de la afinidad de unión entre el ligando y la proteína receptora. Una alta afinidad de unión al ligando resulta de una mayor fuerza intermolecular entre el ligando y su receptor.

**Inhibidor:** Molécula con la capacidad de atenuar la actividad enzimática de una proteína.

**Expresión génica:** Proceso mediante el cual la información contenida en el material genético de un organismo (ADN) es usada para dirigir la síntesis de RNA mensajero.

**Inhibición alostérica:** Cuando el inhibidor se unen a una zona de la enzima diferente del sitio activo, cambiando la configuración del sitio de unión del sustrato natural de la enzima impidiendo la interacción receptor-sustrato.

**Superposición estructural de proteínas:** Alineamiento de secuencias de proteínas basado en la comparación de la forma. Con el fin de establecer

diferencias o similitudes entre dos o más estructuras de proteínas basándose en su forma y conformación tridimensional.

**Protomol:** Marco orientado a objetos, basado en componentes para simulaciones de acoplamiento y dinámica molecular.

# INTERACCIÓN POTENCIAL DE COMPUESTOS NATURALES BIOACTIVOS DE LA DIETA CON LA CICLOOXIGENASA-2 Y BÚSQUEDA DE BLANCOS POTENCIALES PARA EL ÁCIDO ALFA LIPOICO

WILSON MALDONADO ROJAS

Grupo de Química Ambiental y Computacional-Universidad de Cartagena

## RESUMEN

Productos bioactivos naturales presentes en la dieta, juegan un papel importante en numerosos procesos biológicos, siendo muchos de ellos involucrados en la atenuación y control de enfermedades, efectos que han sido relacionados con la modulación de expresión génica y la interacción directa con enzimas involucradas en diferentes patologías. Este trabajo consta de dos partes. En la primera varios compuestos de la dieta, conocidos como reguladores de genes involucrados en inflamación, fueron examinados in silico como ligandos de la COX-2, utilizando AutoDock Vina, GOLD y Surflex Dock (Sybyl) como protocolos de acoplamiento. Curcumina y ácido all-trans-retinoico presentaron el máximo valor absoluto de las afinidades derivadas por AutoDock Vina (9.3 kcal/mol). Las afinidades obtenidas de AutoDock Vina y las puntuaciones de GOLD para varios inhibidores conocidos de la COX-2 correlacionaron con las medias de concentraciones inhibitorias máximas reportadas ( $R^2=0.462$ ,  $P<0.001$  y  $R^2=0.238$ ,  $P=0.029$ , respectivamente). Además, los resultados sugieren que la acción sinérgica de la cúrcuma sobre la inhibición de la COX-2 inducida por celecoxib, puede ocurrir alostéricamente. La segunda parte del trabajo consistió en la búsqueda de blancos moleculares para el ácido alfa lipoico, un antioxidante de interfase, empleando herramientas de acoplamiento inverso, donde las proteínas encontradas en mamíferos, tales como la leucotrieno A4 hidrolasa, el canal de potasio dependiente de voltaje, la alfa hidroxisteroide deshidrogenasa y la epóxido hidrolasa, fueron predichas como potenciales blancos farmacológicos para esta molécula. Todas estas observaciones permiten un acercamiento (teórico) para explicar la forma de cómo estos compuestos naturales podrían estar ejerciendo sus efectos benéficos sobre la salud.

**PALABRAS CLAVE:** Inflamación, inhibición enzimática, acoplamiento, actividad biológica.

# POTENTIAL INTERACTION OF NATURAL DIETARY BIOACTIVE COMPOUNDS WITH COX-2 AND SEARCHING OF POTENTIAL TARGETS FOR ALPHA LIPOIC ACID

WILSON MALDONADO ROJAS

Environmental and Computational Chemistry Group-University of Cartagena

## ABSTRACT

Bioactive natural products present in the diet play an important role in several biological processes, and many have been involved in the alleviation and control of inflammation-related diseases. These effects have been linked with modulation of gene expression and direct interaction of enzymes involved in different pathologies. This work consists of two parts. The first, several food-related compounds with known gene regulatory action on inflammation have been examined *in silico* as COX-2 ligands, utilizing AutoDock Vina, GOLD and Surflex-Dock (SYBYL) as docking protocols. Curcumin and all-*trans* retinoic acid presented the maximum absolute AutoDock Vina-derived binding affinities (9.3 Kcal/mol). AutoDock Vina affinities and GOLD scores for several known COX-2 inhibitors significantly correlated with reported median inhibitory concentrations ( $R^2=0.462$ ,  $P<0.001$  and  $R^2=0.238$ ,  $P=0.029$ , respectively). Moreover, the results suggest that the synergistic action of curcumin on the inhibition of COX-2 induced by celecoxib, can occur allosterically. ii) The second part consisted in the search for molecular targets for alpha lipoic acid using inverse docking, where the proteins found in mammals, such as: leukotriene A4 hydrolase, potassium channel voltage-dependent, alpha-hydroxysteroid dehydrogenase and epoxide hydrolase, were predicted as potential pharmacological targets for this molecule. These observations allow an approach (theory) to explain the way how these natural compounds exert their beneficial effects on health.

**KEYWORDS:** Inflammation; enzymatic inhibition; docking; biological activity.

## TABLA DE CONTENIDO

<b>1. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>1</b>
<b>2. MARCO TEÓRICO .....</b>	<b>3</b>
<b>2.1. CLASIFICACIÓN DE LOS COMPUESTOS BIOACTIVOS NATURALES CON CAPACIDAD ANTIINFLAMATORIA.....</b>	<b>3</b>
<b>2.2. CLASIFICACIÓN DE LOS COMPUESTOS BIOACTIVOS NATURALES CON CAPACIDAD ANTIINFLAMATORIA.....</b>	<b>4</b>
<b>2.2.1. Flavonoides.....</b>	<b>4</b>
<b>2.2.2. Isotiocianatos, proantocianidinas, y terpenoides .....</b>	<b>5</b>
<b>2.2.3. Otros compuestos polifenólicos.....</b>	<b>5</b>
<b>2.2.4. Carotenoides y ácidos grasos poliinsaturados omega-3 .....</b>	<b>6</b>
<b>2.2.5. Ácido alfa lipoico.....</b>	<b>6</b>
<b>2.2.6. Importancia terapéutica de compuestos naturales bioactivos ..</b>	<b>7</b>
<b>2.3. INFLAMACIÓN MEDIADA POR CICLOOXIGENASAS .....</b>	<b>8</b>
<b>2.3.1. COX-1 y COX-2.....</b>	<b>9</b>
<b>2.3.2. Inhibición selectiva de COX-2.....</b>	<b>10</b>
<b>2.4. PROTOCOLOS DE ACOPLAMIENTO MOLECULAR PARA EL DESCUBRIMIENTO DE INHIBIDORES DE COX-2.....</b>	<b>12</b>
<b>2.4.1. GOLD (Genetic Optimization for Ligand Docking) .....</b>	<b>12</b>
<b>2.4.2. Surflex-Dock (Programa Sybyl).....</b>	<b>13</b>
<b>2.4.3. AutoDock Vina.....</b>	<b>13</b>
<b>2.4.4. Acoplamiento inverso proteína-ligando .....</b>	<b>13</b>
<b>2.4.4.1. TarFisDock.....</b>	<b>14</b>
<b>3.ESTADO DEL ARTE.....</b>	<b>15</b>
<b>4. OBJETIVOS.....</b>	<b>17</b>
<b>4.1. OBJETIVO GENERAL.....</b>	<b>17</b>
<b>4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....</b>	<b>17</b>
<b>5. METODOLOGÍA.....</b>	<b>18</b>

<b>5.1. EVALUACIÓN DE LA INTERACCIÓN DE 28 COMPUESTOS BIOACTIVOS SOBRE LA COX-2.....</b>	<b>18</b>
5.1.1. Preparación de la estructura de proteínas y ligandos .....	18
5.1.2. Cálculos de acoplamiento proteína-ligando. ....	18
5.1.3. Parámetros a utilizar con AutoDock Vina.....	21
5.1.4. Parámetros utilizados con GOLD.....	21
5.1.5. Parámetros utilizados con Surflex-Dock (SYBYL).....	21
5.1.6. Identificación de residuos interaccionantes con los compuestos naturales bioactivos en el sitio unión con COX-2.....	22
5.1.7. Validación de acoplamiento con los datos biológicos de inhibidores COX-2.....	22
5.1.8. Enfoque teórico para el estudio del efecto sinérgico entre la curcumina y celecoxib sobre la inhibición de la COX-2.....	23
<b>5.2. BÚSQUEDA DE BLANCOS PARA EL ÁCIDO ALFA LIPOICO.....</b>	<b>23</b>
5.2.1. Modelado de estructuras del ácido alfa lipoico.....	23
<b>5.2.2. Búsqueda de blancos teóricos para el ácido alfa lipoico con TarFisDock.....</b>	<b>23</b>
5.2.3. Validación de los cálculos de acoplamiento molecular para ALA.....	23
5.2.4. Acoplamiento de las estructuras del ácido alfa lipoico con los blancos moleculares predichas por TarFisDock.....	24
5.2.5. Identificación de residuos interaccionantes con el ácido alfa lipoico en el sitio unión con las proteínas blanco.....	24
5.2.6. Acoplamiento de inhibidores conocidos de los blancos moleculares predichas por TarFisDock para el ácido alfa lipoico.....	24
<b>5.3. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....</b>	<b>25</b>
<b>6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>	<b>26</b>
<b>6.1. EVALUACIÓN DE LA INTERACCIÓN DE LOS 28 COMPUESTOS BIOACTIVOS SOBRE LA COX-2.....</b>	<b>26</b>
<b>6.1.1. Similitudes estructurales entre las diferentes estructuras evaluadas de COX-2.....</b>	<b>26</b>



<b>6.1.2. Cálculos de acoplamiento con los programas AutoDock Vina, GOLD y Surflex-Dock (SYBYL).....</b>	<b>27</b>
<b>6.1.3. Interacción entre los residuos en el sitio activo de la COX-2 y los compuestos naturales bioactivos.....</b>	<b>29</b>
<b>6.1.4. Relación entre la actividad biológica de los inhibidores de COX-2 y los datos del acoplamiento proteína-ligando.....</b>	<b>32</b>
<b>6.1.5. Acoplamiento de curcumina y celecoxib sobre la COX-2.....</b>	<b>36</b>
<b>6.2. BÚSQUEDA DE BLANCOS POTENCIALES PARA EL ÁCIDO ALFA LIPOICO.....</b>	<b>40</b>
<b>6.2.1. Identificación de blancos farmacológicos por TarFisDock y validación del acoplamiento molecular.....</b>	<b>40</b>
<b>6.2.2. Interacción entre los residuos en el sitio activo de las proteínas predichas por TarFisDock con el ALA.....</b>	<b>45</b>
<b>6.2.3. Acoplamiento de inhibidores conocidos de los blancos moleculares seleccionados .....</b>	<b>47</b>
<b>7. CONCLUSIONES.....</b>	<b>50</b>
<b>8. RECOMENDACIONES.....</b>	<b>51</b>
<b>9. BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>52</b>

## 1. INTRODUCCIÓN

Muchos de los alimentos que consumimos contienen pequeñas cantidades de compuestos bioactivos que actúan como componentes nutricionales adicionales (Kitts, 1994). La diversidad de estos productos químicos es muy amplia, y algunos de los más representativos incluyen flavonoides, isotiocianatos, proantocianidinas, terpenos, carotenoides, antocianinas y ácidos grasos omega-3 poliinsaturados (Pan et al., 2009), y el antioxidante natural ácido alfa lipoico el cual ha sido ampliamente referenciado por sus efectos benéficos sobre la salud (Sato et al., 2008).

La presencia de estas moléculas bioactivas naturales en frutas y alimentos de la dieta natural ha sido considerada relevante, no sólo por sus propiedades organolépticas únicas, sino también por sus efectos beneficiosos sobre la salud humana, como ha sido demostrado en numerosos estudios (Bohlin et al., 2010; Shen et al., 2009). En un artículo de revisión, Pan et al., 2009, indican la forma natural de cómo los compuestos bioactivos ejercen su actividad antiinflamatoria por la modulación de la expresión genética de varios genes relacionados con procesos de inflamación. Sin embargo, también es muy conocido que algunas moléculas anti-inflamatorias llevan a cabo su acción inhibiendo directamente proteínas inflamatorias tales como la ciclooxygenasa 2 (COX-2) (Chakraborti et al., 2010). Esta enzima cataliza el primer paso en la síntesis de prostaglandinas, tromboxanos y otros eicosanoides en varios procesos inflamatorios (Kiefer et al., 2000). Para el caso del ácido alfa lipoico, los mecanismos moleculares por los cuales ejercen sus efectos benéficos sobre la salud son aún menos conocidos, y solo ha sido relacionado en la mayoría de los casos con la activación del receptor de insulina por unión directa al dominio tirosina quinasa del receptor de insulina (Diesel et al., 2007).

Aunque se ha demostrado que varios productos naturales tienen la capacidad de modular la expresión de COX-2 (Wilken et al., 2011; Frasca et al., 2010, Jin et al., 2010), aun no está claro si estos son capaces de interactuar directamente con el producto del gen (proteínas) o por la modulación de sus factores de transcripción. Para el ácido alfa lipoico es mucho menos la información

conocida hasta ahora en cuanto a sus posibles mecanismos de acción, atribuyendo sus propiedades terapéuticas principalmente a su poder antioxidante (Goraça et al., 2011). Sin embargo, la identificación de los blancos farmacológicos de esta molécula podría dar información valiosa acerca de la forma como ejerce su acción biológica en la salud humana.

La química computacional ofrece la posibilidad de estudiar interacciones a través de los procedimientos de acoplamiento de varios ligandos a una sola proteína ligando-proteína (Trott y Olson, 2010), y de varias proteínas alrededor de una molécula pequeña (Li et al., 2008). Los métodos de acoplamiento son herramientas valiosas para el desarrollo de fármacos, y los enfoques más actuales suponen una estructura rígida de los receptores para el cribado virtual de un gran número de posibles ligandos y supuestos sitios de unión sobre una molécula receptora (May y Zacharias, 2005). Entre los programas utilizados para este fin encontramos AutoDock Vina, GOLD y Surflex-Dock (Sybyl) (Trott y Olson, 2010, Verdonk et al., 2003, Jain et al., 2007). Estas herramientas computacionales de acoplamiento generan valores de unión o afinidad para sitios y poses diferentes sobre las proteínas blanco, y los mejores compuestos identificados para estos receptores, los cuales pueden servir como posibles candidatos para una posterior validación experimental (Tang et al., 2006, Utsintong et al., 2009). Por otra parte, el acoplamiento inverso, permite conocer cuáles son los potenciales blancos farmacológicos para una molécula en particular (Li et al., 2006). Es por eso que estos métodos computacionales pueden ser utilizados para la generación de información que nos permita un acercamiento de cómo compuestos naturales bioactivos presentes en la dieta podrían estar ejerciendo sus efectos benéficos sobre la salud humana.

## **2. MARCO TEÓRICO**

### **2.1. COMPUESTOS NATURALES BIOACTIVOS CON CAPACIDAD ANTIINFLAMATORIA**

Los compuestos naturales han sido ampliamente utilizados en la medicina tradicional, considerados como una alternativa viable para el desarrollo de nuevos medicamentos, convirtiéndose en una valiosa fuente a largo plazo para descubrimiento de nuevos y eficaces fármacos. Datos estadísticos demuestran que compuestos bioactivos naturales y sus derivados, contribuyen aproximadamente a un tercio de los medicamentos más vendidos actualmente en el mercado (Zhou et al., 2010).

Compuestos naturales bioactivos en frutas y verduras, que poseen potentes propiedades anti-inflamatorias, han sido considerados como opciones prometedoras para diferentes ensayos clínicos destinados a la búsqueda de alternativas para la prevención de enfermedades que involucran procesos inflamatorios en alguna de sus etapas (Thoppil y Bishayee, 2011; Lucas et al., 2011). Muchos de estos compuestos naturales bioactivos han presentado importantes efectos farmacológicos, los cuales pueden alterar de manera significativa la actividad de agentes con función terapéutica mediante la modulación de vías bioquímicas (Lila y raskin, 2005). Muchas áreas terapéuticas se han beneficiado de gran manera por la abundante diversidad de plataformas para medicamentos generadas por el estudio de las propiedades y características físico-químicas de los productos naturales, debido a su capacidad de interactuar con muchos objetivos farmacológicos específicos dentro de la célula y de hecho durante los últimos años han sido fuente de inspiración para la mayoría de los medicamentos aplicados en enfermedades de gran incidencia a nivel mundial, principalmente en enfermedades inflamatorias y de naturaleza oncológica (Mishra y Tiwari, 2011).

## 2.2. CLASIFICACIÓN DE LOS COMPUESTOS BIOACTIVOS NATURALES CON CAPACIDAD ANTIINFLAMATORIA

Debido a la gran variedad que existe de estos compuestos en la naturaleza, es posible hacer una clasificación somera de los compuestos bioactivos relacionados directamente con procesos inflamatorios de la siguiente manera.

**2.2.1. Flavonoides.** Poseen una gran diversidad y son muy abundantes en las plantas, donde casi todos los tejidos son capaces de sintetizar flavonoides. Estos compuestos pueden ser clasificados en siete grupos: flavonas, flavonoles, flavanonas, flavononoles, flavonoides, isoflavonas, y antocianidinas (Pan et al., 2009). Entre estos compuestos pueden ser destacados los siguientes:

*Apigenina*, una flavona presente en el perejil y el apio (Yao et al., 2010).

*Tangeretina*, pertenece a las flavonas polimetoxilatadas, es abundante en la cáscara de los cítricos (Stuetz et al., 2010).

*5-hidroxi-3-,6,7,8,3',4' hexametoxiflavona*, que también es encontrado en cítricos (Lai et al., 2007).

*Kaempferol*, un flavonol presente en el brócoli y el té verde (vasanthi et al., 2009).

*Quercetina*, este flavonol es uno de los metabolitos secundarios de las plantas, es encontrado típicamente en las cebollas, brócoli, manzanas, uvas, vino, té, y las verduras de hoja verde (Vasanthi et al., 2009).

*Naringenina*, un flavanona está principalmente presente en las naranjas (Lien et al., 2008).

*Epicatequina* y *epicatequina-3-galato* son los compuestos polifenólicos más abundantes en el té verde (Wang et al., 2010).

*Genisteína*, isoflavona considerada como el principal componente nutricional en la soya (Weng et al., 2010).

*Cianidina*, una antocianidina presente en las cerezas y las fresas (Reber et al., 2011).

*Delfinidina*, una antocianina principalmente presente en las frutas oscuras (Castellarin y Di Gaspero, 2007).

*Silibinina*, es un flavonolignano presente en la flor de cardo (Abenavoli et al., 2010).

**2.2.2. Isotiocianatos, proantocianidinas, y terpenoides.** Los isotiocianatos son formados durante la masticación de algunos vegetales crucíferos, los cuales pertenecen al género brassica, estos incluyen; col, brócoli, col rizada, coliflor y coles de Bruselas, son las principales fuentes de glucosinolatos y productos relacionados (Pan et al., 2009), entre estos compuestos podemos destacar los siguientes: *Sulforafano*, *fenetil isotiocianato*, y *bencil isotiocianato*, los cuales están contenidos principalmente en las coles (Skupinska et al., 2009, Visanji et al., 2004).

Las proantocianidinas, son polímeros naturales presentes en muchas plantas y frutas, cuyas unidades básicas son flavonoides. También reciben el nombre de taninos condensados. Son encontradas en muchas plantas, especialmente en las bayas, legumbres, frutos secos, cacao, y el vino (Déziel et al., 2010).

Los terpenos, son una clase de metabolitos secundarios en los vegetales tales como frutas cítricas, cerezas, menta verde y zanahorias, tienen un origen común de mevalonato pirofosfato eisopentenil que son lipofílicos en la naturaleza (Akihisa et al., 2000) los más relevantes son: *Mentona*, presente en la menta verde (Shaiq-Ali et al., 2002). *Ácido all-trans-retinoico*, presente principalmente en zanahorias, pimientos y brócoli (Theodosiou et al., 2010, Ambrosini et al., 2008).

**2.2.3. Otros compuestos polifenólicos.** Además de los flavonoides, muchos otros compuestos polifenólicos presentes en los alimentos muestran efectos benéficos en la salud adicionales a su aporte en las propiedades organolépticas. Entre estos compuestos pueden ser destacados los siguientes:

*Resveratrol*, un compuesto encontrado principalmente en la cascara de las uvas, el maní, moras, arándanos y en los vinos tintos (Kalantari et al., 2010),

*Pterostilbeno*, presente en las bayas de *Vaccinium* (Alosi et al., 2010),

*Curcumina*, componente mayoritario del rizoma seco de la cúrcuma (*Cúrcuma longa* Linn.) (Kaura et al., 2010; Rasyid et al., 2002),

[6]-*gingerol* y [6]-*shogaol*, son los principales componentes del rizoma de jengibre (*Zingiber officinale* Roscoe) perteneciente a la familia del jengibre *zingiberaceae*

(Weng et al., 2010). *Carnosol*, es un componente antioxidante presente en el romero (Bernardes et al., 2010).

**2.2.4. Carotenoides y ácidos grasos poliinsaturados omega-3.** Los carotenoides son pigmentos naturales liposolubles que proporcionan una coloración brillante a las plantas y a los animales. Entre estos podemos resaltar los siguientes compuestos:

*Licopeno*, un carotenoide encontrado en tomates, sandía, papaya, albaricoques, naranjas y pomelo rosado (Vogel et al., 2010),

*β-caroteno*, es el más común de los carotenoides encontrado principalmente zanahorias, calabazas, mangos y papayas (Thürmann et al., 2002),

*Luteína*, es encontrada en vegetales de color verde oscuro, tales como la espinaca y la col rizada, es un pigmento amarillo que pertenece a la clase de carotenoides no-provitamina A (Burns-Whitmore et al., 2010).

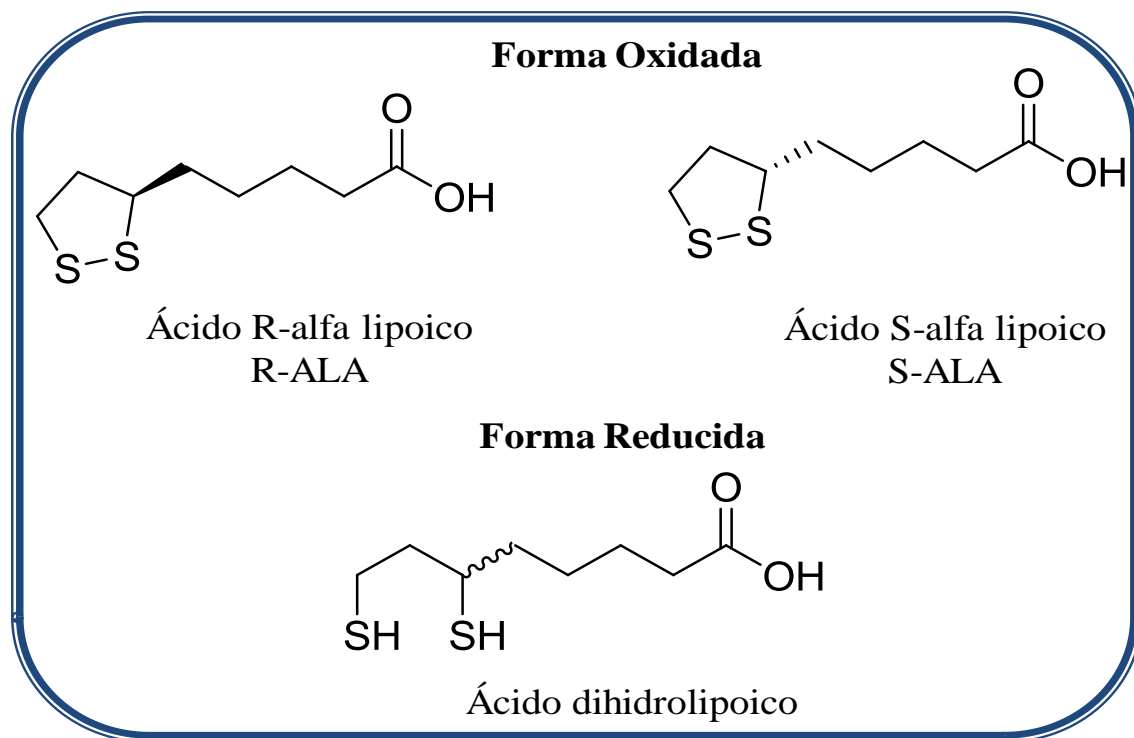
Los ácidos grasos poliinsaturados omega-3, son aceites esenciales cuya denominación omega-3 indica la posición del primer doble enlace contando desde el metilo terminal ( $-CH_3$ ), es decir que tiene su primer doble enlace en el tercer carbono contando a partir del  $-CH_3$  terminal (omega), entre estos se destacan los siguientes compuestos:

*Ácido eicosapentaenoico* y *Ácido docosahexaenoico*, encontrados principalmente en pescado de mar (Mann et al., 2010).

Las estructuras bidimensionales y sus respectivas fuentes naturales de cada uno de los compuestos anteriormente mencionados son presentadas en el Anexo A.

**2.2.5. Ácido alfa lipoico.** El ácido alfa lipoico (ALA) es una molécula relativamente pequeña, formado por un ácido carboxílico de cinco carbonos unido a un anillo cíclico disulfuro de cinco átomos. ALA es un antioxidante de los ácidos grasos. Es considerado un metabolito importante para la producción de energía en las mitocondrias, y también sirve como un potente limpiador de radicales libres en medios acuosos y lipofílicos. Este compuesto es utilizado como fármaco en muchos

países europeos, principalmente para el tratamiento de trastornos del hígado y neuropatías (Packer et al., 1999). La forma oxidada de este compuesto bioactivo tiene dos enantiómeros (R-ALA, y S-ALA), y la forma reducida es conocida como ácido dihidrolipoico (DHALA) como es presentado en la Figura 1 (Krämer et al., 2001).



**Figura 1.** Formas existentes del ácido alfa lipoico.

De las dos formas enantioméricas del ALA solo el enantiómero R (R-ALA) es sintetizado biológicamente, encontrándose naturalmente en los alimentos unido de forma covalente a lisina como lipoillisina (Packer et al., 1999).

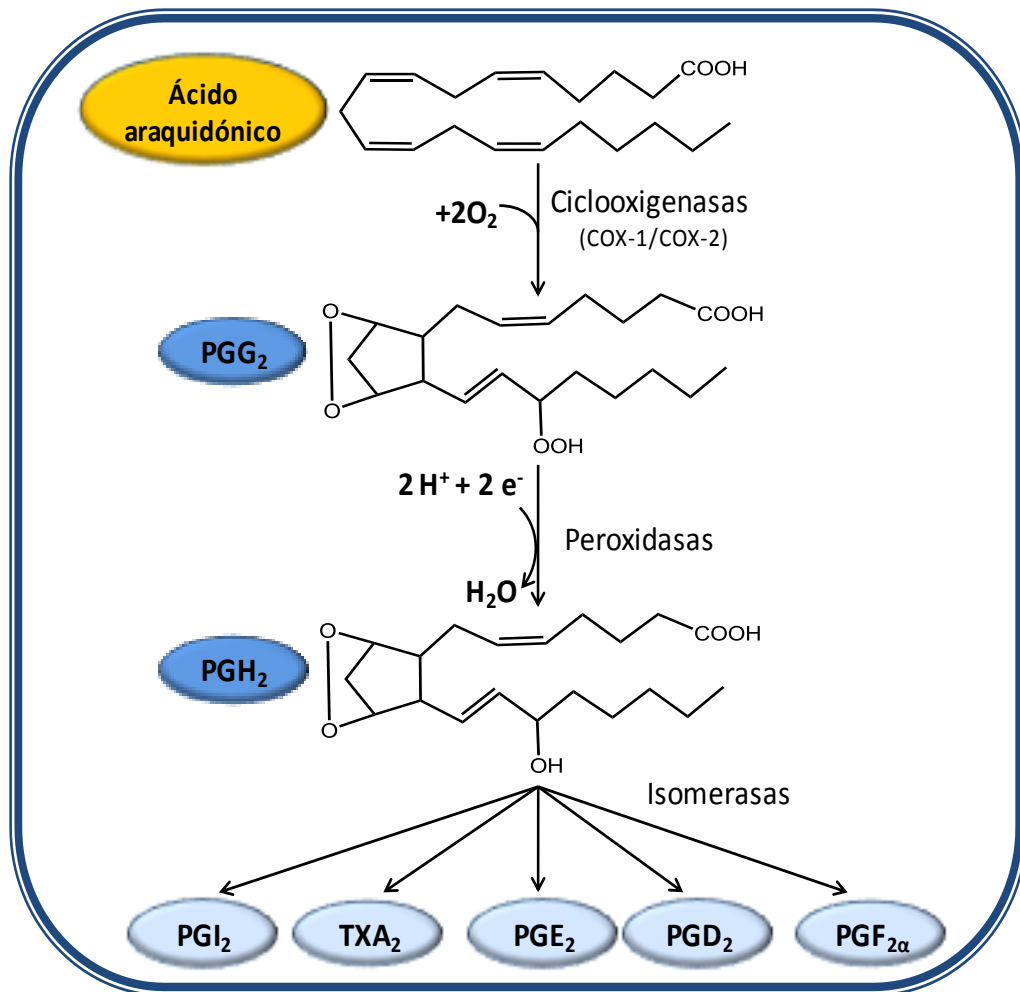
**2.2.6. Importancia terapéutica de compuestos naturales bioactivos.** Los efectos antiinflamatorios atribuidos a estos compuestos naturales ha despertado un especial interés entre los investigadores y médicos (Pan et al., 2009) inspirado por dos factores importantes: el amplio reconocimiento de la observación etnomédica y el tratamiento de la inflamación con plantas silvestres cultivadas y cosechadas (Lansky et al., 2008; Balick y Lee, 2005), y los grandes avances en el desarrollo de métodos sofisticados y confiables para la detección con fines terapéuticos de



compuestos con capacidad anti-inflamatoria (Hamza et al., 2011; Soikkeli et al., 2011).

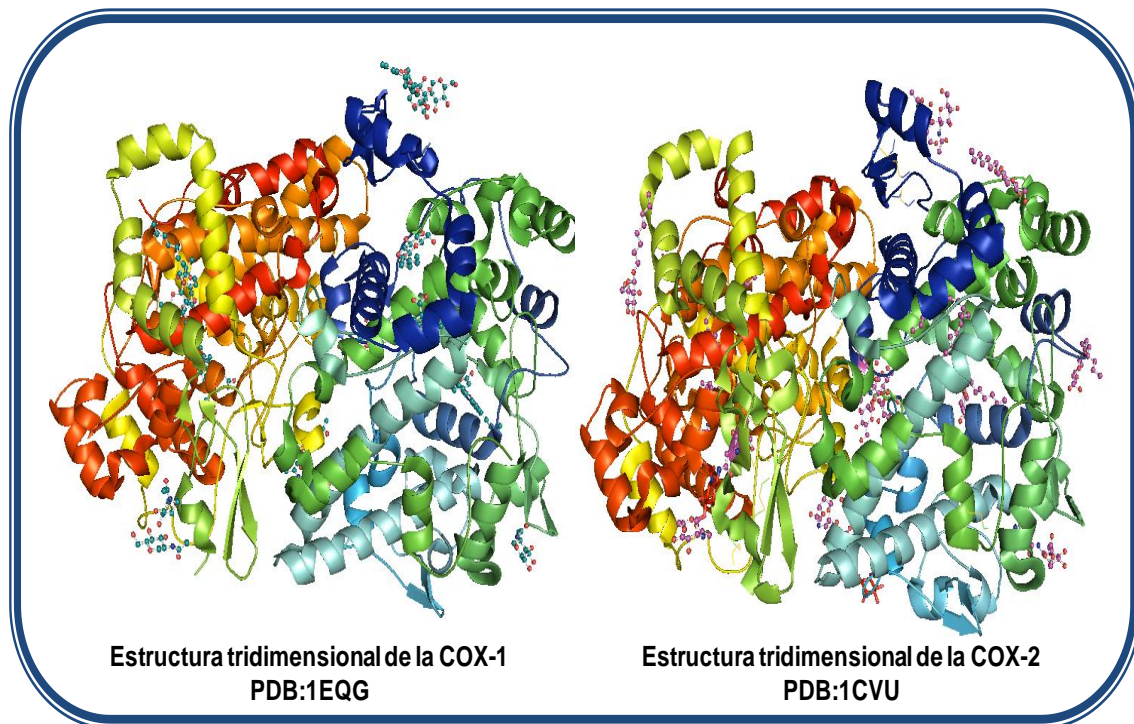
### **2.3. INFLAMACIÓN MEDIADA POR CICLOOXIGENASAS**

La inflamación es una respuesta normal a cualquier estímulo nocivo que amenaza el organismo y puede variar de una respuesta localizada a una generalizada. Los anti-inflamatorios no esteroideos (AINEs) han sido ampliamente utilizados para el tratamiento de las enfermedades que presentan proceso inflamatorios, debido a la inhibición de una enzima de membrana llamada ciclooxigenasa (COX), que participa en la biosíntesis de prostaglandinas (Fernández-Tome et al., 2004). La COX es una enzima clave en la transformación del ácido araquidónico en prostaglandinas y tromboxanos (Figura 2). En 1971 fue identificada como el blanco molecular de la aspirina y los AINEs por John Vane y fue aislada en 1976 y clonada solo hasta 1988 (Kam et al., 2009). La isoforma COX-2 fue descubierta entre 1989 y 1992 por tres laboratorios independientes (Xie et al., 1991; Kujubu et al., 1991; O'Banion et al., 1991). Desde entonces existen dos muy bien conocidas y caracterizadas ciclooxigenasas COX-1 y COX-2. La elucidación de la estructura y clonación de COX-2 revolucionó la forma de entender la farmacología de los AINEs (Kam et al., 2009). Sin embargo, existe una nueva isoforma de ciclooxigenasa, la cual fue aislada en 2002 como una variante de COX-1, encontrándose en altas concentraciones en el corazón y la corteza cerebral de los perros, esta nueva isoforma fue reportada como COX-3 (Chandrasekharan et al., 2002), siendo posteriormente identificada como blanco farmacológico del paracetamol.



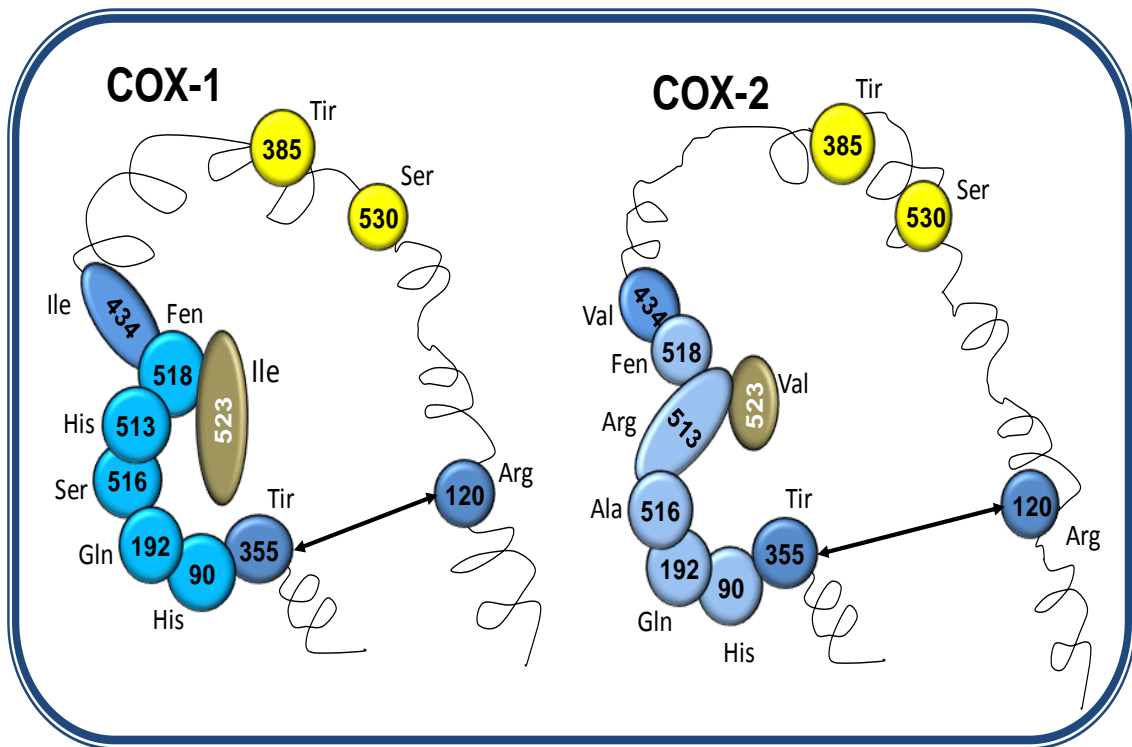
**Figura 2.** Conversión del ácido araquidónico a prostaglandinas y tromboxanos por acción de las ciclooxygenasas (COX-1/COX-2).

**2.3.1. COX-1 y COX-2.** Las enzimas ciclooxygenasas 1 y 2 (Figura 3) han sido las más relacionadas con procesos inflamatorios. COX-1 es una enzima constitucional isoenzima que es muy importante en el mantenimiento de la función renal, de las plaquetas, y el epitelio gastrointestinal (Mitchell y Warner, 1999). COX-2 es la isoenzima inducible que es expresada por la inflamación de los tejidos, aunque ha sido relacionada con funciones homeostáticas en el riñón, sistema cardiovascular y el cerebro (FitzGerald y Patrono, 2001).



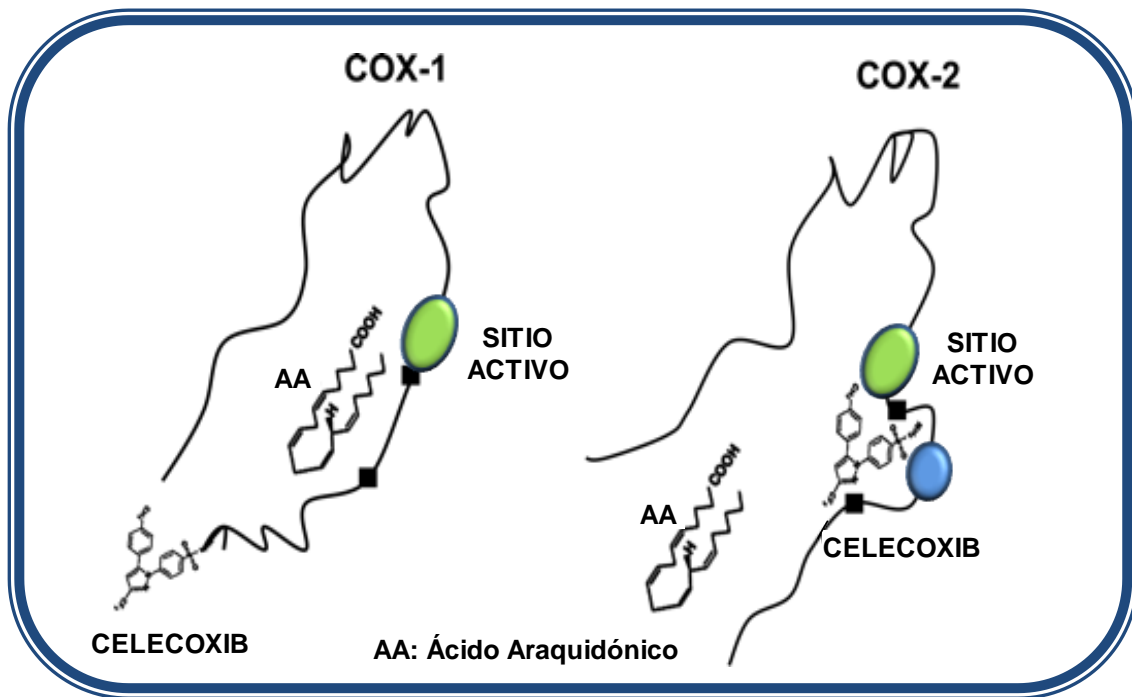
**Figura 3.** Estructuras 3D de las ciclooxigenasas COX-1 y COX-2.

**2.3.2. Inhibición selectiva de COX-2.** Actualmente, una gran cantidad de compuestos inhibidores de COX-2 han sido reportados en la literatura (Uddin et al., 2011; Sobolewski et al., 2011; Vinogradova et al., 2011). La selectividad por la COX-2 resulta principalmente por las diferencias estructurales entre las isoforma COX-1 y COX-2. En primer lugar, la sustitución del aminoácido isoleucina 523 (Ile523) en la COX-1 por el aminoácido menos voluminoso valina 523 (Val523) en COX-2, lo cual permite el acceso a un bolsillo lateral hidrofílico adicional. La existencia de éste en COX-2 permite la interacción con otros aminoácidos como la arginina 513 (Arg513), reemplazada por una histidina en COX-1 (Figura 4). Esta modificación sería otro factor contribuyente a la especificidad a COX-2 (Michaux et al., 2006).



**Figura 4.** Diferencias entre los sitios activos de las ciclooxygenasas 1 y 2.

En segundo lugar, la conservación Leu384, ubicado en la parte superior del canal, se orienta de manera diferente en las dos isoformas. De hecho, en COX-1, la presencia de una fenilalanina en la posición 503 (Phe503) obliga a la cadena lateral de la leucina 384 (Leu384) hacia el punto interior del sitio activo. Por otro lado, en COX-2, la leucina con un volumen menor en esta posición (503) permite que la cadena lateral de Leu384 alejarse de la parte activa y genera un espacio accesible en el vértice del sitio de unión de la COX-2 (Bayly et al., 1999). Estas dos diferencias principales aumentan el volumen del sitio activo de la COX-2 (20% más) en comparación con COX-1, lo cual es utilizado para el diseño de nuevos inhibidores selectivos de la COX-2 (Zarghi et al., 2011) como es observado en la Figura 5.



**Figura 5.** Inhibición selectiva de celecoxib para COX-2.

#### 2.4. PROTOCOLOS DE ACOPLAMIENTO MOLECULAR PARA EL DESCUBRIMIENTO DE INHIBIDORES DE COX-2

El descubrimiento de inhibidores de COX-2 representa un logro importante de los esfuerzos en las últimas décadas para desarrollar tratamientos terapéuticos para la inflamación. Para obtener información sobre la identificación de nuevos inhibidores de COX-2, generalmente nos dirigimos a la base estructural por medio de un protocolo de acoplamiento molecular, como paso anterior a las pruebas experimentales (Park y Lee, 2005), entre los programas más comúnmente utilizados para este fin encontramos GOLD, Surflex-Dock y AutoDock Vina, descritos a continuación.

**2.4.1. GOLD (Genetic Optimization for Ligand Docking).** Este programa utiliza una función de puntuación llamado conveniencia (fitness) para clasificarlos diferentes modos de unión del ligando a la proteína. Está compuesto de cuatro términos: a) la puntuación de enlaces de hidrógeno proteína-ligando, b) la puntuación de fuerzas de van der Waals proteína-ligando, c) la contribución a la conveniencia, debido a los enlaces de hidrógeno intramoleculares en el ligando, y

d) la contribución debida a la tensión intramolecular del ligando. Además, tiene un mecanismo para colocar el ligando en el sitio de unión con puntos de fijación, y por último, utiliza un algoritmo de búsqueda para explorar los posibles modos de unión (Verdonk et al., 2003).

**2.4.2. Surflex-Dock (Programa Sybyl).** Surflex-Dock, utiliza una función de la puntuación empírica y un motor de búsqueda patentado para encontrar el sitio de unión del ligando de la proteína. Surflex-Dock cuenta con un sitio activo idealizado del ligando a la proteína llamado protomol como blanco para generar poses putativas de moléculas o fragmentos moleculares. Estas poses putativas son calificadas usando la función de puntuación “Hammerhead” que también sirve como una función de optimización local de las poses. Los resultados del acoplamiento para todas las moléculas son organizados según la puntuación total “Total score” representados en unidades  $-\log(Kd)^2$ , Kd es la constante de disociación (Jain et al., 2007).

**2.4.3. AutoDock Vina.** AutoDock Vina, es un programa usado para acoplamiento molecular y cribado virtual, que combina algunas de las ventajas de las funciones basadas en el conocimiento empírico y las funciones de puntuación: la información empírica es extraída, tanto de las preferencias conformacionales del complejo receptor-ligando y de las mediciones experimentales de afinidad. Los ligandos son clasificados con base a una función de puntuación de energía, para acelerar el cálculo de la puntuación, mediante la utilización de una red basada en la interacción proteína-ligando (Trott y Olson, 2010).

**2.4.4. Acoplamiento inverso proteína-ligando.** El enfoque de acoplamiento inverso es utilizado principalmente en la búsqueda de posibles proteínas blanco para moléculas pequeñas con actividad biológica conocida, empleando métodos de acoplamiento entre las estructuras almacenadas en una base de datos de proteínas con cavidad y un ligando específico. Los complejos con la mejor interacción proteína-ligando permiten identificar candidatos potenciales para la validación experimental (Tang et al., 2006).

Las posibles aplicaciones del método de acoplamiento inverso están dirigidas al descubrimiento de fármacos, principalmente en la detección de blancos terapéuticos desconocidos y secundarios de un fármaco, la identificación de blancos potenciales responsables de la toxicidad y/o efectos secundarios de un medicamento, y la exploración de mecanismos moleculares de compuestos bioactivos naturales (Mandal et al., 2009; Tang et al., 2006; Chen y Ung, 2002).

En la actualidad existen varios servidores y softwares utilizados para el acoplamiento inverso, tales como INVDOCK (Chen y Ung, 2002), EM-DOCK 3 (Harriman et al., 2007), TarFisDock (Li et al., 2006), entre otros.

**2.4.4.1. TarFisDock.** El servidor TarFisDock (Target Fishing Dock) es una herramienta disponible en la web creada por el Centro de Diseño y Descubrimiento de Fármacos (DDDC) de Shanghai (China), y desarrollada sobre la base del programa de acoplamiento Dock 4.0 (Li et al., 2006). Tiene como propósito encontrar potenciales proteínas blanco de pequeñas moléculas activas que fungen como ligandos (Cai et al., 2006). Es posible acceder libremente a esta herramienta a través de la web (<http://www.dddc.ac.cn/tarfisdock/>).

### 3. ESTADO DEL ARTE

La COX-2 es una enzima pro-inflamatoria inducida en una gran variedad de condiciones patológicas. En consecuencia, las estrategias dirigidas a inhibir la actividad enzimática de la COX-2 han sido aplicadas clínicamente para el tratamiento de enfermedades autoinmunes y, además, los mismos enfoques son actualmente investigados con fines anti-cáncer (Cerella et al., 2010).

Compuestos naturales bioactivos presentes en una gran variedad de alimentos, incluyendo frutas, verduras, cereales, legumbres, y té, entre otros, son utilizados para ayudar a prevenir muchas enfermedades que presentan procesos inflamatorios en algunas de sus etapas, incluyendo cáncer, enfermedades degenerativas, e inflamación crónica y aguda (Cerella et al., 2010). Los métodos modernos de la biología celular y molecular permiten comprender las interacciones de los diferentes compuestos bioactivos naturales con los mecanismos básicos de la respuesta inflamatoria.

Estos compuestos ejercen actividad anti-inflamatoria mediante la modulación de la expresión de genes pro-inflamatorios han demostrado una prometedora actividad como quimiopreventivos (Pan et al., 2009). Muchos de estos compuestos han sido reportados como moduladores de la expresión de la COX-2, incluyendo la curcumina, uno de los compuestos más referenciados (Wu et al., 2010; Sikora et al., 2010; Moghaddam et al., 2009; Jurenka, 2009), ácido all trans-retinoico, que ha sido utilizado para el tratamiento o alivio de enfermedades inflamatorias (Leelawat et al., 2005), genisteína, apigenina, cianidina y kaempferol, flavonoides presentes comúnmente en alimentos de la dieta natural, han sido utilizados para el tratamiento de muchas enfermedades, debido a sus conocidas propiedades antialérgicas, antivirales, anti-inflamatorias y vasodilatadoras (Li et al., 2010, Vela et al., 2010, Lee et al., 2010, Watkins et al., 2007, Calderone et al., 2004). Del mismo modo ha sido reportado experimentalmente que el ácido docosahexaenoico posee efectos anti-inflamatorios (Massaro et al., 2006). Por otra parte, el ácido alfa lipoico ha sido utilizado como medicamento en países europeos para tratamientos de desórdenes de hígado y neuropatías (Rakel, 2008). Recientemente han sido atribuidas actividades neuro protectoras y contra algunas patologías cardíacas,



efectos que han sido directamente relacionados con su potencial antioxidante (Wang et al., 2011, Perera et al., 2011).

A pesar de la gran cantidad de evidencia experimental que soporta la modulación de los compuestos bioactivos naturales sobre enzimas antiinflamatorias, principalmente sobre COX-2, hasta ahora pocos estudios han sido dirigidos al estudio de la interacción directa de estos compuestos con la enzima. Sin embargo, en el año 2005, Selvam y colaboradores, realizaron la evaluación de la capacidad inhibitoria de compuestos análogos de la curcumina de inhibir la actividad de la COX1 y COX-2, mediante estudios de acoplamiento molecular en los sitios activos de estas enzimas, usando herramientas computacionales, identificando análogos de la curcumina como potenciales inhibidores de COX-1 y COX-2. Estudios similares han sido realizados para el compuestos natural resveratrol (Zykova et al., 2008, Murias et al., 2004). Es conocido que el ácido alfa lipoico forma enlaces covalentes con el grupo  $\epsilon$ -amino de los residuos de lisina y funciona como un cofactor para las enzimas mitocondriales al catalizar la descarboxilación oxidativa del piruvato,  $\alpha$ -cetoglutarato y de cadena ramificada- $\alpha$ -cetoácidos (Gorąca et al., 2011). Sin embargo hasta ahora solo ha sido propuesto su interacción directa con el receptor de insulina con la ayuda de datos experimentales y la utilización de herramientas computacionales de modelación (Diesel et al., 2007).

## 4. OBJETIVOS

### 4.1. OBJETIVO GENERAL

Evaluar la interacción directa de 28 compuestos naturales bioactivos con COX- 2, e identificar potenciales blancos farmacológicos para el ácido alfa lipoico, mediante diferentes herramientas computacionales.

### 4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ❖ Identificar los compuestos naturales bioactivos con mejor probabilidad de interaccionar directamente con la COX-2.
- ❖ Identificar los principales residuos, interacciones y el tipo de interacción en el sitio de unión de la COX-2 con los compuestos naturales bioactivos con mejor valor de puntuación de interacción.
- ❖ Validar los datos de acoplamiento molecular obtenidos con Autodock Vina, GOLD, y Surflex-Dock con los datos biológicos de 21 inhibidores COX-2
- ❖ Realizar mediante un enfoque teórico el estudio del efecto sinérgico entre la curcumina y celecoxib sobre la inhibición de la COX-2.
- ❖ Identificar potenciales blancos farmacológicos para el ácido alfa lipoico mediante acoplamiento inverso.
- ❖ Identificar los principales residuos, interacciones y el tipo de interacción en el sitio de unión con el ácido alfa lipoico con mejor valor de puntuación de interacción.
- ❖ Comparar estructuralmente el ácido alfa lipoico y los inhibidores conocidos para los blancos que presenten mejor valor de interacción.

## 5. METODOLOGÍA

La metodología utilizada en este trabajo está dividida en dos etapas. Primero son detallados los pasos para la evaluación de la interacción molecular de 28 compuestos bioactivos con la COX-2, y posteriormente son descritos los pasos para la búsqueda de potenciales blancos farmacológicos para el ácido alfa lipoico.

### 5.1. EVALUACIÓN DE LA INTERACCIÓN DE 28 COMPUESTOS BIOACTIVOS SOBRE LA COX-2

Para evaluar la interacción de los 28 compuestos bioactivos sobre la actividad de la COX-2 fueron desarrollados los siguientes pasos:

**5.1.1. Preparación de la estructura de proteínas y ligandos.** Las coordenadas experimentales de tres estructuras de la COX-2 (1CX2, 1PXX y 1CVU) fueron obtenidas de la base de datos disponible en la web Protein Data Bank (PDB) (<http://www.pdb.org/pdb/home/home.do>) y posteriormente preparadas con el paquete Sybyl 8.1.1 (Tripos, 2007). Los compuestos naturales (28 en total) con propiedades anti-inflamatorias seleccionados para llevar a cabo este estudio, fueron aquellos reportados como moduladores de la expresión de genes relacionados con la inflamación (Pan et al., 2009). Todos estos productos químicos están presentes en frutas, hortalizas y pescado (Tabla 1), y han demostrado tener buenas propiedades anti-inflamatorias. Las estructuras fueron dibujadas con el programa Sybyl 8.1.1, tal y como son presentadas en el trabajo de Pan y colaboradores en 2009, y optimizadas usando la teoría funcional de la densidad (TFD) con un nivel B3LYP/6-31G, estos cálculos fueron realizados con el programa de Gaussian 03 (Frisch et al., 2003). La geometría resultante fue convertida al formato Mol2 con el programa Open Babel (Guha et al., 2006). Para determinar las similitudes estructurales entre 1CX2, 1PXX y 1CVU, una superposición molecular fue realizada utilizando el programa Sybyl 8.1.1.

**5.1.2. Cálculos de acoplamiento proteína-ligando.** La viabilidad de los compuestos naturales para ser ligandos de la COX-2 fue evaluada utilizando las estructuras de acoplamiento molecular. Esto fue desarrollado utilizando tres

programas diferentes de acoplamiento que son basados en funciones de puntuación diferentes para evaluar el desempeño del acoplamiento proteína-ligando: AutoDock Vina, Surflex-Dock (Sybyl) y el programa GOLD.

**Tabla 1.** Productos naturales bioactivos evaluados y sus fuentes

<b>Compuesto</b>	<b>Fuente natural</b>	<b>Referencia</b>
Apigenina	Apio	Yao et al., 2010
Tangeretina	Cítricos	Stuetz et al., 2010
Silibinina	Flor de cardo	Abenavoli et al., 2010
Cianidina	Cerezas	Reber et al., 2011
Genisteína	Soya	Weng et al., 2010
Delfinidina	Frutas oscuras	Castellarin y Di Gaspero, 2007
Epicatequina y Epigallocatequina-3-galato	Té verde	Wang et al., 2010
Naringenina	Naranjas	Lien et al., 2008
Quercetina y Kaempferol	Brócoli	Vasanthi et al., 2009
5-hidroxi-3,6,7,8,3',4' hexametoxiflavona	Cítricos	Lai et al., 2007
Curcumina	Curcuma	Kaura et al., 2010, Rasyid et al., 2002

Resveratrol	Uvas	Kalantari et al., 2010
[6]-gingerol y [6]-shogaol	Jengibre	Weng et al., 2010
Carnosol	Romero	Bernardes et al., 2010
Pterostilbeno	Bayas	Alosi et al., 2010
Bencil Isotiocianato y fenetil isotiocianato	Coles	Visanji et al., 2004
Sulforafano	Coles	Skupinska et al., 2009
Proantocianidinas	Bayas	Déziel et al., 2010
Ácido All <i>trans</i> -retinoico	Zanahorias	Theodosiou et al., 2010, Ambrosini et al., 2008
Mentona	Menta verde	Shaiq-Ali et al., 2002
Licopeno	Tomate	Vogel et al., 2010
$\beta$ -caroteno	Zanahorias	Thürmann et al., 2002
Luteína	Espinacas	Burns-Whitmore et al., 2010
Ácido eicosapentaenoico y Ácido docosahexaenoico	Pescado	Mann et al., 2010
Ácido alfa lipoico	Espinacas	Satoh et al., 2008

---

**5.1.3. Parámetros a utilizar con AutoDock Vina.** El sitio de acoplamiento para los ligandos en 1CX2, 1PXX y 1CVU fue definido mediante el establecimiento de un cubo en el centro geométrico del ligando nativo presente en cada una de las estructuras PDB evaluadas, con dimensiones 24x 24 x 24 Å, cubriendo el sitio de la unión del ligando con la proteína, y un espaciado de puntos de la red de 0.375 Å. Las coordenadas X, Y, Z desde el centro de las cuadrículas fueron para 1CX2: 25.374, 21.657 y 17.292, para 1PXX: 27.058, 24.431 y 15.437, y finalmente para 1CVU: 25.277, 22.358 y 49.308, respectivamente. Diez corridas de acoplamiento molecular fueron ejecutadas para cada ligando, y para cada corrida la mejor pose fue guardada como archivo Mol2 para los cálculos posteriores. Por último, el promedio de la afinidad de enlace para las mejores poses fue aceptado como el valor de afinidad de enlace para un complejo particular.

**5.1.4. Parámetros utilizados con GOLD.** El sitio de acoplamiento usando el programa GOLD fue definido para cada estructura (1CX2, 1PXX y 1CVU) utilizando las mismas coordenadas X, Y, Z empleadas para localizar el sitio de unión con el programa AutoDock Vina. Una esfera de radio de 10 Å fue definida por el centro geométrico del ligando nativo para cada proteína evaluada. Para cada corrida independiente, un número máximo de 125000 operaciones fueron realizadas. Los operadores, de peso de cruce (Operator weights for crossover), mutación y migración fueron establecidos en modo automático, la distancia máxima entre los donantes de átomos de hidrógeno fueron establecidos en 3.0 Å, y las energías de Van der Waals no-enlazantes cortadas (cut-off) en 6.0 Å.

**5.1.5. Parámetros utilizados con Surflex-Dock (SYBYL).** Para los cálculos de acoplamiento con Surflex-Dock, fue creado un protomol usando un enfoque basado en el ligando (ligando nativo para cada estructura de la COX-2). El Proto\_threshold fue establecido en 0.5 y el proto\_bloat fue ajustado a 0.0 como parámetros por defecto. Para cada complejo proteína-ligando, las veinte mejores soluciones de acoplamiento fueron guardadas y las puntuaciones de Surflex-Dock presentadas como el promedio de estos valores.

Estas funciones de acoplamiento también fueron utilizadas para calcular las puntuaciones de acoplamiento de los inhibidores de la COX-2 como lo son: SC558

y el diclofenaco, así como para el sustrato natural ácido araquidónico. Estas moléculas también fueron obtenidas a partir de PDB. Todos los cálculos de acoplamiento proteína-ligando realizados sobre las la COX-2 fueron desarrollados utilizando el sitio de unión del inhibidor a la estructura cristalina (PDB: 1CX2 y 1PXX) o el sitio de unión al sustrato (PDB: 1CVU). Estos sitios de unión son encontrados en la misma región donde están estos compuestos en la estructura cristalina de la COX-2. En todos los casos, las afinidades fueron reportadas como el valor medio obtenido para el 10 corridas de acoplamiento realizadas por cada ligando con cada una de los programas de acoplamiento utilizados en este estudio.

**5.1.6. Identificación de residuos interaccionantes con los compuestos naturales bioactivos en el sitio unión con COX-2.** La identificación de residuos de proteínas que interaccionan con los compuestos bioactivos naturales que tienen la mayor afinidad fueron llevados a cabo utilizando el programa Ligand Scout 3.0 (Wolber y Langer, 2005). Este programa crea farmacóforos simplificados para detectar el número y tipo de residuos más importantes que participan en la interacción entre el ligando en el sitio de unión con la proteína.

**5.1.7. Validación de acoplamiento con los datos biológicos de inhibidores COX-2.** Las estructuras en 2D y los datos biológicos de 21 de inhibidores de la COX-2 fueron obtenidas de la librería de compuestos químicos PubChem(<http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>)y la literatura (Filizola et al., 1997, Dewitt, 1999). Procedimientos de acoplamiento fueron realizados con tres herramientas computacionales de acoplamiento: AutoDock Vina, GOLD y Surflex Dock (Trott y Olson, 2010, Verdonk et al., 2003, Jain et al., 2007), a raíz de los mismos procedimientos descritos anteriormente para estudiar los productos bioactivos naturales. Los datos biológicos consistieron en medias concentraciones inhibitorias máximas ( $CI_{50}$ ), y los detalles de los protocolos de ensayos, así como los materiales están disponibles en la librería de bioensayos de pubchem "BioAssay PubChem". La relación entre la afinidad o puntuación de acoplamiento calculada para los inhibidores en las tres de las estructuras de COX-2 evaluadas (media de los valores) y los datos experimentales de actividad ( $\text{Log}CI_{50}$ ) fue desarrollada mediante un análisis de correlación lineal (Zhou et al., 2009), utilizando el Software Graph InStat (versión 3.06, 2003).

**5.1.8. Enfoque teórico para el estudio del efecto sinérgico entre la curcumina y celecoxib sobre la inhibición de la COX-2.** Estudios anteriores han informado que la curcumina actúa sinérgicamente con celecoxib en la inhibición de la síntesis de prostaglandina E<sub>2</sub> proveniente de la COX-2 (Lev-Ari et al., 2006c; Lev-Ari et al., 2005), pero los mecanismos moleculares aún son bastante desconocidos. Con el fin de tener más información de este proceso, fueron realizadas simulaciones de acoplamiento sobre la superficie completa de la COX-2 (PDB: 3LN1) con los dos compuestos (curcumina y celecoxib). Para evaluar si la curcumina presenta el mismo sitio de unión o sitios diferentes al celecoxib sobre la COX-2, una serie de 500 corridas de acoplamiento molecular con el programa AutoDock Vina fueron realizadas con los siguientes parámetros de acoplamiento. Estableciendo de un cubo con dimensiones de 60 × 84 × 72 Å cubriendo la proteína completa (Cadena A), con un espaciado de malla de 1.0 Å, utilizando como centro del cubo el centro de la misma proteína.

## **5.2. BÚSQUEDA DE BLANCOS PARA EL ÁCIDO ALFA LIPOICO**

La búsqueda de los blancos farmacológicos para el ácido alfa lipoico fue realizada siguiendo los siguientes pasos:

**5.2.1. Modelado de estructuras del ácido alfa lipoico.** En el presente estudio R-ALA, S-ALA y las estructuras DHLA fueron dibujadas y optimizadas, usando los mismos parámetros que aquellos empleados para el estudio de los compuestos acoplados a COX-2.

**5.2.2. Búsqueda de blancos teóricos para el ácido alfa lipoico con TarFisDock.** Una vez optimizadas las estructuras fueron cargadas a TarFisDock para encontrar las proteínas con estructuras tridimensionales con sitios teóricos de unión para cada una de las especies del ácido alfa lipoico. La búsqueda inició utilizando la opción "Blancos en todas las categorías", y el acoplamiento ligando fue realizado en todas las proteínas (1207 proteínas disponibles en la actualidad) presentes en PDTD (Potential Drug Target Database).



### **5.2.3. Validación de los cálculos de acoplamiento molecular para ALA.**

AutoDock Vina puede detectar cavidades de proteínas que permitan la unión de un ligando en cualquier proteína dada, en función de un valor de afinidad (kcal/mol). Por lo tanto fueron seleccionadas varias proteínas al azar de la base de datos Protein Data Bank (PDB). Los modelos de proteínas seleccionadas al azar fueron 1ABI, 1CA2, 1CAI, 1DFR, 1FDH, 1LCT, 1LFH, 1RHG, 2DHF, 2HHM, 2PAB, 2W9I, 2XAI, 3A1F, 3GPD, 3GRG, 3LHM, 4HVP, 4I1B y 8FAB, estos fueron acoplados a R-ALA con AutoDock Vina, y los valores de afinidad fueron utilizados para determinar un valor teórico para afinidades de proteínas no específicas para R-ALA.

### **5.2.4. Acoplamiento de las estructuras del ácido alfa lipoico con los blancos moleculares predichas por TarFisDock.**

Las estructuras R-ALA, S-ALA y DHLA fueron acopladas a cada una de las proteínas blanco predichas por TarFisDock, después de ser preparadas con el programa Sybyl 8.1.1. El acoplamiento fue realizado con el programa AutoDock Vina con el fin de obtener los valores de afinidad de unión (kcal/mol) de un ligando particular. El sitio de acoplamiento para las estructuras del ácido alfa lipoico en los blanco farmacológicos de la proteína fue definido mediante el establecimiento de un cubo con las dimensiones de  $24 \times 24 \times 24$  Å, de manera tal que cubra el sitio de unión predicho por TarFisDock, y usando un espaciado de malla de 0,375 Å, a partir del centro de masas del ligando. Diez corridas con AutoDock Vina fueron ejecutadas en todos los casos por cada estructura del ácido alfa lipoico, y para cada corrida fue guardada la mejor pose. La afinidad media para las mejores poses fue tomada como el valor de afinidad final de un complejo en particular.

### **5.2.5. Identificación de residuos interaccionantes con el ácido alfa lipoico en el sitio unión con las proteínas blanco.**

Las proteínas presentes en mamíferos con los mejores valores de afinidad para el ácido alfa lipoico, fueron chequeadas con el programa LigandScout 3.0 para detectar aquellas interacciones importantes en cada uno de los complejos proteína-ácido alfa lipoico.

### **5.2.6. Acoplamiento de inhibidores conocidos de los blancos moleculares predichas por TarFisDock para el ácido alfa lipoico.**

Inhibidores conocidos para

las proteínas en mamíferos predichas por TarFisDock para el R-ALA reportados en las bases de datos PubChem y DrugBank (<http://drugbank.ca/>) y sus afinidades fueron calculadas con AutoDock Vina 1.0. El sitio de unión fue establecido específicamente en el sitio propuesto por el servidor TarFisDock para el R-ALA. Parámetros similares de acoplamiento y el número de corridas ejecutadas a los utilizados para las estructuras del ácido alfa lipoico también fueron empleados para el cálculo de la afinidad de los inhibidores a las proteínas blanco.

### **5.3. ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

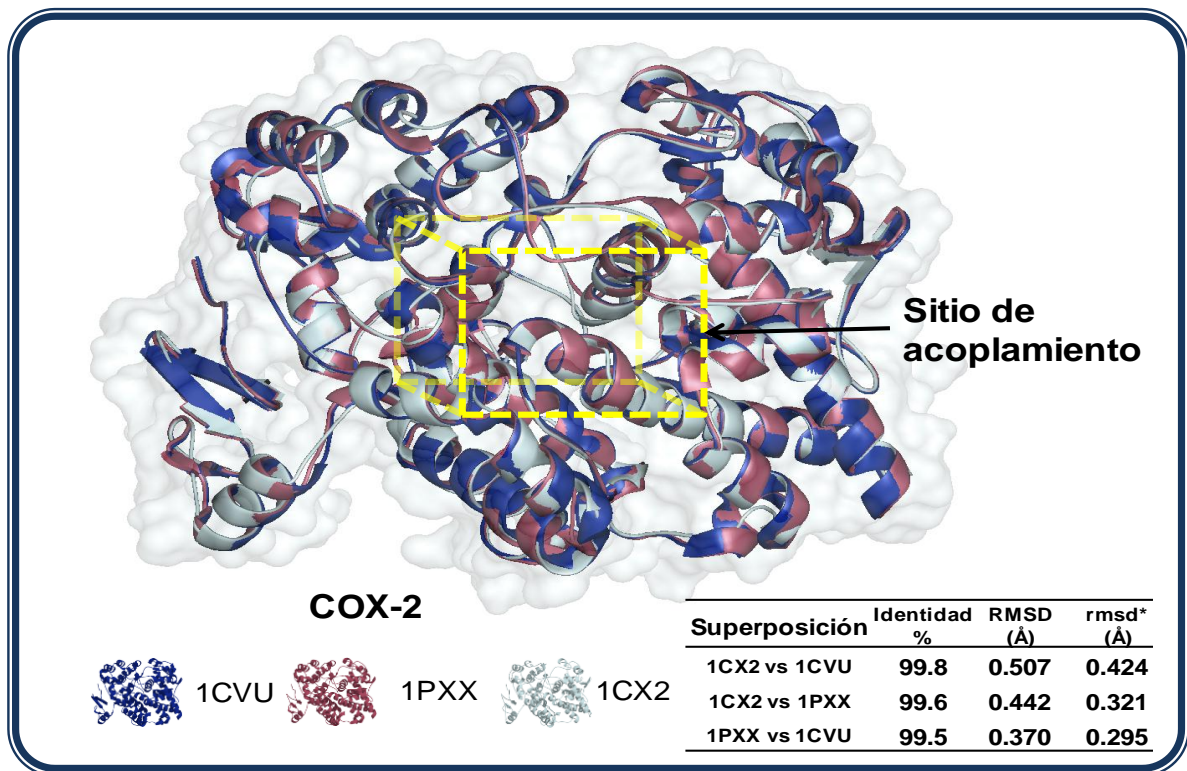
Las diferencias entre las medias de las variables para diferentes grupos de moléculas fueron evaluadas mediante un análisis de varianza (ANOVA). Los resultados fueron expresados como las diferentes conformaciones de los compuestos, y los valores de afinidad (kcal/mol) como la media±desviación estándar. Para todos los análisis estadísticos el criterio de significancia fue establecido a  $P < 0.05$ .

## 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 6.1. EVALUACIÓN DE LA INTERACCIÓN DE LOS 28 COMPUESTOS BIOACTIVOS SOBRE LA COX-2.

Una vez desarrollada la metodología propuesta para evaluar la potencial interacción de los 28 compuestos bioactivos sobre la COX-2 fueron obtenidos los resultados descritos a continuación.

**6.1.1. Similitudes estructurales entre las diferentes estructuras evaluadas de COX-2.** La superposición de las estructuras 3D de COX-2 (PDB: 1CX2, 1CVU y 1PXX), así como los valores de RMSD para cada par de ellos son presentados en la Figura 6. En la cual se pueden apreciar, solo pequeñas diferencias entre estas estructuras tridimensional de la COX-2 (de identidad de secuencia > 99.5 y RMSD < 0.507 Å), siendo mucho menor cuando son tenidos en cuenta solo los residuos presentes en el sitio de unión con el ligando donde el valor de RMSD es mucho menor (RMSD < 0.425). Sin embargo, estas pequeñas diferencias estructurales pueden tener efectos importantes en los valores de afinidad para los compuestos con cada una de las estructuras de COX-2.



**Figura 6.** Superposición tridimensional de las estructuras COX-2 (1CVU, 1PXX y 1CX2), mostrando el porcentaje de identidad de la secuencia y los valores de RMSD entre las tres estructuras. \*rmsd para el sitio de acoplamiento.

**6.1.2. Cálculos de acoplamiento con los programas AutoDock Vina, GOLD y Surflex-Dock (SYBYL).** Las afinidades y puntuaciones de acoplamiento obtenidas para los compuestos naturales sobre diferentes estructuras de COX-2 con tres herramientas computacionales distintas son presentadas en la Tabla 2. Los resultados indican que en comparación con los compuestos bioactivos de la dieta natural evaluadas, la afinidad de unión calculada por el programa AutoDock Vina para SC558, diclofenaco(inhibidores), y ácido araquidónico (sustrato) fueron más consistentes en cuanto a la magnitud del valor esperado previsto, de los valores generados por los resultados calculados por los programas GOL y Surflex-Dock (Sybyl). En el caso de GOLD, la presencia del nitrógeno parece generar resultados contradictorios (valores negativos) para el diclofenaco, y la alta variabilidad de las puntuaciones de enlace obtenidas para las diferentes estructuras dela COX-2. Por otra parte, la función Surflex-Dock (Sybyl), también mostraron una considerable

variabilidad de las puntuaciones obtenidas para las estructuras de la COX-2. Por lo tanto, los cálculos y discusiones sucesivas son referidos solamente a los resultados de afinidad proporcionados por el programa AutoDock Vina.

**Tabla 2.** Resultados del acoplamiento molecular para los compuestos naturales bioactivos sobre las estructuras de COX-2 utilizando diferentes programas

Nombre de la proteína: Ciclooxigenasa-2 (COX-2)	1CX2			1PXX			1CVU		
	AV* Afinidad (Kcal/mol)	G Fitness	S Total Score	AV Afinidad (Kcal/mol)	G Fitness	S Total Score	AV Afinidad (Kcal/mol)	G Fitness	S Total Score
Curcumina	-8.4	51.41	7.60	-8.7	52.18	5.44	-9.3	52.62	7.03
Silibinina	-7.8	25.33	4.67	-3.6	44.59	0.79	-7.8	37.70	3.97
Apigenina	-8.4	47.99	5.24	-8.6	49.48	4.96	-8.9	48.68	6.08
Genisteina	-8.4	43.42	4.49	-9.1	49.05	5.13	-8.8	48.03	5.15
Naringenina	-8.3	50.78	6.04	-8.4	49.66	5.89	-8.6	47.11	5.43
[6]-Shogaol	-8.0	54.43	9.10	-7.6	49.73	8.34	-7.8	53.17	7.02
[6]-Gingerol	-8.0	55.73	7.54	-7.6	46.76	8.24	-7.7	55.00	7.69
Ácido docosahexaenoico	-7.7	63.84	9.10	-7.5	60.62	9.57	-8.8	64.05	10.73
Cianidina	-7.6	46.71	5.25	-8.1	49.41	3.24	-8.9	51.37	5.70
Quercetina	-7.6	46.78	5.84	-8.1	49.55	4.57	-8.8	47.97	6.23
Resveratrol	-7.6	45.19	5.11	-8.0	47.15	6.49	-8.0	46.02	5.31
Ácido eicosapentaenoico	-7.4	59.86	9.37	-7.5	58.10	8.98	-8.5	61.63	8.78
Tangeretina	-7.5	48.91	3.90	-7.7	65.16	6.82	-8.1	60.72	5.21
Epicatequina	-7.4	43.09	6.32	-8.5	47.23	5.19	-8.7	46.58	5.68
Kaempferol	-7.6	46.93	4.13	-7.9	48.48	3.85	-8.8	47.29	4.45
Delfinidina	-7.1	48.64	5.79	-8.1	49.77	3.84	-8.4	50.75	6.04
Pterostilbeno	-6.9	49.10	6.94	-7.9	49.03	7.15	-8.2	48.09	6.79
Ácido all- <i>trans</i> retinoico	-7.2	36.84	5.08	-7.3	39.23	5.36	-9.3	46.28	6.90
Carnosol	-6.8	17.40	2.81	-5.6	44.06	4.33	-8.1	48.73	5.56

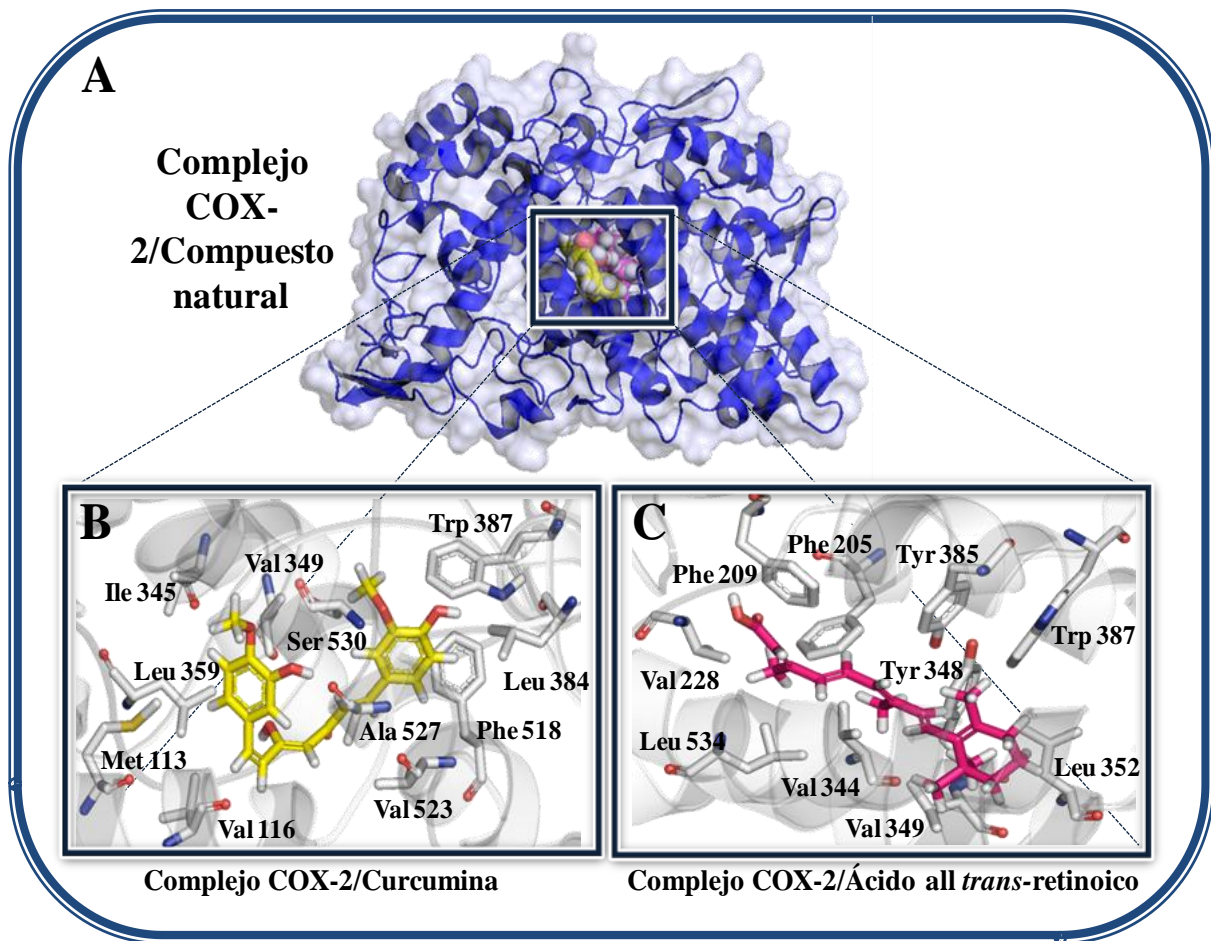
Mentona	-6.3	29.56	3.30	-6.6	30.11	4.15	-6.6	29.63	4.03
Bencil isotiocianato	-5.9	39.73	2.83	-6.0	40.34	3.19	-6.1	39.02	2.95
Fenetil isotiocianato	-6.1	44.28	4.42	-6.1	41.84	3.48	-6.5	38.86	3.29
Epigallocatechin-3-gallate	-7.2	52.43	4.88	-6.7	54.01	3.26	-8.2	59.86	6.43
B-Caroteno	-5.7	20.8	6.58	3.3	-103.52	5.60	-6.1	-21.11	6.66
Licopeno	-5.3	20.59	5.33	-5.6	21.64	3.20	-7.6	2.11	4.04
5-Hidroxi-3,6,7,8,3',4'-Hexametoxiflavona	-6.1	48.27	8.33	-6.7	55.94	9.59	-7.9	49.00	8.06
Sulforafano	-4.4	45.61	3.38	-4.7	42.94	4.04	-4.8	43.43	3.72
Luteína	-3.9	31.69	4.99	3.6	-89.77	4.56	-5.6	-65.32	2.77
Proantocianidina B2	-1.8	-44.04	2.70	3.8	-48.54	-1.26	-4.5	-39.79	1.15
SC558 (Inhibidor)	-10.7	51.75	6.03	-10.0	45.21	5.59	-10.1	43.44	4.55
Diclofenaco(Inhibidor)	-8.0	-122.97	4.42	-8.6	-119.46	5.46	-8.8	-117.28	2.24
Ácido Araquidónico(Sustrato)	-8.0	59.70	8.64	-7.5	58.18	9.58	-7.8	66.83	10.81

\*. Valores de las diferentes funciones de puntuación calculados para cada protein: AV, AutoDock Vina; G, GOLD; S, Surflex-Dock (SYBYL).

De acuerdo con los valores de afinidad obtenidos por AutoDock Vina (kcal/mol), varios de estos compuestos naturales son ligando potenciales de la COX-2, con las mejores puntuaciones obtenidas para la estructura con código PDB: 1CVU, incluyendo curcumina, ácido *trans*-retinoico (mayores valores absolutos de afinidad, siendo 9.3 kcal/mol para ambos), así como genisteína, apigenina, cianidina, kaempferol y el ácido docosaheptaenoico.

**6.1.3. Interacción entre los residuos en el sitio activo de la COX-2 y los compuestos naturales bioactivos.** El complejo entre la COX-2 (PDB: 1CVU) y los compuestos naturales curcumina y ácido *All trans*-retinoico, así como las interacciones entre los residuos en el sitio de unión a la proteína de estos ligando son presentados en la Figura 7. Ambos ligandos se acoplan muy bien al sitio de unión (Figura 7A). Los residuos más importantes en el complejo 1CVU-curcumina (Figura 7B) fueron Met113, Val116, Ile345, Val349, Leu359, Leu384, Trp387, Phe518, Ala527, Val523ySer530. La mayoría de las interacciones son de naturaleza hidrofóbica y aromática, a excepción de Ser530, que interacciona con la curcumina

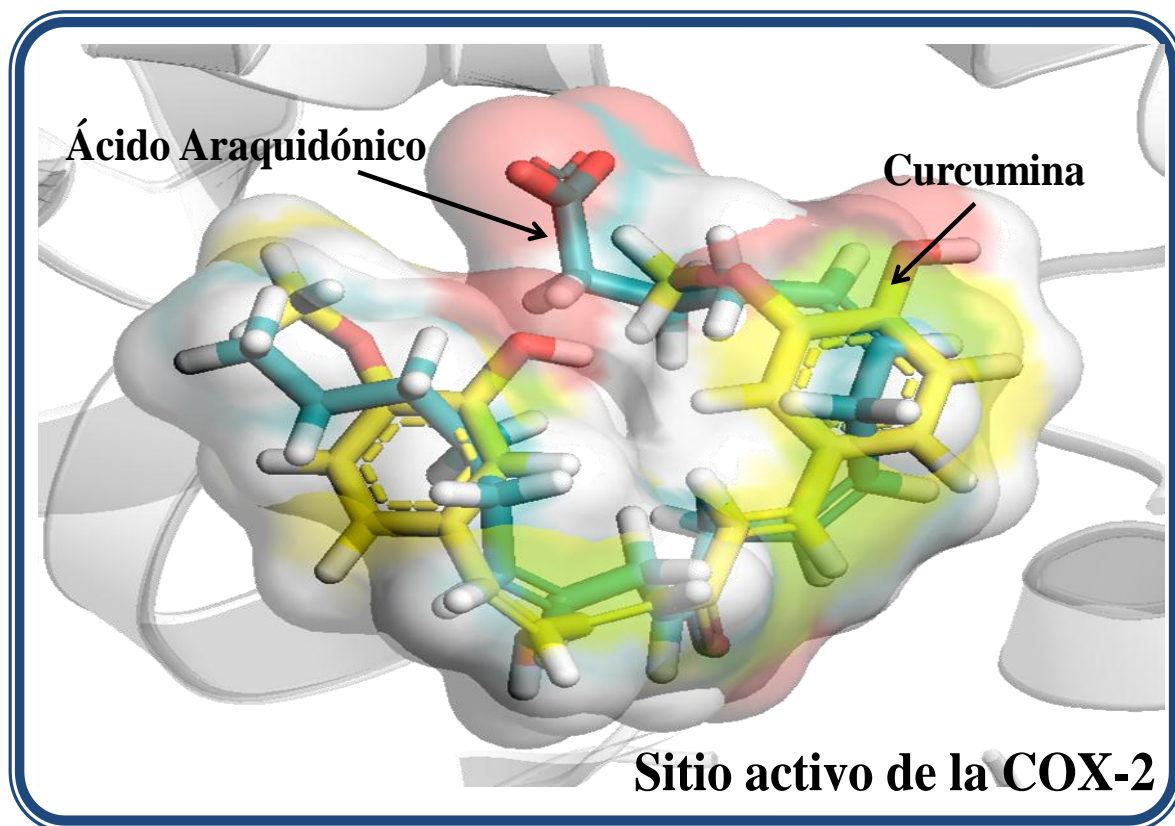
a través de un enlace puente de hidrógeno. Para el complejo 1CVU-ácido all *trans*-retinoico (Figura 7C), los aminoácidos más relevantes son Phe205, Phe209, Val228, Val344, Tyr348, Val349, Leu352, Tyr385, Trp387 y Leu534, mostrando sólo interacciones de tipo hidrofóbico con este ligando. La mayoría de estos residuos presentes en el sitio activo también han sido reportados para compuestos químicos con una fuerte interacción con COX-2 (Selvam et al., 2005, Furse et al., 2006).



**Figura 7.** Estructura 3D de los complejos COX-2 (1CVU)-ligandos. (A) COX-2 unido a curcumina o el ácido *trans*-retinoico (recuadro) (B). Residuos participantes en la interacción de la COX-2 con curcumina. (C) Residuos participantes en la interacción de la COX-2-ácido all *trans*-retinoico.

La conformación más favorable encontrada para el acoplamiento de la curcumina en el sitio activo de la COX-2 es similar a la experimentalmente determinada para el sustrato natural de COX-2, ácido araquidónico (PDB: 1CVU) (Figura 8). Por consiguiente, es plausible sugerir que la curcumina puede ejercer su acción,

actuando como un inhibidor competitivo del ácido araquidónico durante la síntesis de prostaglandina E2 por la COX-2.



**Figura 8.** Conformación de acoplamiento de la curcumina y el sustrato ácido araquidónico (experimental) en el sitio activo de la COX-2 (1CVU).

Entre los muchos productos naturales con conocidas propiedades anti-inflamatorias, la curcumina es uno de los más referenciados en la literatura (Wu et al., 2010, Sikora et al., 2010, Moghaddam et al., 2009, Jurenka, 2009). Este compuesto fenólico es un pigmento amarillo presente en el polvo de curry, que ha sido asociado con muchos efectos benéficos en la salud humana como consecuencia de su consumo en los alimentos. Ha sido demostrado que la curcumina exhibe actividad antioxidante, antiinflamatoria y pro-apoptótica (Pan et al., 2009). Aunque, otros compuestos fenólicos procedentes de los alimentos también han sido relacionados con propiedades anti-inflamatorias, están presentes en las uvas, el maní, moras, arándanos y el vino tinto (Galati et al., 2002).



Por otra parte, el ácido All *trans*-retinoico, que es un terpenoide de color amarillo a amarillo naranja derivado naturalmente por la vía del mevalonato e isopentenil pirofosfato de (Akihisa et al., 2000), también ha sido utilizado para el tratamiento o alivio de enfermedades inflamatorias (Leelawat et al., 2005).

Otras moléculas que según su valor de afinidad, acoplaron muy bien en el sitio activo COX-2 fueron genisteína, apigenina, cianidina y kaempferol. Estos son flavonoides presentes comúnmente en alimentos de la dieta natural, los cuales han sido utilizados para el tratamiento de muchas enfermedades, debido a sus conocidas propiedades antialérgicas, antivirales, anti-inflamatorias y vasodilatadoras (Li et al., 2010, Vela et al., 2010, Lee et al., 2010, Watkins et al., 2007, Calderone et al., 2004). Del mismo modo, el ácido docosahexaenoico ha sido reportado que posee efectos anti-inflamatorios y de protección cardiovascular (Massaro et al., 2006).

Aunque los valores obtenidos mediante el análisis de acoplamiento molecular *in silico* deben ser considerados sólo como una aproximación teórica, esta información podría ser de gran utilidad para el estudio de los posibles mecanismos por los que estas sustancias químicas se comportan como compuestos anti-inflamatorios, en particular si estos podrían unirse directamente a proteínas relacionadas directamente con procesos inflamatorios como la COX-2.

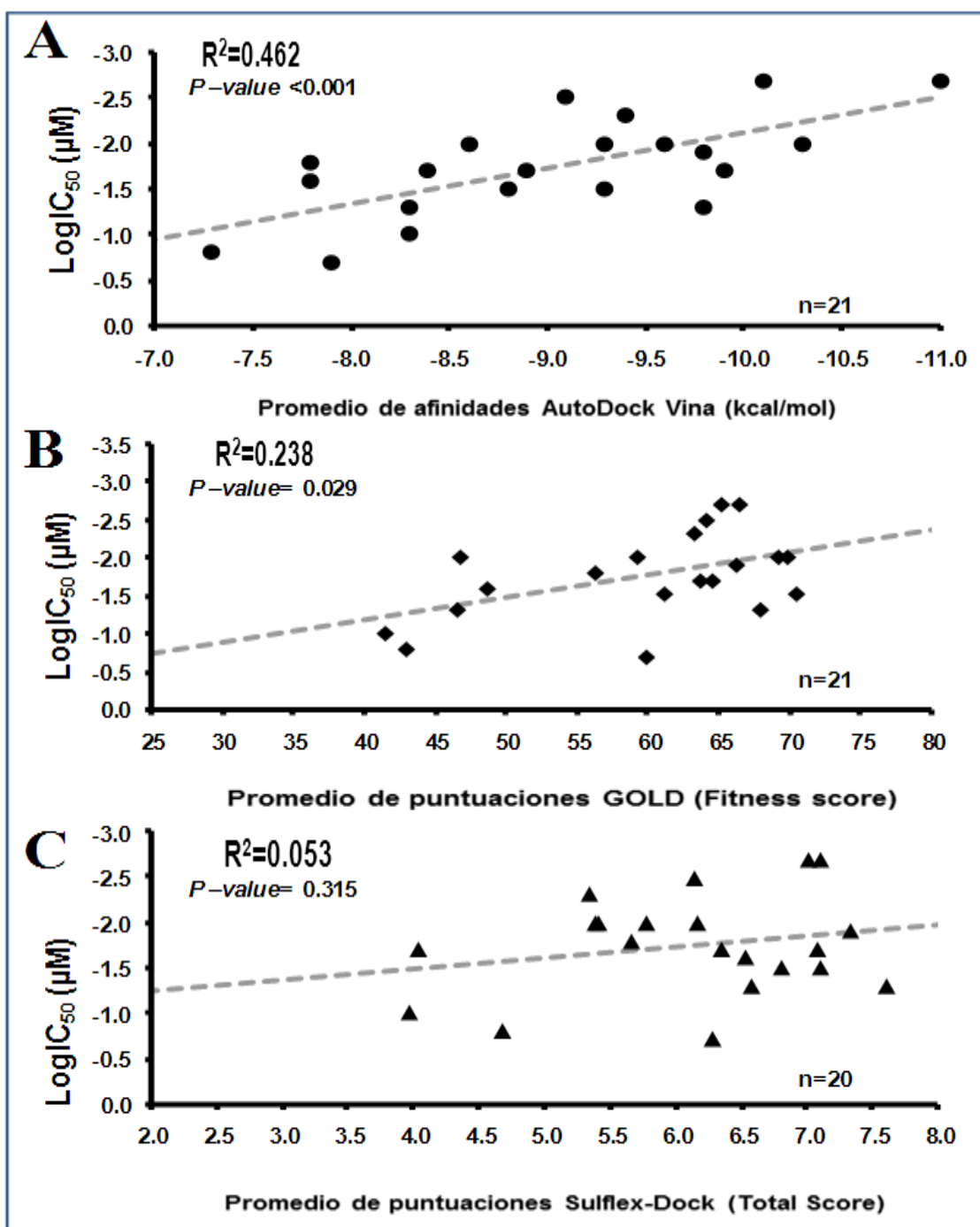
**6.1.4. Relación entre la actividad biológica de los inhibidores de COX-2 y los datos del acoplamiento proteína-ligando.** Con el fin de determinar si los valores calculados de afinidad AutoDock Vina, así como las puntuaciones calculadas por GOLD y Surflex-Dock, podrían ser utilizados como una indicación de la posibilidad de que un compuesto químico pueda comportarse como un inhibidor de la COX-2, un grupo de 21 compuestos con actividad de inhibitoria confirmada experimentalmente, los cuales son encontrados en la base de datos BioAssay PubChem, fueron acoplados a las estructuras de COX-2 (PDB: 1CX2, 1PXX y 1CVU). El nombre (o la identificación del compuesto químico de PubChem, CID), la actividad biológica correspondiente sobre COX-2 (CI<sub>50</sub>), los valores de afinidad calculados con AutoDock Vina, y las puntuaciones GOLD y Surflex-Dock (Sybyl) para cada uno de estos compuestos, y el logaritmo de la actividad biológica

(LogCl<sub>50</sub>) son mostrados en la Tabla 3. Las relaciones entre la actividad biológica y los datos de acoplamiento para cada uno de los programas utilizados para el acoplamiento son presentados en la Figura 8. Los resultados sugieren que para todas las herramientas de acoplamiento molecular empleadas, la actividad de la COX-2 sigue una relación lineal sólo con los valores de afinidad de unión calculados para los inhibidores (AutoDock Vina) y las puntuaciones de acoplamiento de GOLD, siendo mucho más significativa para el primero. Aunque la magnitud de la correlación fue moderada ( $R^2 = 0,462$ ,  $P < 0,001$ ), este valor es similar a los valores de correlación obtenidos para estudios de acoplamiento con fines similares (Hare et al., 2010).

Por otra parte, los datos mostraron que los ligandos con valores absolutos de afinidad superiores a 10 kcal/mol tienen una mejor oportunidad de interactuar directamente con COX-2. Por ejemplo, celecoxib, SC558, y 2,3-sulfonamida diarilfenil tienen valores absolutos de afinidad mayores que 10 kcal/mol y valores de Cl<sub>50</sub> en el orden sub-micromolar. Sin embargo, las moléculas con valores absolutos de afinidad alrededor de 9 kcal/mol también tienen una buena probabilidad de actuar como inhibidores COX-2.

**Tabla 3.** Afinidades calculadas (AutoDock Vina, AV), valores de las puntuaciones de enlace (GOLD, G, y Surflex Dock, S) y los promedios de las concentraciones inhibitorias (CI50) para compuestos reportados como inhibidores de COX-2

Estructura de COX-2	Código PDB:1CX2			Código PDB:1PXX			Código PDB:1CVU			Valores AV promedios	Valores G promedios	Valores S promedios	CI <sub>50</sub> [μM]	LogCI <sub>50</sub> [μM]
	AV Afinidad (kcal/mol)	G Fitness	S Total Score	AV Afinidad(kc al/mol)	G Fitness	S Total Score	AV Afinidad (kcal/mol)	G Fitness	S Total Score					
Valdecoxib (AID: <b>162347</b> )	-9.5±0.0	65.86±0.02	4.80±0.00	-8.5±0.0	61.78±0.02	4.62±0.00	-10.0±0.0	62.32±0.02	6.60±0.00	-9.4±0.1	63.32±0.34	5.34±0.00	0.005	-2.3
Celecoxib (AID: <b>270014</b> )	-10.8±0.0	68.42±0.02	6.63±0.00	-9.7±0.0	65.53±0.06	8.14±0.00	-9.8±0.1	65.42±0.08	6.52±0.00	-10.1±0.1	66.46±0.26	7.10±0.00	0.0022	-2.7
Meloxicam (AID: <b>162326</b> )	-7.4±0.1	35.65±0.62	5.96±0.00	-7.0±0.0	38.51±0.15	3.90±0.00	-7.6±0.0	54.82±0.03	4.14±0.00	-7.3±0.1	42.99±1.58	4.67±0.00	0.16	-0.8
Piroxicam (AID: <b>162326</b> )	-8.3±0.0	39.06±0.04	3.54±0.00	-8.0±0.0	35.07±0.24	3.80±0.00	-8.5±0.0	50.56±0.16	4.55±0.00	-8.3±0.0	41.56±1.22	3.96±0.00	0.1	-1.0
Diclofenaco (AID: <b>313125</b> )	-8.0±0.0	-122.97±0.07	4.42±0.00	-8.6±0.0	-119.24±0.24	5.46±0.00	-8.8±0.0	-117.28±0.11	2.24±0.00	-8.4±0.1	-119.90±0.11	4.04±0.00	0.02	-1.7
Flosulida (AID: <b>162338</b> )	-8.5±0.0	67.40±0.08	7.35±0.00	-8.8±0.0	63.56±0.14	6.47±0.00	-9.4±0.0	62.38±0.10	7.43±0.00	-8.9±0.1	64.45±0.40	7.08±0.00	0.021	-1.7
Tenidap (AID: <b>160880</b> )	-8.4±0.1	56.04±0.15	6.47±0.00	-8.3±0.0	61.57±0.08	4.20±0.00	-9.1±0.0	59.80±0.10	5.56±0.00	-8.6±0.1	59.14±0.43	5.41±0.00	0.01	-2.0
Nimesulida (AID: <b>162655</b> )	-7.6±0.0	57.79±0.10	6.77±0.00	-7.6±0.0	56.15±0.13	5.28±0.00	-8.2±0.0	55.11±0.24	4.92±0.00	-7.8±0.1	56.35±0.22	5.66±0.00	0.015	-1.8
Etodolaco (AID: <b>52141</b> )	-7.2±0.1	49.14±0.23	7.09±0.00	-7.9±0.0	45.72±0.13	6.05±0.00	-8.3±0.0	51.35±0.08	6.24±0.00	-7.8±0.1	48.74±0.44	6.53±0.00	0.025	-1.6
Rofecoxib (AID: <b>241308</b> )	-9.8±0.0	63.49±0.04	6.60±0.00	-8.8±0.0	60.60±0.03	7.47±0.00	-9.8±0.0	59.57±0.19	6.37±0.00	-9.3±0.1	61.20±0.31	6.81±0.00	0.032	-1.5
Dup 697 (AID: <b>162346</b> )	-9.9±0.2	73.47±0.04	6.18±0.00	-9.5±0.0	69.63±0.09	5.88±0.00	-9.4±0.0	66.28±0.15	5.27±0.00	-9.6±0.1	69.80±0.55	5.78±0.00	0.01	-2.0
L-745337 (AID: <b>162346</b> )	-9.3±0.0	62.69±0.18	6.92±0.00	-10.9±0.0	63.73±0.03	6.19±0.00	-9.6±0.0	64.33±0.08	5.90±0.00	-9.9±0.1	63.58±0.14	6.34±0.00	0.02	-1.7
SC558 <b>Filizola, 1997</b>	-10.7±0.2	51.75±0.25	6.03±0.00	-10.0±0.1	45.21±0.36	5.59±0.00	-10.1±0.2	43.44±0.26	4.55±0.00	-10.3±0.1	46.80±0.68	5.39±0.00	0.0093	-2.0
NS 398 (AID: <b>46852</b> )	-7.6±0.0	60.55±0.07	6.23±0.00	-7.7±0.0	57.99±0.05	5.18±0.00	-8.5±0.0	59.26±0.06	7.39±0.00	-7.9±0.1	59.93±0.10	6.27±0.00	0.19	-0.7
SC-58125(AID: <b>162346</b> )	-10.2±0.2	69.83±0.10	6.72±0.00	-9.6±0.2	67.76±0.08	6.40±0.00	-9.7±0.0	66.09±0.08	6.58±0.00	-9.8±0.1	67.89±0.29	6.57±0.00	0.05	-1.3
CID: 10459826 (AID: <b>254745</b> )	-7.0±0.1	60.72±0.64	6.28±0.00	-7.3±0.0	27.84±1.31	7.27±0.00	-10.6±0.0	51.30±0.41	9.24±0.00	-8.3±0.3	46.62±2.61	7.60±0.00	0.05	-1.3
CID: 10895294(AID: <b>162484</b> )	-9.4±0.0	73.59±0.03	7.25±0.00	-7.6±0.0	69.78±0.08	7.55±0.00	-9.3±0.0	68.08±0.19	6.49±0.00	-8.8±0.2	70.48±0.43	7.10±0.00	0.034	-1.5
CID: 9885354 (AID: <b>162507</b> )	-10.6±0.0	68.32±0.03	7.49±0.00	-9.4±0.0	65.24±0.06	8.29±0.00	-9.3±0.0	65.07±0.12	6.23±0.00	-9.8±0.1	66.21±0.28	7.32±0.00	0.013	-1.9
2,3-diarilciclobutenona metilsulfona( <b>Dewitt,1999</b> )	-9.4±0.0	66.20±0.03	6.64±0.00	-8.7±0.0	64.91±0.09	5.34±0.00	-9.2±0.0	64.09±0.06	6.45±0.00	-9.1±0.1	64.09±0.17	6.14±0.00	0.003	-2.5
2,3-diarilfenil sulfonamida( <b>Dewitt, 1999</b> )	-11.0±0.0	66.32±0.05	6.80±0.00	-10.7±0.0	65.70±0.03	7.27±0.00	-11.4±0.0	63.38±0.09	6.93±0.00	-11.0±0.1	65.10±0.24	7.00±0.00	0.002	-2.7
2,3-diariltiazolotriazol metilsulfona( <b>Dewitt, 1999</b> )	-8.9±0.0	66.62±0.03	7.23±0.00	-9.3±0.0	72.88±0.05	6.42±0.00	-9.5±0.0	67.86±0.07	4.86±0.00	-9.3±0.0	69.12±0.50	6.17±0.00	0.01	-2.0



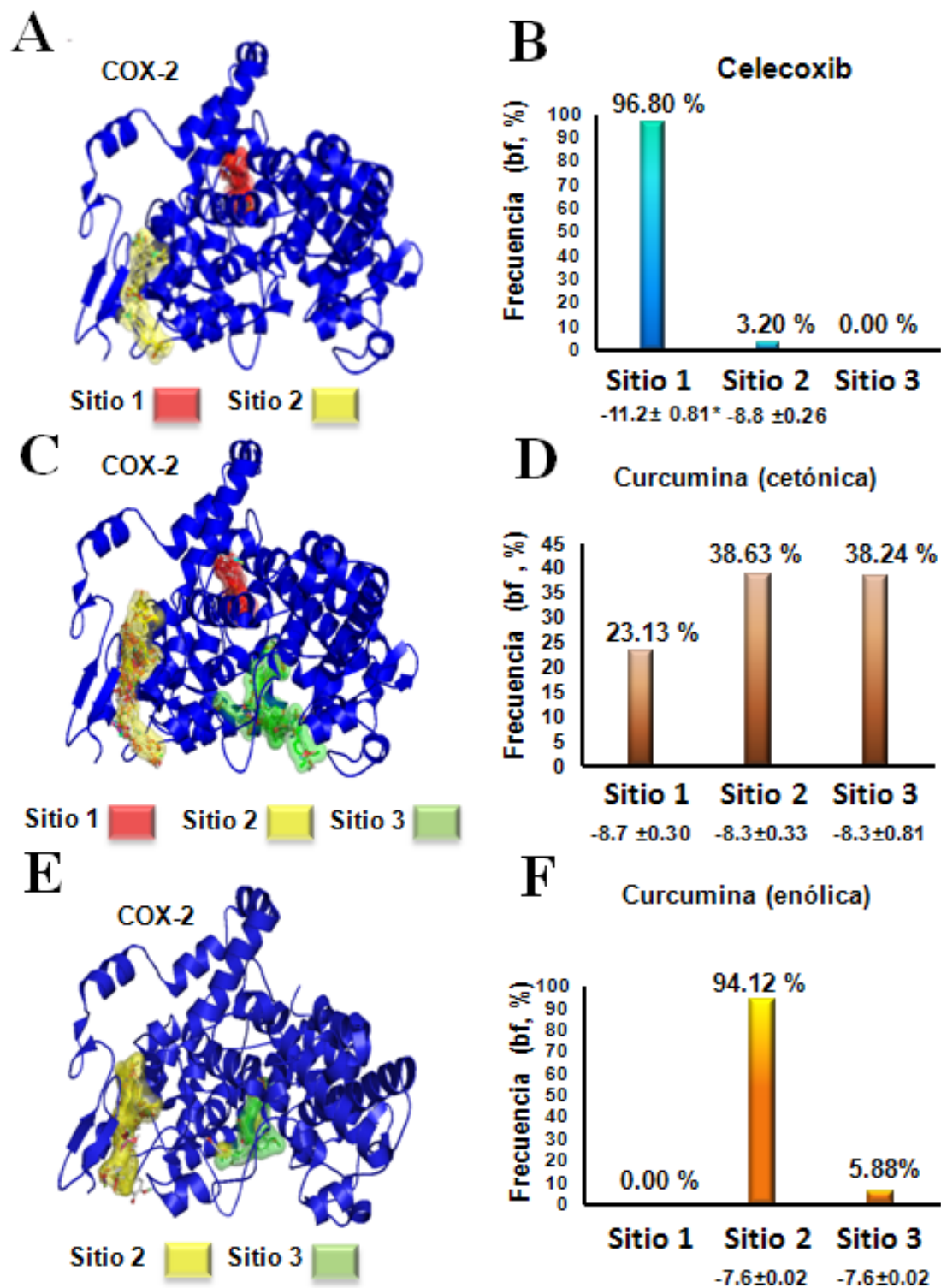
**Figura 9.** Correlación entre los datos calculados de acoplamiento para los inhibidores de la COX-2 (PDB: 1CX2, 1PXX y 1CVU) y la media de la concentración máxima inhibitoria (LogIC<sub>50</sub>). (A) AutoDock Vina, (b) GOLD y (C) Surflex- Dock. La línea de regresión es mostrada para fines ilustrativos. La puntuación de GOLD para el diclofenaco ( $-119.90 \pm 0.11$ ) no fue incluida en el análisis.

Estas suposiciones son respaldadas con los datos de actividad biológica reportados para algunos de los compuestos derivados de alimentos evaluados como inhibidores de la COX-2, los cuales presentan los mejores valores de afinidad con AutoDock Vina. La media de la concentración máxima inhibitoria ( $CI_{50}$ ) evaluada en diferentes líneas celulares para curcumina (rango de 2  $\mu\text{M}$  a 15  $\mu\text{M}$ ) (Gonzales y Orlando, 2008, Lev-Ari et al., 2006a, Du et al., 2006, Lev-Ari et al., 2006b, Gafner et al., 2004, Hong et al., 2004), el ácido all *trans*-retinoico (20.5  $\mu\text{M}$ ) (Kim et al., 2004), genisteína (rango: <15  $\mu\text{M}$  a 200  $\mu\text{M}$ ) (Liang et al., 1999, Dia et al., 2008, Ye et al., 2004), apigenina (rango: 8.04  $\mu\text{M}$  a 50  $\mu\text{M}$ ) (Liang et al., 2001, Liang et al., 1999), cianidina (rango: 40  $\mu\text{M}$  a 90  $\mu\text{M}$ ) (Wang et al., 1999, Seeram et al., 2003), kaempferol (rango: <15  $\mu\text{M}$  y 50  $\mu\text{M}$ ) (Liang et al., 2001, Liang et al., 1999), ácido docosahexaenoico (rango: 9.8  $\mu\text{M}$  a 30  $\mu\text{M}$ ) (Calviello et al., 2004, Ringbom et al., 2001), naringenina (7.9 $\pm$ 1.9  $\mu\text{M}$ ) (Takano-Ishikawa et al., 2006), [6]-Shogaol, (2.1  $\mu\text{M}$ ) (Tjendraputra et al., 2001), resveratrol (rango: 3.06  $\mu\text{M}$ ) (Cao et al., 2011), y ácido eicosapentaenoico (7.1  $\mu\text{M}$ ) (Ringbom et al., 2001), apoyan la evidencia de que estos compuestos pueden modular la actividad de la COX-2 no sólo por la vía del ARNm, sino también a nivel de la interacción directa con la proteína.

**6.1.5. Acoplamiento de curcumina y celecoxib sobre la COX-2.** La literatura reporta que algunos de los productos químicos aquí estudiados son capaces de modularla actividad de la COX-2 no sólo por inhibición competitiva, sino también sinérgicamente (Cheung et al., 2009). Así mismo, ha sido demostrado que la curcumina produce un efecto sinérgico con celecoxib, un inhibidor altamente selectivo de la COX-2, que elimina casi toda la actividad dela enzima (Lev-Ari et al., 2006c; Lev-Ari et al., 2005). Con el fin de determinar si este proceso adicionales producido debido a que la curcumina (tanto en las formas cetónica y enólica) se acopla en un sitio diferente de la utilizada por el celecoxib, una serie de 500 corridas AutoDock Vina acoplamiento fueron realizadas en la proteína extraída del complejo COX-2-celecoxib (PDB: 3LN1), y los resultados son presentados en la Figura 10, donde es observado que celecoxib se acopla en dos sitios diferentes de COX-2 (Figura 10A). Como era de esperar, el acoplamiento más favorable fue en el sitio activo de la COX-2 (frecuencia de unión, fu, del 96.8%) (Figura 10B), tal y como está contenido en

la estructura cristalina del complejo COX-2-celecoxib(PDB: 3LN1). Un sitio adicional (fu, 3.2%) fue detectado por las simulaciones de acoplamiento, pero es menos energéticamente favorable (-8.8 kcal/mol vs -11.2 kcal/mol). Por otro lado, además del sitio activo (sitio del celecoxib), la curcumina en la forma cetónica prefiere otros dos (alostérico) sitios sobre la COX-2 (Figura 10C) con frecuencias de unión de 38.6% y 38.2% (Figura 10D). Una tendencia diferente es observada para la forma enólica de la curcumina. Ya que esta forma no se acopla en el sitio activo, cuando el acoplamiento es realizado sobre toda la superficie de acoplamiento de la proteína (3LN1) como es mostrado en la Figura 10E, acoplándose principalmente en el sitio 2(fu, de 94.12%), y en un menor grado en el sitio 3 (fu, de 5.88%) (Figura 10F), sin embargo, teniendo en cuenta los valores de afinidad calculados con AutoDock Vina estas interacciones son menos favorables que las detectadas para forma cetónica.

Es importante tener presente que los resultados de acoplamiento para las formas cetónica y enólica de la curcumina sobre la superficie de la proteína completa (3LN1) son diferentes a los obtenidos para la forma enólica se acopla directamente en el sitio activo de 1CX2, 1PXX y 1CVU. En estos últimos casos, las afinidades de unión absoluta fue mayor en aproximadamente 1.2 kcal/mol. El acoplamiento de la forma cetónica de la curcumina en el sitio activo de la COX-2 genera no sólo los valores de afinidad diferentes dependiendo del lugar, sino también distintas orientaciones espaciales. Estos últimos cambios podrían requerir mayor consumo de energía de unión, lo que probablemente sería la razón del por qué esta forma de la curcumina prefiere los sitios de unión donde su ubicación implica un consumo de energía molecular interna menor.



**Figura 10.** Sitios de unión de celecoxib(A) y curcumina (cetónica, C; enólica E) sobre la COX-2, y las preferencias del ligando por cada uno de ellos (B, D y F, respectivamente). \*Los valores de afinidad (media  $\pm$  DS, n= 500) en kcal/mol obtenidos para cada complejo proteína-ligando son mostrados debajo del sitio.

Las corridas de acoplamiento molecular (n=100) ejecutadas para celecoxib y las dos formas de la curcumina, mediante la utilización de las tres herramientas de acoplamiento examinadas en este trabajo, en los tres sitios de unión previstos para la curcumina sobre la superficie de COX-2 (forma cetónica) utilizando AutoDock Vina son presentados en la Tabla 4. Los resultados mostraron que AutoDock Vina, GOLD y Surflex Dock predijeron que el celecoxib sólo prefiere el sitio conocido de unión inhibitoria (Sitio 1). En el caso de la curcumina, las tres herramientas de acoplamiento sugieren que ambas formas (cetónica y enólica) de este producto natural pueden en algún momento interactuar con cualquiera de los tres sitios de unión sugeridos. Sin embargo, hay pequeños cambios en las preferencias basadas en la forma de la curcumina y la herramienta de acoplamiento molecular utilizada. En conjunto, estos resultados sugieren que independiente del estado tautomérico de la curcumina, tiene la capacidad de interactuar con la COX-2 en un sitio de unión diferente de celecoxib.

**Tabla 4.** Afinidad (AutoDock Vina) y los valores de puntuación (GOLD y Surflex Dock) para la curcumina (formas cetónica y enólica) y celecoxib (inhibidor), en diferentes sitios de unión predichos (1, 2 y 3) sobre la COX-2.

Compuesto	Sitio 1			Sitio 2			Sitio 3		
	AV (kcal/mol)	G Fitness	S Total Score	AV (kcal/mol)	G Fitness	S Total Score	AV (kcal/mol)	G Fitness	S Total Score
Celecoxib	-11.9±0.1	68.54±0.02	9.50±0.00	-9.0±0.0	61.04±0.13	6.05±0.00	-7.2±0.0	60.87±0.14	4.53±0.00
Curcumina <sup>a</sup>	-8.4±0.0	56.51±0.26	6.71±0.00	-8.8±0.0	52.58±0.12	7.24±0.00	-8.0±0.0	52.64±0.14	8.75±0.00
Curcumina <sup>b</sup>	-8.6±0.2	48.39±0.29	7.40±0.00	-8.7±0.0	51.97±0.12	9.58±0.00	-8.3±0.0	51.52±0.12	7.40±0.00

AV. AutoDock Vina; G. GOLD; S. Surflex-Dock (SYBYL); <sup>a</sup> Forma cetónica ; <sup>b</sup> Forma enólica

La evaluación *in silico* del acoplamiento de la curcumina sobre la COX-2 ofrece una explicación plausible para el efecto sinérgico observado para el celecoxib y la curcumina en la inhibición de la enzima COX-2. También mostró que el tamaño de la red de conexión utilizado puede tener algunas diferencias en cuanto a los resultados de afinidad. Sin embargo, es claro que para ambas formas cetónica y enólica de la curcumina, un sitio de unión diferente al sitio



activo es preferido por este compuesto natural, sin embargo este proceso es menos energéticamente favorable según el valor de afinidad calculado para estos sitios adicionales.

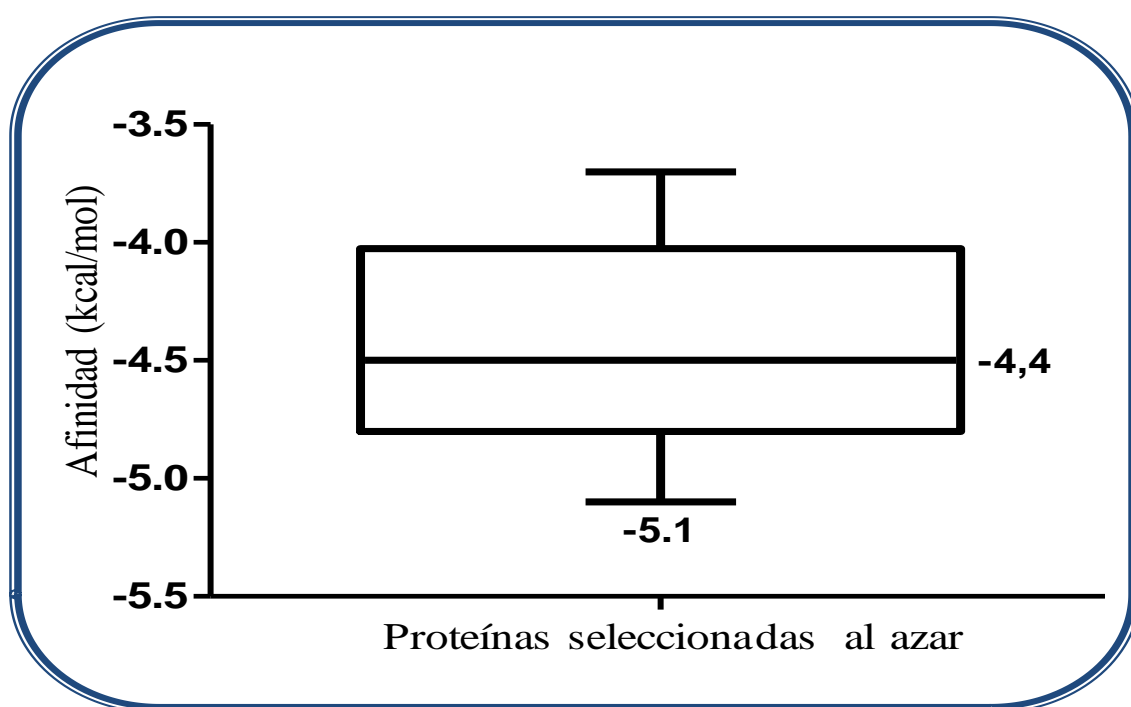
Aunque los mecanismos implicados en la acción anti-inflamatoria de los productos químicos presentes en las plantas comestibles pueden contemplar distintas vías, algunos de los compuestos examinados aquí son conocidos por sus acciones en la regulación de los factores de transcripción como el factor nuclear-kappa B(NF $\kappa$ β) (Kole et al., 2011; Surh et al., 2001), transductores de señales y activación de la transcripción-1 (STAT-1) (Chung et al., 2011), el receptor activado por proliferadores de peroxisoma gamma (PPAR $\gamma$ ) (Wang et al., 2010), el factor-2 relacionado con NF-E2(Nrf2) (Garg et al., 2008),y también en la inhibición de la proteína quinasa activada por mitógenos (MAPK) (ERK, JNK y p38) fosforilación(Ahn et al., 2010), entre muchos otros blancos proteicos. Estos mecanismos pueden alterar la expresión de COX-2. Sin embargo, como es presentado en este trabajo, puede ser igualmente importante tener en cuenta su acción directa a nivel de proteínas, con el fin de tener un mejor conocimiento de sus beneficios farmacológicos. Además, está claro que la química computacional es una poderosa herramienta que agiliza y reduce el costo de los enfoques principales para encontrar agentes terapéuticos que promuevan la salud humana.

## **6.2. BÚSQUEDA DE BLANCOS POTENCIALES PARA EL ÁCIDO ALFA LIPOICO**

Una vez desarrollada la metodología propuesta para la búsqueda de blancos potenciales para el ácido alfa lipoico (ALA) fueron obtenidos los resultados descritos a continuación.

**6.2.1. Identificación de blancos farmacológicos por TarFisDock y validación del acoplamiento molecular.** El servidor TarFisDock fue utilizado para encontrarlas proteínas blanco para el ALA, y el programa AutoDock Vina permitió el cálculo de las puntuaciones de afinidad para los complejos proteína-ALA. Teniendo como base los datos de afinidad obtenidos por AutoDock Vina

para cada una de las proteínas seleccionadas aleatoriamente de la base de datos PDB, la unión no específica del R-ALA a estas proteínas es producida en valores absolutos de afinidad inferiores a 5.1 kcal/mol (Figura 11). En consecuencia, a partir de los 25 mejores blancos sugeridos por el servidor TarFisDock como blancos farmacológicos para el R-ALA, las afinidades para aquellas con valores mayores que el máximo (5.1 kcal/mol), además de su 10% (0.5 Kcal/mol para hacer un rango más específico), que es de 5.6 kcal/mol, así como los datos obtenidos para las formas S-ALA y DHLA en las mismas proteínas, son mostrados en la Tabla 5.



**Figura 11.** Diagrama de cajas y bigotes, para los datos de afinidades de unión obtenidos para el R-ALA con veinte proteínas seleccionadas al azar de la base de datos PDB.

El cribado virtual de los blancos moleculares para el ALA mostró que, al menos hipotéticamente, este antioxidante puede interactuar con diferentes enzimas como hidrolasas, isomerasas, ATPasas, oxidasas y topoisomerasas de ADN, entre otras. Además, R-ALA tiene valores de afinidad muy similares a los obtenidos para la forma S-ALA para las proteínas blanco, Sin embargo cuando el ciclo disulfuro se ha roto, como en el caso de la forma DHLA, las puntuaciones de afinidad disminuyen significativamente (Tabla 5). En

consecuencia, es plausible pensar que sólo la forma oxidada de la R-ALA es más propensa a actuar como un agente farmacológico de varias proteínas blanco.

**Tabla 5.** Proteínas predichas por TarFisDock para interactuar con las formas del ALA (R-ALA, S-ALA y DHLA).

Proteína	Código PDB (fuente)	Ácido alfa lipoico					
		R-ALA		S-ALA		DHLA	
		ES (TFDk)	Afinidad (kcal/mol) <sup>a</sup>	ES TFDk	Afinidad(k cal/mol)	ES TFDk	Afinidad (kcal/mol)
D-Xilosa Isomerasa	1DID ( <i>Arthrobacter sp</i> )	-30.14	-5.4	-27.78	-5.4	-29.89	-4.7
Aldehído oxidorreductasa	1VLB ( <i>Desulfovibrio gigas</i> )	-29.40	-6.2	-28.06	-6.2	-28.43	-5.5
Cadena alfa Triptófano Sintasa	1K3U ( <i>Salm. typhimurium</i> )	-27.68	-6.2	—	—	-28.61	-5.4
<b>Epóxido hidrolasa</b>	<b>1CQZ</b> ( <i>Mus musculus</i> )	-27.03	<b>-6.1</b>	-25.25	-6.1	—	—
<b>Leucotrieno A4 hidrolasa</b>	<b>1HS6</b> ( <i>Homo sapiens</i> )	-26.86	<b>-6.6</b>	-26.28	-6.7	-27.13	-5.8
DNA Topoisomerasa II	1PVG ( <i>Sacch. cerevisiae</i> )	-26.44	-5.7	—	—	—	—
Fragmento Fab del anticuerpo monoclonal Db3	1DBM ( <i>Mus musculus</i> )	-25.96	-6.1	-26.56	-5.9	-26.37	-5.3
<b>Canal de potasio dependiente de voltaje</b>	<b>1ZSX</b> ( <i>Homo sapiens</i> )	-25.66	<b>-6.5</b>	—	—	—	—

Beta-Glucosidasa	1E1F ( <i>Zea mays</i> )	-25.55	-6.0	-25.21	-6.2	-26.47	-5.4
<b>Alfa hidroxisteroide deshidrogenasa</b>	<b>1Q5M</b> ( <i>Oryct. cuniculus</i> )	-25.31	<b>-6.2</b>	—	—	-25.96	-5.6
Fragmento Fab del anticuerpo monoclonal Db3	1DBJ ( <i>Mus musculus</i> )	-25.23	-5.6	—	—	—	—
Beta-Glucosidasa	1E55 ( <i>Zea mays</i> )	-25.17	-6.0	-26.12	-6.0	-26.68	-5.3
Poliamina oxidasa	1H82 ( <i>Zea mays</i> )	-25.14	-6.0	-27.08	-6.2	-27.09	-5.5
Bovino F1-ATPasa Mitocondrial	1EFR ( <i>Bos Taurus</i> )	-25.04	-5.7	—	—	—	—

<sup>a</sup>Valor promedio (n = 10); en todos los casos, el error estándar de la media fue menor que 0.09 kcal/mol; ES: puntuación de energía (energy score); TFDk: TarFisDock; —: TFDk no propuso esta proteína como blanco para el ligando.

Algunas de las proteínas predichas para unirse con R-ALA son encontradas en mamíferos (*Mus musculus*, *Homo sapiens*, *Oryctolagus cuniculus* and *Bos Taurus*), y estas representan importantes blancos farmacológicos como la leucotrieno A4 hidrolasa (LTA4 hidrolasa), el canal de potasio dependiente de voltaje-cerrado, la alfa hidroxisteroide deshidrogenasa, y la epóxido hidrolasa.

La mayor afinidad de unión del R-ALA fue obtenida para la enzima leucotrieno A4 hidrolasa (-6.6 kcal/mol) y para el canal de potasio dependiente de voltaje-cerrado (-6.5 kcal/mol). LTA4 hidrolasa actúa específicamente sobre los enlaces de éter, y es codificada por el gen humano LTA4H (Mancini y Evans, 2011, Jiang et al., 2010). Esta es una enzima bifuncional enlazada a un átomo de zinc (EC:3.3.2.6) que convierte a los leucotrienos A4 a leucotrieno B4, el cual es un mediador proinflamatorio que tiene la capacidad de reclutar y activar las células inflamatorias, causando daños en los tejidos enfermedades (Haeggstrom, 2000). Además, el leucotrieno es un potente quimio-atrayente de

algunos lípidos implicados en procesos de inflamación, respuesta inmune, sistemas de defensa contra las infecciones, y choque inducido del factor de activación plaquetaria (Sharma y Mohammed, 2010; Thunnissen et al., 2001), psoriasis, fibrosis quística, asma, y artritis reumatoide, entre otros (Tager y Luster, 2003). LTA4 hidrolasa también tiene actividad aminopeptidasa (Rudberg, 2004), y ha sido relacionada con el cáncer del esófago, donde su sobre expresión parece ser un evento temprano en este proceso, por lo tanto puede ser un blanco farmacológico potencial para la quimio prevención de esta enfermedad (Chen et al., 2003; Chen et al., 2004). Por otra parte, algunos autores han relacionado la presencia de esta enzima para el componente inflamatorio de las enfermedades cardiovasculares (Funk, 2005).

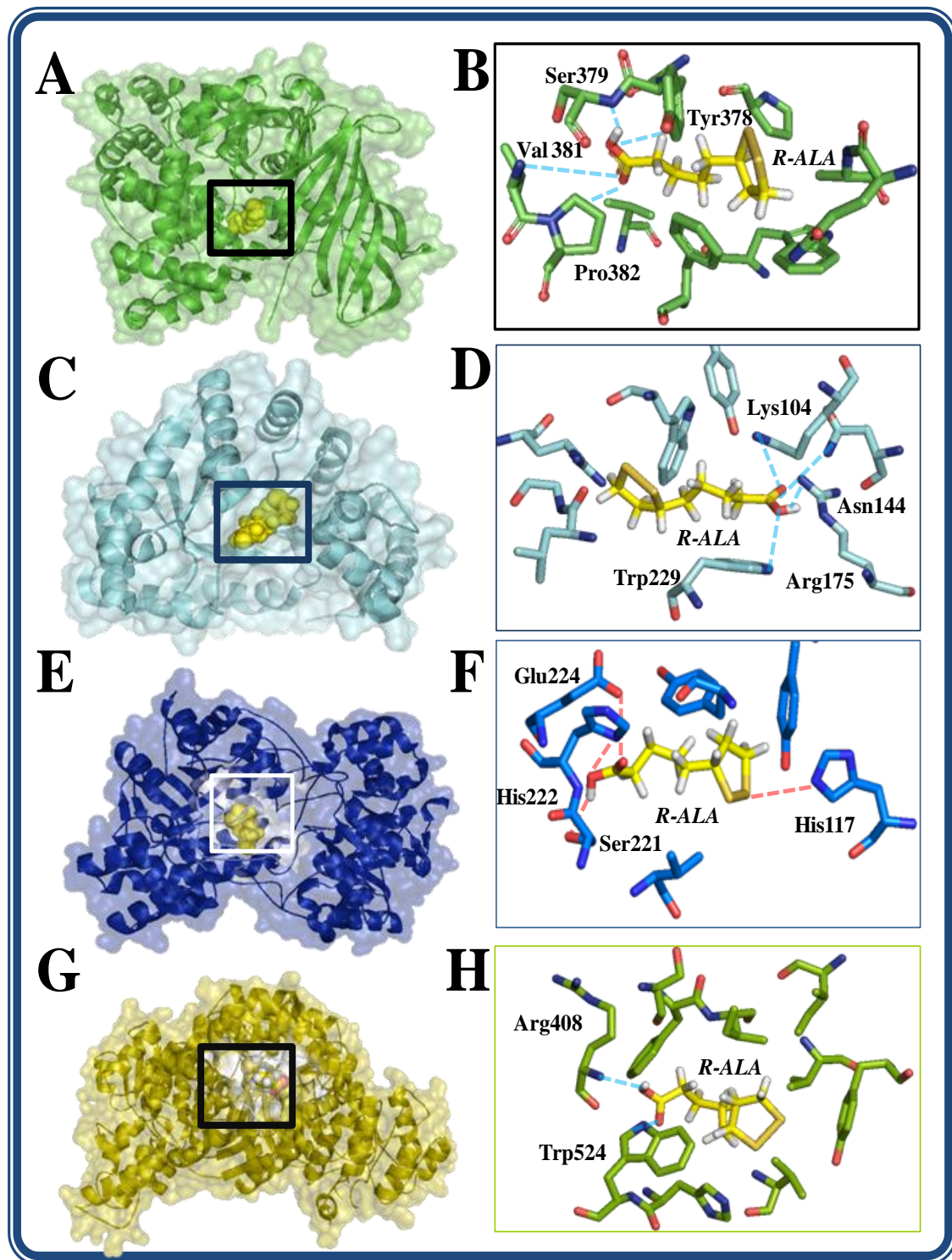
Los canales de potasio dependientes de voltaje (canales Kv) regulan procesos celulares, tales como la secreción de hormonas y la repolarización de las células excitables. En células pancreáticas beta, la prolongación del potencial de acción mediante el bloqueo del rectificador retrasado de los canales de potasio debería producir un aumento del calcio intracelular libre, promover la liberación de insulina de una manera dependiente de glucosa, por lo que esta proteína es un potencial blanco para el tratamiento de diabetes tipo 2 (Yan, 2004). Además, alteraciones en el funcionamiento de esta proteína transmembrana puede causar enfermedades del corazón, como es el caso de las arritmias cardíacas (Schmalhofer et al., 2010, Wulff et al., 2009; Wickman et al., 1999). Algunos autores han sugerido que la inhibición de los canales de potasio puede ejercer una función anti proliferativa en enfermedades tales como el cáncer de colon, de mama y de próstata (Teisseyre et al., 2009), así como efectos benéficos en el tratamiento del Parkinson y la enfermedad de Alzheimer (Bednarczyk, 2009).

Alfa hidroxisteroide deshidrogenasa juega un papel importante en la regulación hormonal, ya que ejerce su actividad tanto en los andrógenos (esteroides C19) y progesterona (C21 esteroides) en conejos y ratas (Chiamvimonvat et al., 2007, Couture et al., 2004). Su equivalente en los seres humanos es AKR1C1, y pertenece a la familia de enzimas hidroxisteroide deshidrogenasa (HSDS), y juega un papel importante en el metabolismo de la

progesterona que es esencial para el mantenimiento del embarazo por lo cual esta enzima ha sido relacionada con nacimiento prematuro y otras enfermedades como la cáncer (Piekorz et al., 2005).

La Epóxido hidrolasa es una enzima encargada de la desintoxicación de agentes mutagénicos y carcinogénicos por la hidrólisis de sustratos epóxido (Yang et al., 2009; Argiriadi et al., 1999). En los humanos, la deficiencia de esta enzima puede estar asociada con enfermedades como la diabetes (Oguro et al., 2009), sin embargo tiene un importante papel en el metabolismo de los principales mediadores de la inflamación, como el ácido epoxieicosatrienoico (Imig y Hammock, 2009). Además ha sido relacionada con hipertensión (Chiamvimonvat et al., 2007). Inhibidores de epóxido hidrolasa soluble han sido considerados como potenciales agentes farmacológicos debido a su capacidad para mejorar la función vascular y para reducir el daño renal producido por hipertensión relacionada con angiotensina (Imig et al., 2009).

**6.2.2. Interacción entre los residuos en el sitio activo de las proteínas predichas por TarFisDock con el ALA.** Los sitios de unión al ligando de las proteínas presentes en mamíferos antes mencionados, así como las interacciones entre sus residuos y R-ALA en el complejo de acoplamiento, fueron identificados por LigandScout 3.0, como es mostrado en la Figura 12. El sitio de unión a proteínas-ALA, para leucotrieno A4 hidrolasa está determinada por Tyr378, Ser379, Val381, y Pro382. Para el canal de potasio dependiente de voltaje, estos aminoácidos fueron Lys104, Asn144, Arg175 y Trp229, mientras que para alfa hidroxisteroide deshidrogenasa fueron Glu224, His222, Ser221, y His117. A diferencia de las anteriores interacciones proteína-ligando, este último se produce con uno de los átomos de azufre presentes en el R-ALA. Por último, la enzima epóxido hidrolasa muestra un menor número de aminoácidos que interactúan en el sitio de unión con R-ALA, Arg408 y Trp524.



**Figure 12.** Complejos proteínas-ligando mostrando los sitios de unión con R-ALA (izquierda), y los principales residuos participantes en la interacción proteína-ligando (derecha), de R-ALA con leucotrieno A4 hidrolasa (A,B), canal de potasio dependiente de voltaje (C,D), alfa hidroxiesteroide deshidrogenasa (E,F) y epóxido hidrolasa (G,H), respectivamente.

**6.2.3. Acoplamiento de inhibidores conocidos de los blancos moleculares seleccionados.** Proteínas sugeridas por TarFisDock como blancos moleculares del R-ALA son mediadores bioquímicos claves en varias vías de señalización conocidas, por lo que varios inhibidores han sido identificados. Los valores de afinidad calculados con AutoDock Vina y los datos de actividad biológica para algunos de estos compuestos son presentados en la Tabla 6, y sus superposiciones estructurales con el R-ALA son presentadas en la Figura 13, donde son observadas algunas similitudes con estas moléculas.

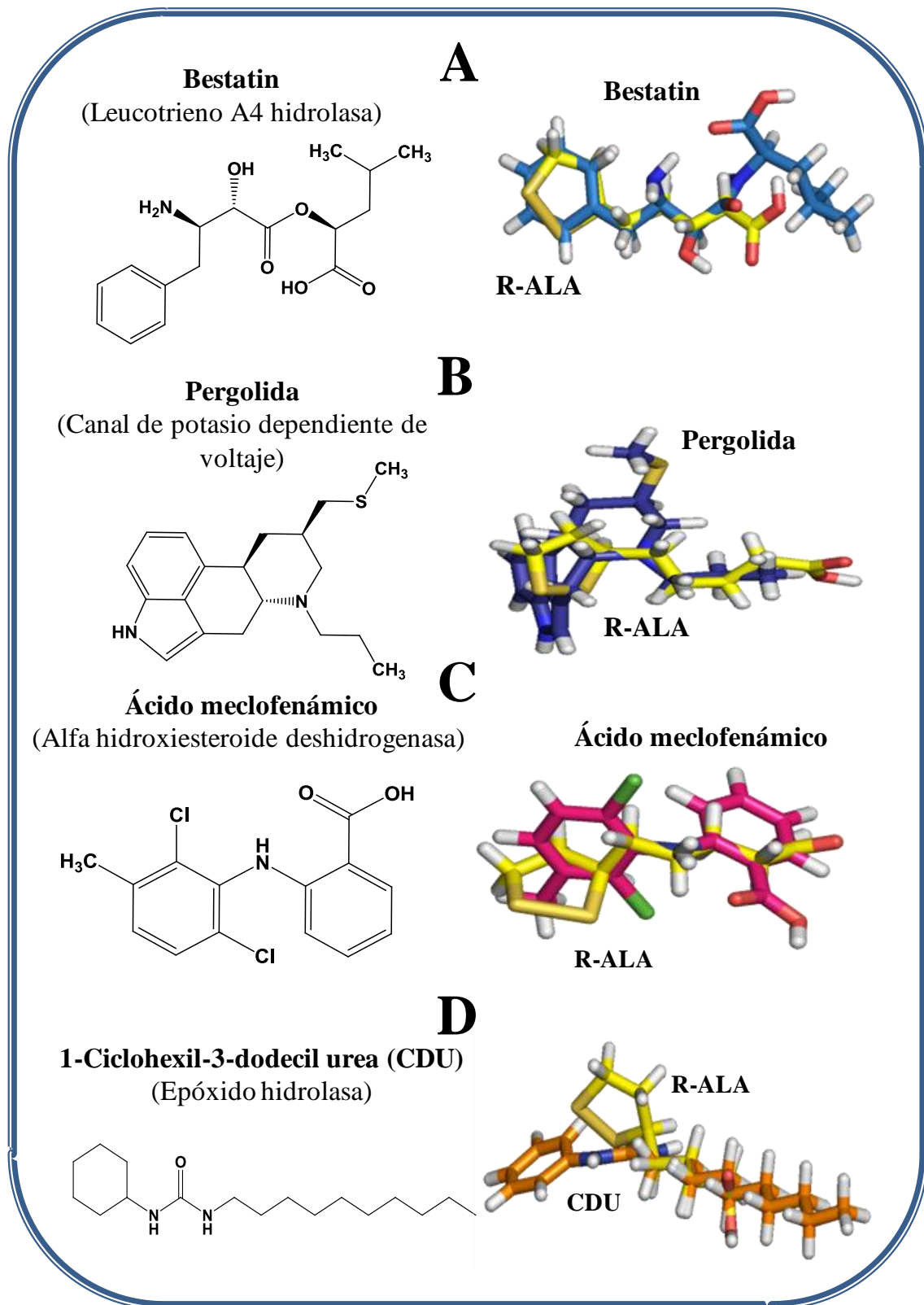
Con excepción del pergolida inhibidor de la 1ZSX, los valores de afinidad obtenidos para estos inhibidores fueron superiores a aquellos obtenidos para el R-ALA. Es conocido que Bestatin, Ácido meclofenámico, y 1-ciclohexil-3-dodecilurea actúan como inhibidores de manera competitiva para las enzimas leucotrieno A4 Hidrolasa, alfa hidroxisteroide deshidrogenasa, y la epóxido hidrolasa, respectivamente, mientras que pergolide trabaja por bloqueo alostérico de los canales de potasio dependientes de voltaje (Thunnissen et al., 2002; Hurst et al., 2003; Haiching y Penning, 1999; Argiriadi, 2000; Hong et al., 2005). En todos los casos son encontrados en el mismo sitio predicho por TarFisDock para R-ALA en cada proteína.

**Tabla 6.** Afinidades calculadas con AutoDock Vina para inhibidores conocidos de proteínas blanco para el R-ALA.

<b>Código PDB</b>	<b>Inhibidor</b>	<b>Afinidad(kcal/mol)<sup>a</sup></b>	<b>Actividad biológica</b>	<b>Referencia</b>
1HS6	Bestatin	-8.5±0.2	CI <sub>50</sub> =4 µM	Thunnissen <i>et al.</i> , 2002
1ZSX	Pergolida	-5.9±0.2	CI <sub>50</sub> =120 nM	Hurst <i>et al.</i> , 2003, Hong <i>et al.</i> , 2005
1Q5M	Ácido meclofenámico	-8.8±0.0	K <sub>i</sub> =18.9 µM	Haiching <i>et al.</i> , 1999
1CQZ	1-ciclohexil-3-dodecil urea	-8.7±0.0	K <sub>i</sub> = 6.3±0.5 nM	Argiriadi <i>et al.</i> , 2000

<sup>a</sup>Media±error estandar (n=10); CI<sub>50</sub>: media (50%) concentración inhibitoria máxima, y K<sub>i</sub>: constante de inhibición.





**Figura 13.** Estructuras 2D de inhibidores para las proteínas seleccionadas (izquierda) y su superposición 3D con R-ALA (derecha).

Finalmente, uno de los hallazgos más interesantes en esta búsqueda de blancos moleculares, fue establecer que la estructura 3D de la R-ALA puede ser efectivamente superpuesta con inhibidores conocidos de las proteínas sugeridas como blancos farmacológicos. A pesar de que los valores absolutos de afinidad calculados con AutoDock Vina para los inhibidores de estas proteínas son considerablemente mayores que los obtenidos para R-ALA (con la excepción de pergolida, inhibidor de la 1ZSX). El acoplamiento en el sitio de unión, así como las similitudes estructurales por lo menos algunos fragmentos de los inhibidores, sugiere que el R-ALA puede ser capaz de entrar en el sitio de unión al ligando de estas enzimas, probablemente compitiendo con los ligandos endógenos. Sin embargo, la afinidad de unión obtenida para el R-ALA implica que puede comportarse como un inhibidor débil o actividad agonista se puede esperar. Estas observaciones *in silico* deben ser validadas con datos experimentales, lo cual soportaría los resultados que revelan la acción farmacológica del R-ALA sobre muchas enfermedades.

Aunque los mecanismos por los cuales los compuestos naturales bioactivos ejercen su acción sobre la salud no están del todo conocidos, los métodos computacionales nos ofrecen la posibilidad de tener un acercamiento de la forma cómo estos químicos funcionan a nivel molecular. La potencia computacional en combinación con técnicas de minería de datos está avanzando conjuntamente con las nuevas tecnologías de laboratorio, reduciendo el número de pasos en las primeras etapas del proceso de descubrimiento de nuevos fármacos. Además, varios experimentos virtuales pueden ser repetidos usando las mismas herramientas virtuales con diferentes condiciones, sin las ya conocidas limitaciones de repetir los experimentos en los laboratorios impuestas por el costo de las muestras, la oferta y la disponibilidad.

## 7. CONCLUSIONES

- ❖ Los cálculos *In silico* llevados a cabo con AutoDock Vina, GOLD, y Surflex Dock mostraron que las afinidades de unión obtenidas para algunos de los compuestos naturales sobre COX-2 (curcumina y el ácido all *trans*-retinoico) son de magnitud similar (kcal/mol) a aquellos obtenidos para inhibidores conocidos de esta proteína.
- ❖ Valores de afinidad de unión obtenidos con AutoDock Vina y GOLD, para 31 compuestos inhibidores de COX-2, correlacionaron significativamente con sus valores de actividad biológica (LogCI<sub>50</sub>) reportadas en la literatura, siendo mucho mayor el valor de correlación para AutoDock Vina ( $R^2=0.462$ ,  $P<0.001$ ).
- ❖ El acoplamiento molecular de curcumina y celecoxib sobre la superficie de la COX-2, sugiere que curcumina puede ejercer un efecto inhibitorio, tanto de manera competitiva como alostérica.
- ❖ De acuerdo con el servidor TarFisDock, el ácido alfa lipoico tiene la capacidad de interactuar con proteínas presentes en mamíferos tales como leucotrieno A<sub>4</sub> hidrolasa, canal de potasio dependiente de voltaje, alfa hidroxisteroide deshidrogenasa y epóxido hidrolasa.
- ❖ La estructura del ácido alfa lipoico presenta algunas semejanzas con la de los inhibidores de estas proteínas, indicando que en su unión con las mismas, podría comportarse como un inhibidor débil de las mismas.
- ❖ Algunos compuestos naturales presentes en la dieta son importantes no sólo como reguladores de la transcripción de enzimas relacionadas con diversas enfermedades, sino también como reguladores de su actividad catalítica en los procesos patológicos.

## 8. RECOMENDACIONES

- ❖ Crear modelos experimentales de la interacción de estos compuestos bioactivos naturales con las proteínas evaluadas, para tener un conocimiento exacto de estas interacciones.
- ❖ Desarrollar investigaciones dirigidas a la búsqueda de nuevas moléculas de origen natural con efectos benéficos sobre la salud basadas en métodos computacionales y posterior confirmación *in vitro* e *in vivo*.

## 9. BIBLIOGRAFÍA

1. Abenavoli, L., Capasso, R., Milic, N., Capasso, F. Milk thistle in liver diseases: past, present, future, *Phytother Res.* 24 (2010) 1423-1432.
2. Ahn, J., Lee, H., Kim, S., Ha, T. Curcumin-induced suppression of adipogenic differentiation is accompanied by activation of Wnt/beta-catenin signaling, *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 298 (2010) 1510-1516.
3. Akihisa, T., Yasukawa, K., Yamaura, M., Ukiya, M., Kimura, Y., Shimizu, N., Koichi, A. Triterpene alcohol and sterol ferulates from rice bran and their anti-inflammatory effects, *J. Agric. Food Chem.* 48 (2000) 2313-2319.
4. Alosi, J.A., McDonald, D.E., Schneider, J.S., Privette, A.R., McFadden, D.W. Pterostilbene inhibits breast cancer in vitro through mitochondrial depolarization and induction of caspase-dependent apoptosis, *J. Surg. Res.* 161 (2010) 195-201.
5. Ambrosini, G.L., de Klerk, N.H., Fritschi, L., Mackerras, D., Musk, B. Fruit, vegetable, vitamin A intakes, and prostate cancer risk, *Prostate Cancer Prostatic Dis.* 11 (2008) 61-66.
6. Argiriadi, M.A., Morisseau, C., Goodrow, M.H., Dowdy, D.L., Hammock, B.D., Christianson, D.W. Binding of alkylurea inhibitors to epoxide hydrolase implicates active site tyrosines in substrate activation, *J. Biol. Chem.* 275 (2000) 15265-15270.
7. Argiriadi, M.A., Morisseau, C., Hammock, B.D., Christianson, D.W. Detoxification of environmental mutagens and carcinogens: structure, mechanism, and evolution of liver epoxide hydrolase, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96 (1999) 10637-10642.
8. Balick, M., Lee, R. Inflammation and ethnomedicine: looking to our past, *Explore (N.Y.)* 1 (2005) 389-383.
9. Basini, G., Bussolati, S., Santini, S.E., Grasselli, F. The impact of the phyto-oestrogen genistein on swine granulosa cell function, *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr. (Berl)* 94 (2010) 374-382.

10. Bayly, C.I., Black, W.C., Léger, S., Ouimet, N., Ouellet, M., Percival, M.D. Structure-based design of COX-2 selectivity into flurbiprofen. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 9 (1999) 307-312.
11. Bednarczyk, P. Potassium channels in brain mitochondria, *Acta Biochim. Pol.* 56 (2009) 385-392.
12. Bernardes, W.A., Lucarini, R., Tozatti, M.G., Souza, M.G., Andrade-Silva M.L., da Silva Filho, A.A., Martins, C.H., Miller-Crotti, A.E., Pauletti, P.M., Groppo, M., Cunha, W.R. Antimicrobial activity of *Rosmarinus officinalis* against oral pathogens: relevance of carnosica acid and carnosol, *Chem. Biodivers.* 7 (2010) 1835-1840.
13. Bohlin, L., Göransson, U., Alsmark, C., Wedén, C. Backlund, A. Natural products in modern life science, *Phytochem. Rev.* 9 (2010) 279-301.
14. Burns-Whitmore, B.L., Haddad, E.H., Sabaté, J., Jaceldo-Siegl, K., Tanzman, J., Rajaram, S. Effect of n-3 fatty acid enriched eggs and organic eggs on serum lutein in free-living lacto-ovo vegetarians, *Eur. J. Clin Nutr.* 64 (2010) 1332-1337.
15. Cai, J., Han, C., Hu, T., Zhang, J., Wu, D., Wang, F., Liu, Y., Ding, J., Chen, K., Yue, J., Shen, X., Jiang, H. Peptide deformylase is a potential target for anti-*Helicobacter pylori* drugs: reverse docking, enzymatic assay, and x-ray crystallography validation, *Protein Sci.* 15 (2006) 2071-208.
16. Calderone, V., Chericoni, S., Martinelli, C., Testai, L., Nardi, A., Morelli, I., Breschi, M.C., Martinotti, E. Vasorelaxing effects of flavonoids: investigation on the possible involvement of potassium channels, *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* 370 (2004) 290-298.
17. Calviello, G., Di Nicuolo, F., Gagnoli, S., Piccioni, E., Serini, S., Maggiano, N., Tringali, G., Navarra, P., Ranelletti, F.O., Palozza, P. n-3 PUFAs reduce VEGF expression in human colon cancer cells modulating the COX-2/PGE2 induced ERK-1 and -2 and HIF-1a induction pathway, *Carcinogenesis* 25 (2004) 2303-2310.
18. Cao, H., Yu, R., Tao, Y., Nikolic, D., van Breemen, R.B. Measurement of cyclooxygenase inhibition using liquid chromatography–tandem mass spectrometry, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 54 (2011) 230-235.

19. Castellarin, S.D., Di Gaspero, G. Transcriptional control of anthocyanin biosynthetic genes in extreme phenotypes for berry pigmentation of naturally occurring grapevines, *BMC Plant Biol.* 30 (2007) 7-46.
20. Cerella, C., Sobolewski, C., Dicato, M., Diederich, M. Targeting COX-2 expression by natural compounds: A promising alternative strategy to synthetic COX-2 inhibitors for cancer chemoprevention and therapy, *Biochem. Pharmacol.* 80 (2010) 1801-1815.
21. Chakraborti, A.K., Garg, S.K., Kumar, R., Motiwala, H.F., Jadhavar, P.S. Progress in COX-2 inhibitors: a journey so far, *Curr. Med. Chem.* 17 (2010) 1563-1593.
22. Chandrasekharan, N., Dai, H., Roos, K., Evanson, N., Tomsik, J., Elton, T., Simmons, D.L. COX-3, a cyclooxygenase-1 variant inhibited by acetaminophen and other analgesic/antipyretic drugs: cloning, structure, and expression. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 99 (2002) 13926-13931.
23. Chen, X.; Li, N.; Wang, S.; Wu, N.; Hong, J.; Jiao, X.; Krasna, M. J.; Beer, D.G.; Yang, C. S.; Leukotriene A4 hydrolase in rat and human esophageal adenocarcinomas and inhibitory effects of bestatin, *J. Natl. Cancer Inst.* 95 (2003) 1053-1061.
24. Chen, X.; Wang, S.; Wu, N.; Yang, C. S. Leukotriene A4 hydrolase as a target for cancer prevention and therapy. *Curr. Cancer Drug Targets* 4 (2004) 267-283.
25. Chen, Y.Z., Ung, C.Y. Computational method for drug target search and application in drug discovery, *J. Theor. Comput. Chem.* 1 (2002) 1-12.
26. Cheung, K.L., Khor, T.O., Kong, A.N. Synergistic effect of combination of phenethyl isothiocyanate and sulforaphane or curcumin and sulforaphane in the inhibition of inflammation, *Pharm. Res.* 26 (2009) 224-231.
27. Chiamvimonvat, N., Ho, C.M., Tsai, H.J., Hammock, B.; The soluble epoxide hydrolase as a pharmaceutical target for hypertension, *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 50 (2007) 225-237.
28. Chiamvimonvat, N.; Ho, C. M.; Tsai, H. J.; Hammock, B.; The soluble epoxide hydrolase as a pharmaceutical target for hypertension. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 2007, 50, 225-237.

29. Chung, E.Y., Kim, B.H., Hong, J.T., Lee, C.K., Ahn, B., Nam, S.Y., Han, S.B., Kim, Y. Resveratrol down-regulates interferon- $\gamma$ -inducible inflammatory genes in macrophages: molecular mechanism via decreased STAT-1 activation, *J. Nutr. Biochem.* 22 (2011) 902-909.
30. Couture, J.F., Legrand, P., Cantin, L., Labrie, F., Luu-The, V., Breton, R., Loop relaxation, a mechanism that explains the reduced specificity of rabbit 20 $\alpha$ -hydroxysteroid dehydrogenase, a member of the aldo-keto reductase superfamily, *J. Mol. Biol.* 339 (2004) 89-102.
31. Dewitt, D.L. Cox-2-selective inhibitors: The new super aspirins, *Mol. Pharm.* 55 (1999) 625-631.
32. Déziel, B.A., Patel, K., Neto, C., Gottschall-Pass, K., Hurta, R.A. Proanthocyanidins from the american cranberry (*Vaccinium macrocarpon*) inhibit matrix metalloproteinase-2 and matrix metalloproteinase-9 activity in human prostate cancer cells via alterations in multiple cellular signaling pathways, *J. Cell. Biochem.* 111 (2010) 742-754.
33. Dia, V.P., Berhow, M.A., Gonzalez de mejia, E. Bowman-birk inhibitor and genistein among soy compounds that synergistically inhibit nitric oxide and prostaglandin E2 pathways in lipopolysaccharide-induced macrophages, *J. Agric. Food Chem.* 56 (2008) 11707-11717.
34. Diesel, B., Kulhanek-Heinze, S., Höltje, M., Brandt, B., Höltje, H.D., Vollmar, A.M., Kiemer, A.K. Alpha-lipoic acid as a directly binding activator of the insulin receptor: protection from hepatocyte apoptosis. *Biochemistry* 46 (2007) 2146-2155.
35. Du, B., Jiang, L., Xia, Q., Zhong, L. Synergistic Inhibitory effects of curcumin and 5-fluorouracil on the growth of the human colon cancer cell Line HT-29, *Chemotherapy* 52 (2006) 23-28.
36. Fernández-Tome, M., Kraemer, L., Federman, S.C., Favale, N., Speziale, E.N. Sterin-Speziale, COX-2-mediated PGD2 synthesis regulates phosphatidylcholine biosynthesis in rat renal papillary tissue, *Biochem. Pharmacol.* 67 (2004) 245-254.
37. Filizola, M., Perez, J.J., Palomer, A., Mauleón, D. Comparative molecular modeling study of the three-dimensional structures of prostaglandin



- endoperoxide H<sub>2</sub> synthase 1 and 2 (COX-1 and COX-2), *J. Mol. Graph. Model.* 15 (1997) 290-300.
38. FitzGerald, G., Patrono, C. The coxibs, selective inhibitors of cyclooxygenase-2, *N. Engl. J. Med.* 345 (2001) 433-442.
39. Frasca, G., Panico, A.M., Bonina, F., Messina, R., Rizza, L., Musumeci, G., Rapisarda, P., Cardile, V. Involvement of inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 in the anti-inflammatory effects of a red orange extract in human chondrocytes, *Nat. Prod. Res.* 24 (2010) 1469-1480.
40. Frisch, M.J., Trucks, G.W., Schlegel, H.R., Scuseria, G.E., Robb, M.A., Cheeseman, J.R., Montgomery, J.A., Vreven, T., Kudin, K.N., Burant, J.C., Millam, J.M., Iyengar, S.S., Tomasi, J., Barone, V., Mennucci, B., Cossi, M., Scalmani, G., Rega, N., Petersson, G.A., Nakatsuji, H., Hada, M., Ehara, M., Toyota, K., Fukuda, R., Hasegawa, J., Ishida, M., Nakajima, T., Honda, Y., Kitao, O., Nakai, H., Klene, M., Li, X., Knox, J.E., Hratchian, H.P., Cross, J.B., Bakken, V., Adamo, C., Jaramillo, J., Gomperts, R., Stratmann, R.E., Yazyev, O., Austin, A.J., Cammi, R., Pomelli, C., Ochterski, J.W., Ayala, P.Y., Morokuma, K., Voth, G.A., Salvador, P., Dannenberg, J.J., Zakrzewski, V.G., Dapprich, S., Daniels, A.D., Strain, M.C., Farkas, O., Malick, D.K., Rabuck, A.D., Raghavachari, K., Foresman, J.B., Ortiz, J.V., Cui, Q., Baboul, A.G., Clifford, S., Cioslowski, J., Stefanov, B.B., Liu, G., Liashenko, A., Piskorz, P., Komaromi, I., Martin, R.L., Fox, D.J., Keith, T., Al-Laham, M.A., Peng, C.Y., Nanayakkara, A., Challacombe, M., Gill, P.M.W., Johnson, B., Chen, W., Wong, M.W., Gonzalez, C., Pople, J.A., Gaussian03. Gaussian, Inc.: Pittsburgh, PA, USA, (2003).
41. Funk, C.D. Leukotriene modifiers as potential therapeutics for cardiovascular disease, *Nat. Rev. Drug Discov.* 4 (2005) 664-672.
42. Furse, K.E., Pratt, D.A., Porter, N.A., Lybrand, T.P. Molecular dynamics simulations of arachidonic acid complexes with COX-1 and COX-2: insights into equilibrium behavior, *Biochemistry* 45 (2006) 3189-3205.
43. Gafner, S., Lee, S.K., Cuendet, M., Barthélémy, S., Vergnes, L., Labidalle, S., Mehta, R.G., Boone, C.W., Pezzuto, J.M. Biologic

- evaluation of curcumin and structural derivatives in cancer chemoprevention model systems, *Phytochemistry* 65 (2004) 2849-2859.
44. Galati, G., Sabzevari, O., Wilson, J.X., O'Brien, P.J. Prooxidant activity and cellular effects of the phenoxyl radicals of dietary flavonoids and other polyphenolics, *Toxicology* 177 (2002) 91-104.
45. Garg, R., Gupta, S., Maru, G.B. Dietary curcumin modulates transcriptional regulators of phase I and phase II enzymes in benzo[a]pyrene-treated mice: mechanism of its anti-initiating action, *Carcinogenesis* 29 (2008) 1022-1032.
46. Gonzales, A.M. Orlando, R.A. Curcumin and resveratrol inhibit nuclear factor-kappaB-mediated cytokine expression in adipocytes, *Nutrition & Metabolism* 5 (2008) 17.
47. Gorąca, A., Huk-Kolega, H., Piechota, A., Kleniewska, P., Ciejka, E., Skibska, B. Lipoic acid - biological activity and therapeutic potential, *Pharmacol. Rep.* 63 (2011) 849-58.
48. Grinter, S.Z., Liang, Y., Huang, S.Y., Hyder, S.M., Zou, X. An inverse docking approach for identifying new potential anti-cancer targets, *J Mol Graph Model.* 29(2011) 795-799.
49. Guha, R., Howard, M.T., Hutchison, G.R., Murray-Rust, P., Rzepa, H., Steinbeck, C., Wegner, J.K., Willighagen, E. The blue obelisk - interoperability in chemical informatics. *J. Chem. Inf. Model.* 46 (2006) 991-998.
50. Haeggstrom. J.Z.; Structure, Function, and Regulation of Leukotriene A4 Hydrolase. *Am. J. Respir. Crit. Care. Med.* 16 (2000) 25-31.
51. Haiching, M.A., Penning, T.M. Characterization of homogeneous recombinant rat ovarian 20alpha-hydroxysteroid dehydrogenase: fluorescent properties and inhibition profile, *Biochem. J.* 341 (1999) 853-859.
52. Hamza, A., Zhao, X., Tong, M., Tai, H.H., Zhan, C.G. Novel human mPGES-1 inhibitors identified through structure-based virtual screening, *Bioorg. Med. Chem.* 19 (2011) 6077-6086.
53. Han, E.H., Hwang, Y.P., Kim, H.G., Park, J.H., Jeong, T.C., Jeong, H.G., Upregulation of cyclooxygenase-2 by 4-nonylphenol is mediated through

- the cyclic amp response element activation pathway, *J. Toxicol. Environ. Health A.* 73(2010) 1451-1464.
- 54.Hare, A.A., Leng, L., Gandavadi, S., Du, X., Cournia, Z., Bucala, R., Jorgensen, W.L. Optimization of N-benzyl-benzoxazol-2-ones as receptor antagonists of macrophage migration inhibitory factor (MIF), *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 20 (2010) 5811-5814.
- 55.Harriman, J., Deleavey, G., Lambropoulos, A., Deslongchamps, G. Reverse-docking study of the organocatalyzed asymmetric Strecker hydrocyanation of aldimines and ketimines. *Tetrahedron.* 63 (2007) 13032-13038.
- 56.Hong, J., Bose, M., Ju, J., Ryu, J.H., Chen, X., Sang, S., Lee, M.J., Yang, C.S. Modulation of arachidonic acid metabolism by curcumin and related  $\beta$ -diketone derivatives: effects on cytosolic phospholipase A2, cyclooxygenases and 5-lipoxygenase, *Carcinogenesis* 25 (2004) 1671-1679.
- 57.Hong, Z., Smith, A.J., Archer, S.L., Wu, X.C., Nelson, D.P., Peterson, D., Johnson, G., Weir, E. K. Pergolide is an inhibitor of voltage-gated potassium channels, including Kv1.5, and causes pulmonary vasoconstriction, *Circulation* 112 (2005) 1494-1499.
- 58.Huang, K.S., Holmgren, J., Reik, L., Lucas-McGady, D., Roberts, J., Liu, C.M., Levin, W. High-throughput methods for measuring heparanase activity and screening potential antimetastatic and anti-inflammatory agents, *Anal. Biochem.* 333(2004) 389-398.
- 59.Hurst, R.S., Higdon, N.R., Lawson, J.A., Clark, M.A., Rutherford-Root, K.L., McDonald, W.G., Haas, J.V., McGrath, J.P., Meglasson, M.D. Dopamine receptor agonists differ in their actions on cardiac ion channels, *Eur. J. Pharmacol.* 482 (2003) 31-37.
- 60.Imig, J.D., Carpenter, M.A., Shaw, S. The Soluble Epoxide Hydrolase Inhibitor AR9281 Decreases Blood Pressure, Ameliorates Renal Injury and Improves vascular function in hypertension, *Pharmaceuticals* 2 (2009) 217-227.
- 61.Imig, J.D.; Hammock, B.D.; Soluble epoxide hydrolase as a therapeutic target for cardiovascular diseases, *Nat. Rev. Drug Discovery* 8 (2009) 794-805.

62. Mills, J.D., Bailes, J.E., Sedney, C.L., Hutchins, H., Sears, B. Omega-3 fatty acid supplementation and reduction of traumatic axonal injury in a rodent head injury model, *J. Neurosurg.* 114 (2010) 77-84.
63. Jain, A.N. Surflex-Dock 2.1: Robust performance from ligand energetic modeling, ring flexibility, and knowledge-based search, *J. Comput. Aided Mol. Des.* 21 (2007) 281-306.
64. Jain, A.N., Surflex-Dock 2.1: Robust performance from ligand energetic modeling, ring flexibility, and knowledge-based search, *J. Comput. Aided Mol. Des.* 21 (2007) 281-306.
65. Jiang, X.; Zhou, L.; Wu, Y.; Wei, D.; Sun, C.; Jia, J.; Liu, Y.; Lai, L.; Modulating the Substrate Specificity of LTA4H Aminopeptidase by Using Chemical Compounds and Small-Molecule-Guided Mutagenesis. *ChemBioChem.* 11 (2010) 1120-1128.
66. Jin, M., Suh, S.J., Yang, J.H., Lu, Y., Kim, S.J., Kwon, S., Jo, T.H., Kim, J.W., Park, Y.I., Ahn, G.W., Lee, C.K., Kim, C.H., Son, J.K., Son, K.H., Chang, H.W. Anti-inflammatory activity of bark of *Dioscorea batatas* DECNE through the inhibition of iNOS and COX-2 expressions in RAW264.7 cells via NF- $\kappa$ B and ERK1/2 inactivation, *Food Chem. Toxicol.* 48 (2010) 3073-3079.
67. Jurenka, J.S. Anti-inflammatory properties of curcumin, a major constituent of *Curcuma longa*: a review of preclinical and clinical research, *Altern. Med. Rev.* 14 (2009) 141-153.
68. Huang, K.S., Holmgren, J., Reik, L., Lucas-McGady, D., Roberts, J., Liu, C.M., Levin, W. High-throughput methods for measuring heparanase activity and screening potential antimetastatic and anti-inflammatory agents, *Anal. Biochem.* 333(2004) 389-398.
69. Kalantari, H., Das, D.K. Physiological effects of resveratrol, *Biofactors* 36 (2010) 401-406.
70. Kam, P.C.A., So, A. COX-3: uncertainties and controversies, *Curr. Anaesth. Crit Care* 20 (2009) 50-53.
71. Kaura, S., Modib, N.H., Pandac, D., Roy, N. Probing the binding site of curcumin in *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis* FtsZ - A structural insight to unveil antibacterial activity of curcumin, *Eur. J. Med. Chem.* 45 (2010) 4209-4214.

72. Kiefer, J.R., Pawlitz, J.L., Moreland, K.T., Stegeman, R.A., Hood, W.F., Gierse, J.K., Stevens, A.M., Goodwin, D.C., Rowlinson, S.W., Marnett, L.J., W.C. Stallings, R.G. Kurumbail, Structural insights into the stereochemistry of the cyclooxygenase reaction, *Nature* 405 (2000) 97-101.
73. Kim, B.H., Kang, K.S., Lee, Y.S: Effect of retinoids on LPS-induced COX-2 expression and COX-2 associated PGE<sub>2</sub> release from mouse peritoneal macrophages and TNF- $\alpha$  release from rat peripheral blood mononuclear cells, *Toxicol. Let.* 150 (2004) 191-201.
74. Kitts, D.D. Bioactive substances in food: identification and potential uses, *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 72 (1994) 423-424.
75. Kole, L., Giri, B., Manna, S.K., Pal, B., Ghosh, S. Biochanin-A, an isoflavon, showed anti-proliferative and anti-inflammatory activities through the inhibition of iNOS expression, p38-MAPK and ATF-2 phosphorylation and blocking NF- $\kappa$ B nuclear translocation, *Eur. J. Pharmacol.* 653 (2011) 8-15.
76. Krämer, K., Hoppe, P., Packer L. In R- $\alpha$ -Lipoic Acid, Krämer, K., Packer, L., eds., Marcel Dekker Inc., New York, (2001), cap. 9.
77. Kujubu, D., Fletcher, B., Varnum, B., Lim, W., Herschman, H. TIS10, a phorbol ester tumor promoter-inducible mRNA from Swiss 3T3 cells, encodes a novel prostaglandin synthase/cyclooxygenase homologue, *J. Biol. Chem.* 266 (1991) 12866-12872.
78. Lai, C.S., Li, S., Chai, C.Y., Lo, C.Y., Ho, C.T., Wang, Y.J., Pan, M.H. Inhibitory effect of citrus 5-hydroxy-3,6,7,8,3',4'-hexamethoxyflavone on 12-O-tetradecanoylphorbol 13-acetate-induced skin inflammation and tumor promotion in mice, *Carcinogenesis* 28 (2007) 2581-2588.
79. Lai, C.S., Li, S., Chai, C.Y., Lo, C.Y., Ho, C.T., Wang, Y.J., Pan, M.H. Inhibitory effect of citrus 5-hydroxy-3,6,7,8,3',4'-hexamethoxyflavone on 12-O-tetradecanoylphorbol 13-acetate-induced skin inflammation and tumor promotion in mice, *Carcinogenesis* 28 (2007) 2581-2588.
80. Lansky, E.P., Paavilainen, H.M., Pawlus, A.D., Newman, R.A. *Ficus* spp. (fig): ethnobotany and potential as anticancer and anti-inflammatory agents, *J. Ethnopharmacol.* 119 (2008) 195-213.

81. Lee, K.M., Lee, K.W., Jung, S.K., Lee, E.J., Heo, Y.S., Bode, A.M., Lubet, R.A., Lee, H.J., Dong, Z. Kaempferol inhibits UVB-induced COX-2 expression by suppressing Src kinase activity, *Biochem. Pharmacol.* 80 (2010) 2042-2049.
82. Leelawat, K., Ohuchida, K., Mizumoto, K., Mahidol, C., Tanaka, M., All-trans retinoic acid inhibits the cell proliferation but enhances the cell invasion through up-regulation of c-met in pancreatic cancer cells, *Cancer Letters* 224 (2005) 303-310.
83. Lev-Ari, S., Starr, A., Vexler, A., Karaush, V., Loew, V., Greif, J., Fenig, E., Aderka, D., Ben-Yosef, R. Inhibition of pancreatic and lung adenocarcinoma cell survival by curcumin is associated with increased apoptosis, down-regulation of COX-2 and EGFR and inhibition of Erk1/2 activity, *Anticancer Res.* 26 (2006a) 4423-4430.
84. Lev-Ari, S., Strier, L., Kazanov, D., Elkayam, O., Lichtenberg, D., Caspi, D., Arber, N. Curcumin synergistically potentiates the growth-inhibitory and pro-apoptotic effects of celecoxib in osteoarthritis synovial adherent cells, *Rheumatology* 45 (2006c) 171-177.
85. Lev-Ari, S., Strier, L., Kazanov, D., Madar-Shapiro, L., Dvory-Sobol, H., Pinchuk, I., Marian, B., Lichtenberg, D., Arber, N. Celecoxib and curcumin synergistically inhibit the growth of colorectal cancer cells, *Clin. Cancer Res.* 11 (2005) 6738-6744.
86. Lev-Ari, S., Y. Maimon, Y., Strier, L., Kazanov, D., Arber, N. Down-regulation of prostaglandin E2 by curcumin is correlated with inhibition of cell growth and induction of apoptosis in human colon carcinoma cell lines, *J. Soc. Integr. Oncol.* 4 (2006b) 21-26.
87. Lewis, M. J.; Wiebe, J. P.; Heathcote, J. G.; Expression of progesterone metabolizing enzyme genes (AKR1C1, AKR1C2, AKR1C3, SRD5A1, SRD5A2) is altered in human breast carcinoma. *BMC Cancer* 4 (2004) 27.
88. Li, H., Zheng M., Luo X., Zhu W., Jiang H. Computational Approaches in Drug Discovery and Development. Wiley encyclopedia of chemical biology. (2008) Doi: 10.1002/9780470048672.wecb098.

- 89.Li, H., Gao, Z., Kang, L., Zhang, H., Yang, K., Yul, K., Zhul, W., Chen, K., Shen, J., Wang, X., Jiang, H. TarFisDock: a web server for identifying drug targets with docking approach, *Nucl. Acids Res.* 34 (2006) 219-226.
- 90.Li, R.R., Pang, L.L., Du, Q., Shi, Y., Dai, W.J., Yin, K.S. Apigenin inhibits allergen-induced airway inflammation and switches immune response in a murine model of asthma, *Immunopharmacol. Immunotoxicol.* 32 (2010) 364-370.
- 91.Liang, Y.C. Tsai, S.H., Tsai, D.C., Lin-Shiau, S.Y., Lin, J.K. Suppression of inducible cyclooxygenase and nitric oxide synthase through activation of peroxisome proliferator-activated receptor-Q by flavonoids in mouse macrophages, *FEBS Lett.* 496 (2001) 12-18.
- 92.Liang, Y.C., Huang, Y.T., Tsai, S.H., Lin-Shiau, S.Y., Chen, C.F., Lin, J.K. Suppression of inducible cyclooxygenase and inducible nitric oxide synthase by apigenin and related flavonoids in mouse macrophages, *Carcinogenesis* 20 (1999) 1945-1952.
- 93.Lien, L.T., Yeh, H.S., Su, W.T. Effect of adding extracted hesperetin, naringenin and pectin on egg cholesterol, serum traits and antioxidant activity in laying hens, *Arch. Anim. Nutr.* 62 (2008) 33-43.
- 94.Lien, L.T., Yeh, H.S., Su, W.T. Effect of adding extracted hesperetin, naringenin and pectin on egg cholesterol, serum traits and antioxidant activity in laying hens, *Arch. Anim. Nutr.* 62 (2008) 33-43.
- 95.Lila, M.A., Raskin, I., Health-related interactions of phytochemicals, *J. Food Sci.*70 (2005) 20-27.
- 96.Lucas, L., Russell, A., Keast, R. Molecular mechanisms of inflammation. Anti-inflammatory benefits of virgin olive oil and the phenolic compound oleocanthal. *Curr. Pharm. Des.* 17 (2011) 754-768.
- 97.Mancini, J.A., Evans, J.F.; Cloning and characterization of the human leukotriene A4 hydrolase gene. *Eur. J. Biochem.* 231 (1995) 65-71.
- 98.Mandal, S., Moudgil, M., Mandal, S.K. Rational drug design. *Eur. J. Pharmacol.* 625 (2009) 90-100.
- 99.Mann, N.J., O'Connell, S.L., Baldwin, K.M., Singh, I., Meyer, B.J. Effects of seal oil and tuna-fish oil on platelet parameters and plasma lipid levels in healthy subjects, *Lipids* 45 (2010) 669-681.

100. Massaro, M., Habib, A., Lubrano, L., Del Turco, S., Lazzerini, G., Bourcier, T., Weksler, B.B., De Caterina, R. The omega-3 fatty acid docosahexaenoate attenuates endothelial cyclooxygenase-2 induction through both NADP[H] oxidase and PKC $\epsilon$  inhibition, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 103 (2006) 15184-15189.
101. May, A. M. Zacharias, Accounting for global protein deformability during protein–protein and protein-ligand docking, *BBA- Proteins & Proteomics* 1754 (2005) 225-231.
102. Michaux, C., de Leval, X., Julémont, F., Dogné, J.M., Pirotte, B., Durant, F. Structure-based pharmacophore of COX-2 selective inhibitors and identification of original lead compounds from 3D database searching method, *Eur. J. Med. Chem.* 41 (2006) 1446-1455.
103. Mills, J.D., Bailes, J.E., Sedney, C.L., Hutchins, H., Sears, B. Omega-3 fatty acid supplementation and reduction of traumatic axonal injury in a rodent head injury model, *J. Neurosurg.* 114 (2010) 77-84.
104. Mishra, B.B., Tiwari, V.K. Natural products: An evolving role in future drug discovery. *Eur. J. Med. Chem.* 46 (2011) 4769-4807.
105. Mitchell, J., Warner, T. Cyclo-oxygenase-2: pharmacology, physiology, biochemistry and relevance to NSAID therapy, *Br. J. Pharmacol.* 128 (1999) 1121-1132.
106. Moghaddam, S.J., Barta, P., Mirabolfathinejad, S.G., Ammar-Aouchiche, Z., Garza, N.T., Vo, T.T., Newman, R.A., Aggarwal, B.B., Evans, C.M., Tuvim, M.J., Lotan, R., Dickey, B.F. Curcumin inhibits COPD-like airway inflammation and lung cancer progression in mice, *Carcinogenesis* 30 (2009) 1949-1956.
107. Murias, M., Handler, N., Erker, T., Pleban, K., Ecker, G., Saiko, P., Szekeres, T., Jäger, W. Resveratrol analogues as selective cyclooxygenase-2 inhibitors: synthesis and structure–activity relationship. *Bioorg. Med. Chem.* 12 (2004) 5571-5578.
108. O'Banion, M., Sadowski, H., Winn, V., Young, D. A serum and glucocorticoid-regulated 4-kilobase mRNA encodes a cyclooxygenase-related protein, *J. Biol. Chem.* 266 (1991) 23261-23267.



109. Oguro, A., Fujita, N., Imaoka, S., Regulation of soluble epoxide hydrolase (sEH) in mice with diabetes: high glucose suppresses sEH expression, *Drug Metab. Pharmacokinet.* 24 (2009) 24438-445.
110. Packer, L., Hiramatsu, M., Yoshikawa K., *Antioxidant Food Supplements in Human Health*, Academic Press: New York, (1999).
111. Pan, M.H., Lai, C.S., Dushenkov, S., Ho, C.T. Modulation of inflammatory genes by natural dietary bioactive compounds, *J. Agric. Food Chem.* 57 (2009) 4467-447.
112. Park, H., Lee, S. Free energy perturbation approach to the critical assessment of selective cyclooxygenase-2 inhibitors, *J. Comput. Aided Mol. Des.* 19 (2005) 17-31.
113. Perera, J., Tan, J.H., Jeevathayaparan, S., Chakravarthi, S., Haleagrahara, N. Neuroprotective effects of alpha lipoic acid on haloperidol-induced oxidative stress in the rat brain, *Cell Biosci.* 1 (2011) 12.
114. Piekorz, R.P., Gingras, S., Hoffmeyer, A., Ihle, J.N., Weinstein, Y. Regulation of progesterone levels during pregnancy and parturition by signal transducer and activator of transcription 5 and 20alpha-hydroxysteroid dehydrogenase, *Mol. Endocrinol.* 19 (2005) 431-440.
115. PubChem. <http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>.
116. Rakel, D. In *Dislipidemias*; Underbakke, G.; McBride, P. E., eds.; Elsevier: España, (2008), chapter 40.
117. Rasyid, A.R., Rahman, A.R.A., Jaalam, K., Lelo, A. Effect of different curcumin dosages on human gall bladder, *Asia Pac. J. Clin. Nutr.* 11 (2002) 314-318.
118. RCSB PDB Protein Data Bank | Home [www.pdb.org/pdb/home/home.do](http://www.pdb.org/pdb/home/home.do).
119. Reber, J.D; Eggett, D.L.; Parker, T.L. Antioxidant capacity interactions and a chemical/structural model of phenolic compounds found in strawberries *Int. J. Food Sci. and Nutr.*, 62 (2011) 445-452.
120. Ringbom, T., Huss, U., Stenholm, Å., Flock, S., Skattebøl, L., Perera, P., Bohlin, L. COX-2 inhibitory effects of naturally occurring and modified fatty acids, *J. Nat. Prod.* 64 (2001) 745-749.
121. Rosillo, M.A., Sanchez-Hidalgo, M., Cárdeno, A., de la Lastra, C.A. Protective effect of ellagic acid, a natural polyphenolic compound, in a

- murine model of Crohn's disease. *Biochem. Pharmacol.* 82 (2011) 737-745.
122. Rudberg, P. C., Tholander, F., Andberg, M., Thunnissen, M. G., Haeggström, J. Z., Leukotriene A4 hydrolase: identification of a common carboxylate recognition site for the epoxide hydrolase and aminopeptidase substrates. *J. Biol. Chem.* 279 (2004) 27376-27382.
  123. Sarić, S. Sobocanec, T. Balog, B. Kusić, V. Sverko, V. Dragović-Uzelac, B. Levaj, Z. Cosić, Z.M. Safranko, T. Marotti, Improved antioxidant and anti-inflammatory potential in mice consuming sour cherry juice (*Prunus cerasus* cv. Maraska), *Plant Foods Hum. Nutr.* 64 (2009) 231-237.
  124. Sarić, S., Sobocanec, S., Balog, T., Kusić, V., Sverko, V., Dragović-Uzelac, V., Levaj, B., Cosić, Z., Macak Safranko, Z., Marotti, T. Improved antioxidant and anti-inflammatory potential in mice consuming sour cherry juice (*Prunus cerasus* cv. Maraska), *Plant Foods Hum. Nutr.* 64 (2009) 231-237.
  125. Satoh, S., Shindoh, M., Min, J.Z., Toyo'oka, T., Fukushima, T., Inagaki, S. Selective and sensitive determination of lipoyllysine (protein-bound alpha-lipoic acid) in biological specimens by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *Anal. Chim. Acta.* 618 (2008) 210-217.
  126. Schmalhofer, W.A., Swensen, A.M., Thomas, B.S., Felix, J.P., Haedo, R.J., Solly, K., Kiss, L., Kaczorowski, G.J., Garcia M.L. A pharmacologically validated, high-capacity, functional thallium flux assay for the human Ether-à-go-go related gene potassium channel, *Assay Drug Dev. Technol.* 8 (2010) 714-726.
  127. Seeram, N.P., Zhang, Y., Nair, M.G. Inhibition of proliferation of human cancer cells and cyclooxygenase enzymes by anthocyanidins and catechins, *Nutr. Cancer* 46 (2003) 101-106.
  128. Selvam, S.M. Jachak, R. Thilagavathi, A.K. Chakraborti, Design, synthesis, biological evaluation and molecular docking of curcumin analogues as antioxidant, cyclooxygenase inhibitory and anti-inflammatory agents, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 15 (2005) 1793-1797.
  129. Shaiq-Ali, M., Saleem M., S., Ahmad, Waqar., A., Parvez, M., P., Yamdagni, R., Y. Chlorinated monoterpene ketone, acylated  $\beta$ -sitosterol

- glycosides and a flavanone glycoside from *Mentha longifolia* (Lamiaceae), *Phytochemistry* 59 (2002) 889-895.
130. Sharma, J.N., Mohammed, L.A. The role of leukotrienes in the pathophysiology of inflammatory disorders: is there a case for revisiting leukotrienes as therapeutic targets?, *Inflammopharmacology* 14 (2006) 10-16.
  131. Shen, C.L., Yeh, J.K., Cao, J., Wang, J.S. Green tea and bone metabolism, *Nutr. Res.* 29 (2009) 437-456.
  132. Sikora, E., Scapagnini, G., Barbagallo, M. Curcumin, inflammation, ageing and age-related diseases, *Immun. Ageing.* 7 (2010) 1.
  133. Skupinska, K., Misiewicz-Krzeminska, I., Lubelska, K., Kasprzycka-Guttman, T. The effect of isothiocyanates on CYP1A1 and CYP1A2 activities induced by polycyclic aromatic hydrocarbons in MCF7 cells, *Toxicol. In Vitro.* 23 (2009) 763-771.
  134. Sobolewski, C., Cerella, C., Dicato, M., Diederich, M. Cox-2 inhibitors induce early c-Myc downregulation and lead to expression of differentiation markers in leukemia cells, *Cell Cycle* 10 (2011) 2978-2993.
  135. Soikkeli, A., Kurkela M., Hirvonen, J., Yliperttula, M., Finel, M. Fluorescence-Based High-Throughput Screening Assay for Drug Interactions with UGT1A6, *Assay Drug Dev. Technol.* 9 (2011) 496-502.
  136. Stuetz, W., Prapamontol, T., Hongsibsong, S., Biesalski, H.K. Polymethoxylated flavones, flavanone glycosides, carotenoids, and antioxidants in different cultivation types of tangerines (*Citrus reticulata* Blanco cv. Sainampueng) from Northern Thailand, *J. Agric. Food Chem.* 58 (2010) 6069-6074.
  137. Surh, Y.J., Chun, K.S., Cha, H.H., Han, S.S., Keum, Y.S., Park, K.K., Lee, S.S. Molecular mechanisms underlying chemopreventive activities of anti-inflammatory phytochemicals: down-regulation of COX-2 and iNOS through suppression of NF- $\kappa$ B activation. *Mutat. Res.* 480-481 (2001) 243-268.
  138. SYBYL molecular modeling software, Version 8.1. (2007). Tripos, St. Louis, MO, U.S.A.

139. Tager, A.M., Luster, A.D., BLT1 and BLT2: the leukotriene B(4) receptors, *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* 69 (2003) 123-134.
140. Takano-Ishikaw, Y., Goto, M., Yamaki, K. Structure–activity relations of inhibitory effects of various flavonoids on lipopolysaccharide-induced prostaglandin E2 production in rat peritoneal macrophages: comparison between subclasses of flavonoids, *Phytomedicine* 13 (2006) 310-317.
141. Tang, Y., Zhu, W., Chen, K., Jiang, H. New technologies in computer-aided drug design: Toward target identification and new chemical entity discovery, *Drug Discov. Today: Tech.* 3 (2006) 307-313.
142. Teisseyre, A., Duarte, N., Ferreira, M.J., Michalak, K., Influence of the multidrug transporter inhibitors on the activity of Kv 1.3 voltage-gated potassium channels, *J. Physiol. Pharmacol.* 60 (2009) 69-76.
143. Theodosiou, M., Laudet, V., Schubert, M. From carrot to clinic: an overview of the retinoic acid signaling pathway, *Cell. Mol. Life Sci.* 67 (2010) 1423-1445.
144. Thoppil, R.J., Bishayee, A. Terpenoids as potential chemopreventive and therapeutic agents in liver cancer. *World J. Hepatol.* 3 (2011) 228-249.
145. Thunnissen, M.M.G.M., Andersson, B., Samuelsson, B., Wong, C.H., Haeggström, J. Z. Crystal structures of leukotriene A4 hydrolase in complex with captopril and two competitive tight-binding inhibitors, *FASEB J.* 16 (2002) 1648-1650.
146. Thunnissen, M.M.G.M.; Nordlund, P.; Haeggstrom, J.Z.; Crystal structure of human leukotriene A(4) hydrolase, a bifunctional enzyme in inflammation. *Nat. Struct. Biol.* 8 (2001) 131-135.
147. Thürmann, P.A., Steffen, J., Zwernemann, C., Aebischer, C.P., Cohn, W., Wendt, G., Schalch, W. Plasma concentration response to drinks containing beta-carotene as carrot juice or formulated as a water dispersible powder, *Eur. J. Nutr.* 41 (2002) 228-235.
148. Tjendraputra, E., Tran, V.H., Biu-Brennan, D., Roufogalis B.D., Duke, C.C. Effect of ginger constituents and synthetic analogues on cyclooxygenase-2 enzyme in intact cells, *Bioorg. Chem.* 29 (2001) 156-163.

149. Trott, O., Olson, A.J. AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization and multithreading, *J. Comput. Chem.* 31 (2010) 455-461.
150. Uddin, M.J., Crews, B.C., Ghebreselasie, K., Huda, I., Kingsley, P.J., Ansari, M.S., Tantawy, M.N., Reese, J., Marnett, L.J. Fluorinated COX-2 Inhibitors as Agents in PET Imaging of Inflammation and Cancer, *Cancer Prev. Res. (Phila)* 4 (2011) 1536-1545.
151. Utsintong, M., Talley, T.T., Taylor, P.W., Olson, A.J., Vajragupta, O. Virtual screening against alpha-cobratoxin, *J. Biomol. Screen.* 14 (2009) 1109-1118.
152. Vasanthi, H.R., Mukherjee, S., Das, D.K. Potential health benefits of broccoli- a chemico-biological overview, *Mini Rev. Med. Chem.* 9 (2009) 749-759.
153. Vela, E.M., Knostman, K.A., Mott, J.M., Warren, R.L., Garver, J.N., Vela, L.J., Stammen, R.L. Genistein, a general kinase inhibitor, as a potential antiviral for arenaviral hemorrhagic fever as described in the Pirital virus-Syrian golden hamster model, *Antiviral Res.* 87 (2010) 318-328.
154. Verdonk, M.L., Cole, J.C., Hartshorn, M.J., Murray, C.W., Taylor, R.D. Improved protein–ligand docking using GOLD, *Proteins: Struct. Funct. Gen.* 52 (2003) 609-623.
155. Vinogradova, Y., Coupland, C., Hippisley-Cox, J. Exposure to cyclooxygenase-2 inhibitors and risk of cancer: nested case-control studies, *Br. J. Cancer* 105 (2011) 452-459.
156. Visanji, J.M., Duthie, S.J., Pirie, L., Thompson, D.G., Padfield, P.J. Dietary isothiocyanates inhibit Caco-2 cell proliferation and induce G2/M phase cell cycle arrest, DNA damage, and G2/M checkpoint activation, *J. Nutr.* 134 (2004) 3121-3126.
157. Vogel, J.T., Tieman, D.M., Sims, C.A., Odabasi, A.Z., Clark, D.G., Klee, H.J. Carotenoid content impacts flavor acceptability in tomato (*Solanum lycopersicum*), *J. Sci. Food Agric.* 90 (2010) 2233-2340.
158. Wang, H., Nair, M.G., Strasburg, G.M., Chang, Y.C., Booren, A.M., Gray, J.I., DeWitt, D.L. Antioxidant and antiinflammatory activities of anthocyanins and their aglycon, cyanidin, from tart cherries, *J. Nat. Prod.* 62 (1999) 294-296.

159. Wang, H.M., Zhao, Y.X., Zhang, S., Liu, G.D., Kang, W.Y., Tang, H.D., Ding, J.Q., Chen, S.D. PPARgamma agonist curcumin reduces the amyloid-beta-stimulated inflammatory responses in primary astrocytes, *J. Alzheimers Dis.* 20 (2010) 1189-1199.
160. Wang, P., Aronson, W.J., Huang, M., Zhang, Y., Lee, R.P., Heber, D., Henning, S.M. Green tea polyphenolics and metabolites in prostatectomy tissue: Implications for Cancer prevention, *Cancer Prev. Res.* 3 (2010) 985-993.
161. Wang, X., Yu, Y., Ji, L., Liang, X., Zhang, T., Hai, C.X. Alpha-lipoic acid protects against myocardial ischemia/reperfusion injury via multiple target effects, *Food Chem. Toxicol.* 49 (2011) 2750-2757.
162. Watkins, B.A., Hannon, K., Ferruzzi, M., Li, Y. Dietary PUFA and flavonoids as deterrents for environmental pollutants, *J. Nutr. Biochem.* 18 (2007) 196-205.
163. Weng, C.J., Wu, C.F., Huang, H.W., Ho, C.T., Yen, G.C. Anti-invasion effects of 6-shogaol and 6-gingerol, two active components in ginger, on human hepatocarcinoma cells, *Mol. Nutr. Food Res.* 54 (2010) 1618-1627.
164. Wickman, K., Krapivinsky, G., Corey, S., Kennedy, M., Nemeč, J., Medina, I., Clapham, D. E., Structure, G protein activation, and functional relevance of the cardiac G protein-gated K<sup>+</sup> channel, IKACH, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 868 (1999) 386-398.
165. Wilken, R., Veena, M.S., Wang, M.B. Srivatsan, E.S. Curcumin: a review of anti-cancer properties and therapeutic activity in head & neck squamous cell carcinoma, *Mol. Cancer* 10 (2011) 12.
166. Wolber, G., Langer, T. LigandScout: 3-D pharmacophores derived from protein-bound ligands and their use as virtual screening filters, *J. Chem. Inf. Model.* 45(2005) 160-169.
167. Wu, S.J., Tam, K.W., Tsai, Y.H., Chang, C.C., Chao, J.C. Curcumin and saikosaponin a inhibit chemical-induced liver inflammation and fibrosis in rats, *Am. J. Chin. Med.* 38 (2010) 99-111.
168. Wulff, H., Castle, N.A., Pardo, L.A. Voltage-gated potassium channels as therapeutic targets, *Nat. Rev. Drug Discovery* 8 (2009) 982-1001.

169. Xie, W., Chipman, J., Robertson, D., Erikson, R., Simmons, D. Expression of a mitogen-inducible gene encoding prostaglandin synthase is regulated by mRNA splicing, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, 88 (1991) 2692-2696.
170. Yan, L., Figueroa, D.J., Austin, C.P., Liu, Y., Bugianesi, R.M., Slaughter, R.S., Kaczorowski, G.J., Expression of voltage-gated potassium channels in human and rhesus pancreatic islets. *Diabetes* 53 (2004) 597-607.
171. Yang, X., Liang, S.H., Weyant, D.M., Lazarus, P., Gallagher, C. J., Omiecinski, C. J. The expression of human microsomal epoxide hydrolase is predominantly driven by a genetically polymorphic far upstream promoter, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 330 (2009) 23-30.
172. Yao, Y., Sang, W., Zhou, M., Ren, G. Phenolic composition and antioxidant activities of 11 celery cultivars, *J. Food Sci.* 75 (2010) 9-13.
173. Ye, Y., Wu, J., Dunn, T., Yi, J., Tong, X., Zhang, D. Inhibition of cyclooxygenase-2 activity in head and neck cancer cells by genistein, *Cancer Lett.* 211 (2004) 39-46.
174. Zarghi, A., Javid, F.S., Ghodsi, R., Dadrass, O.G., Daraei, B., Hedayati, M. Design, Synthesis and Biological Evaluation of New 5,5-Diarylhydantoin Derivatives as Selective Cyclooxygenase-2 Inhibitors, *Sci. Pharm.* 79 (2011) 449-460.
175. Zhou, X., Li, Y., Chen, X. Computational identification of bioactive natural products by structure activity relationship, *J. Mol. Graph. Model.* 29 (2010) 38-45.
176. Zhou, Z., Wang, Y., Bryant, S.H. Computational analysis of the cathepsin B inhibitors activities through LR-MMPBSA binding affinity calculation based on docked complex, *J. Comput. Chem.* 30 (2009) 2165-2175.
177. Zykova, T.A., Zhu, F., Zhai, X., Ma, W.Y., Ermakova, S.P., Lee, K.W., Bode, A.M., Dong, Z. Resveratrol directly targets COX-2 to inhibit carcinogenesis, *Mol. Carcinog.* 47 (2008) 797-805.

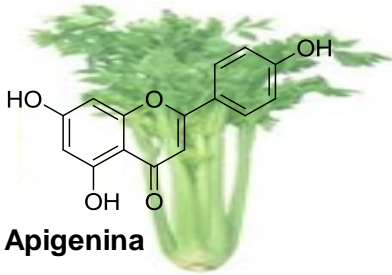
# **ANEXOS**



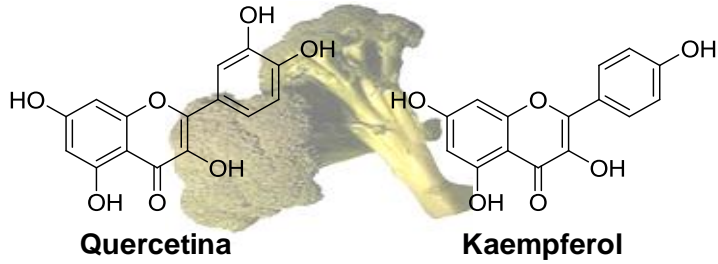
# **ANEXO A**

**Estructura y sus fuentes de los compuestos naturales  
bioactivos evaluados**

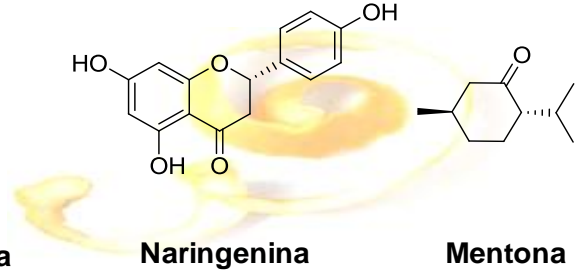
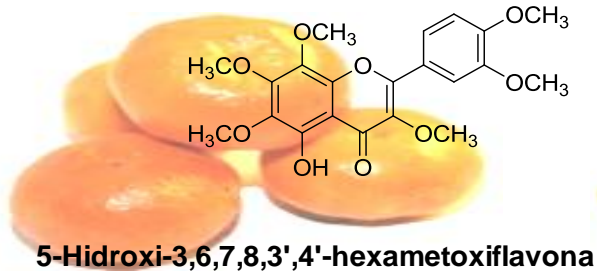
### Apio



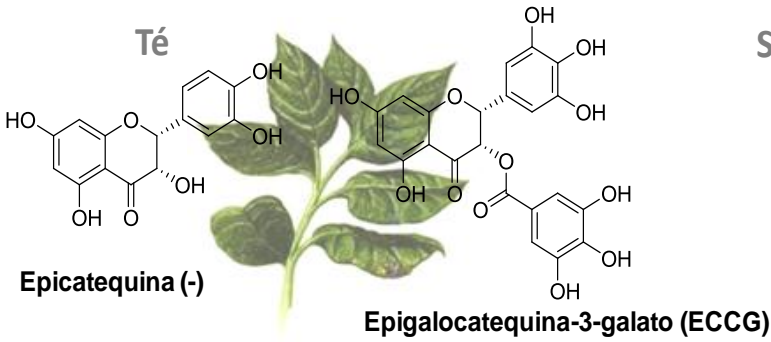
### Brócoli



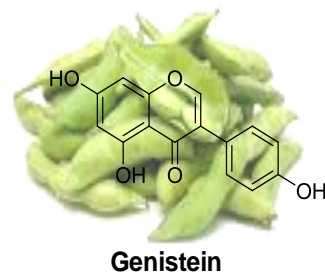
### Cascaras de cítricos



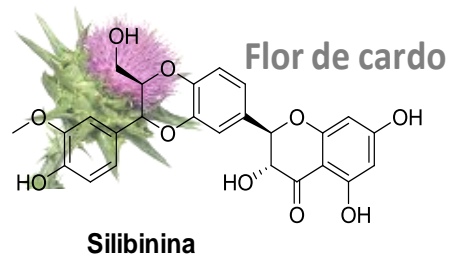
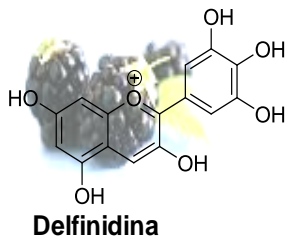
### Té



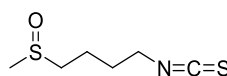
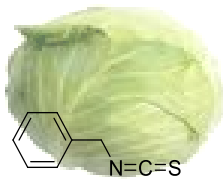
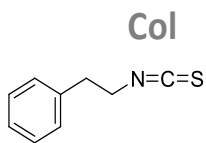
### Soya



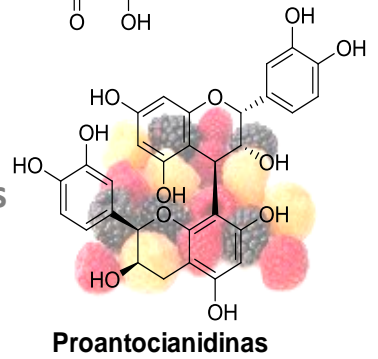
### Frutas oscuras



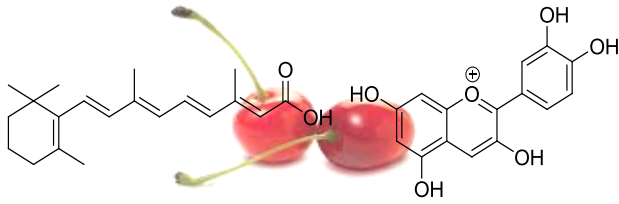
### Flor de cardo



### Bayas

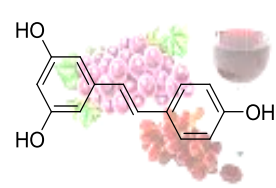


**Cerezas**



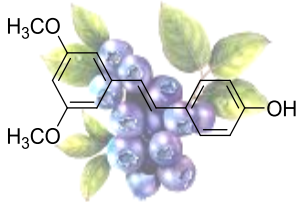
**Ácido all *trans*-retinoico**

**Uvas**



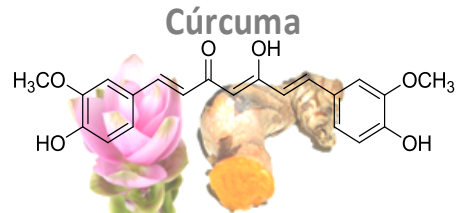
**Cianidina**

**Resveratrol**



**Pterostilbene**

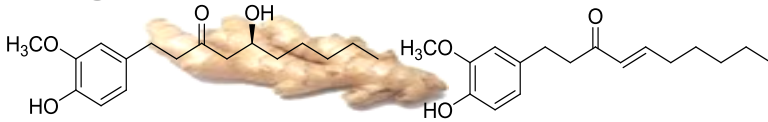
**Arándanos**



**Cúrcuma**

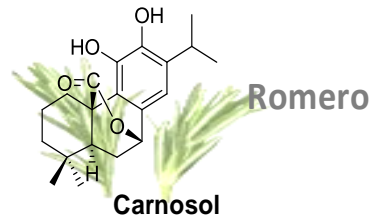
**Cúrcumina**

**Jengibre**



**[6]-Gingerol**

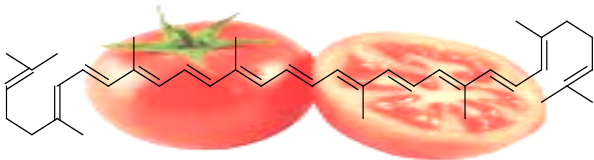
**[6]-Shogaol**



**Carnosol**

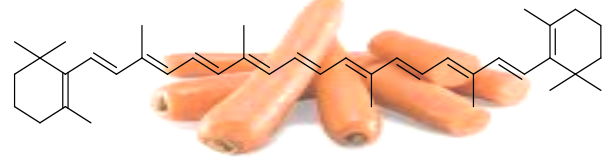
**Romero**

**Tomate**



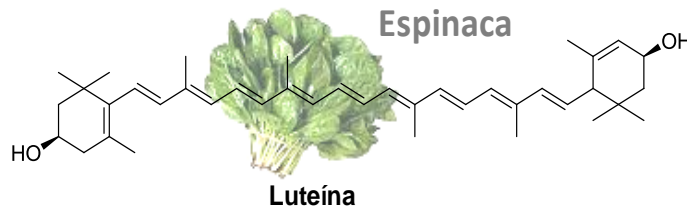
**Licopeno**

**Zanahoria**



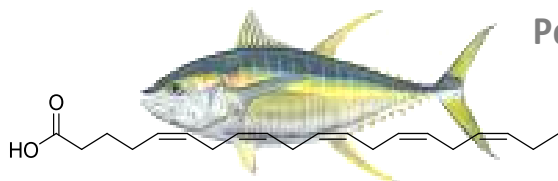
**β-Caroteno**

**Espinaca**

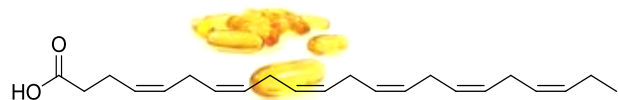


**Luteína**

**Pescado**



**Ácido eicosapentaenoico-EPA**



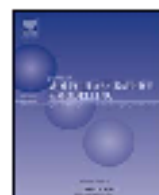
**Ácido docosahexaenoico-DHA**

# **ANEXO B**

**Artículo:**

**Potential interaction of natural dietary bioactive  
compounds with COX-2**

**Journal of Molecular Graphics and Modelling, Vol. 30  
(2011) 157–166**



## Potential interaction of natural dietary bioactive compounds with COX-2

Wilson Maldonado-Rojas, Jesus Olivero-Verbel\*

Environmental and Computational Chemistry Group, University of Cartagena, Cartagena, Colombia

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 24 February 2011

Received in revised form 3 July 2011

Accepted 5 July 2011

Available online 12 July 2011

#### Keywords:

Inflammation

Enzyme inhibition

Docking

Biological activity

### ABSTRACT

Bioactive natural products present in the diet play an important role in several biological processes, and many have been involved in the alleviation and control of inflammation-related diseases. These actions have been linked to both gene expression modulation of pro-inflammatory enzymes, such as cyclooxygenase 2 (COX-2), and to an action involving a direct inhibitory binding on this protein. In this study, several food-related compounds with known gene regulatory action on inflammation have been examined *in silico* as COX-2 ligands, utilizing AutoDock Vina, GOLD and Surflex-Dock (SYBYL) as docking protocols. Curcumin and all-trans retinoic acid presented the maximum absolute AutoDock Vina-derived binding affinities (9.3 kcal/mol), but genistein, apigenin, cyanidin, kaempferol, and docosa-hexaenoic acid, were close to this value. AutoDock Vina affinities and GOLD scores for several known COX-2 inhibitors significantly correlated with reported median inhibitory concentrations ( $R^2 = 0.462$ ,  $P < 0.001$  and  $R^2 = 0.238$ ,  $P = 0.029$ , respectively), supporting the computational reliability of the predictions made by our docking simulations. Moreover, docking analysis insinuate the synergistic action of curcumin on celecoxib-induced inhibition of COX-2 may occur allosterically, as this natural compound docks to a place different from the inhibitor binding site. These results suggest that the anti-inflammatory properties of some food-derived molecules could be the result of their direct binding capabilities to COX-2, and this process can be modeled using protein–ligand docking methodologies.

© 2011 Elsevier Inc. All rights reserved.

### 1. Introduction

Foods have small amounts of bioactive compounds that act as extra nutritional constituents [1]. The diversity of these chemicals is large and some of the most representative include flavonoids, isothiocyanates, proanthocyanidins, terpenoids, carotenoids, anthocyanins, and omega-3 polyunsaturated fatty acids, among many others [2]. The presence of these natural bioactive molecules in fruits and foods has been considered relevant, not only due to their unique organoleptic properties, but also because of their beneficial effects on human health, as demonstrated in numerous studies [3,4]. A recent review paper by Pan et al. [2], detailed how natural bioactive compounds exert their anti-inflammatory activities by modulating gene expression of diverse inflammation-related genes. However, it is also well known that some anti-inflammatory molecules carry out their action by directly inhibiting inflammatory proteins such cyclooxygenase 2 (COX-2) [5]. This enzyme catalyzes the first step in the synthesis of prostaglandins, thromboxanes and other eicosanoids in several inflammatory processes [6].

Although several natural products have been shown to modulate COX-2 expression [7–9], it is not clear if those are able to directly interact with the gene product or its modulating transcription factors. Computational chemistry offers the possibility to explore these interactions through protein–ligand docking procedures. Docking methods are valuable tools for drug development, and most current approaches assume a rigid receptor structure to allow virtual screening of large numbers of possible ligands and putative binding sites on a receptor molecule [10]. Among those tools used for this purpose are AutoDock Vina, GOLD and Surflex-Dock (SYBYL) [11–13]. Docking strategies generate binding or affinity scores for different sites and poses on targets, and the protein ‘hits’ identified by using this method can serve as potential candidates for experimental validation [14,15].

In this study, docking methodologies were used to test the ability of 29 natural bioactive compounds, isolated from different food sources, to bind COX-2. In addition, ligands known to bind COX-2 were submitted to docking protocols to establish relationships between their biological activity and the predicted binding affinities.

### 2. Materials and methods

#### 2.1. Protein and ligand structure preparation

Experimental coordinates of three COX-2 structures (PDB codes: 1CX2, 1PXX and 1CVU) were obtained from

\* Corresponding author at: Environmental and Computational Chemistry Group, Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of Cartagena, Campus of Zaragocilla, Cartagena, Colombia. Tel.: +57 5 6698179/6698180; fax: +57 5 6698323.

E-mail addresses: [jesusolivero@yahoo.com](mailto:jesusolivero@yahoo.com), [joliverov@unicartagena.edu.co](mailto:joliverov@unicartagena.edu.co) (J. Olivero-Verbel).

**Table 1**  
Examined natural products and their sources.

Compound	Dietary source	Reference
Apigenin	Celery	[20]
Tangeretin	Citrus peel	[21]
Silybinin	Milk thistle	[22]
Cyanidin	Cherries	[23]
Delphinidin	Dark fruits	[24]
Genistein	Soybean	[25]
Epicatechins and epigallocatechin-3-gallate	Green tea	[26]
Naringenin	Citrus peel	[27]
Quercetin and kaempferol	Broccoli	[28]
5-Hydroxy-3,6,7,8,3',4'- hexamethoxyflavone	Citrus peel	[29]
Curcumin	Turmeric powder and curry	[30,31]
Resveratrol	Grape skins and red wine	[32]
[6]-Gingerol and [6]-shogaol	Ginger	[33]
Carnosol	Rosemary	[34]
Flavonolignans	Blueberries	[35]
Benzyl isothiocyanate and phenethyl isothiocyanate	Cabbage	[36]
Sulforaphane	Cabbage	[37]
Proanthocyanidins	Berries	[38]
All- <i>trans</i> retinoic acid	Carrot, peppers and broccoli	[39,40]
Menthone	Mint	[41]
Lycopene and $\beta$ -carotene	Tomato and carrot	[42,43]
Lutein	Spinach and eggs	[44]
Docosahexaenoic acid and docosahexaenoic acid	Fish and fish oil	[45,46]

Protein Data Bank (PDB) [16] and prepared with SYBYL 8.1.1 package [17]. Anti-inflammatory natural products chosen to perform this study were those reported to modulate expression of genes related to inflammation [2]. All these chemicals are present in foods and vegetables (Table 1), and they have been proven to have good anti-inflammatory properties. Structures were drawn with SYBYL 8.1.1 package, exactly as presented by Pan et al. [2], and optimized using DFT at the B3LYP/6-31G level, and calculations were carried out with Gaussian 03 package program [18]. The resultant geometry was translated to Mol2 format with Open Babel [19]. To determine structural similarities between 1CX2, 1PXX and 1CVU, a molecular superposition was conducted using SYBYL 8.1.1 program.

## 2.2. Protein–ligand docking calculations

The feasibility of natural compounds to be ligands for COX-2 structures was evaluated using molecular docking. This was performed utilizing three different programs that rely on several distinct scoring functions to evaluate the performance of the protein–ligand docking: AutoDock Vina, Surflex-Dock (SYBYL) and GOLD program.

AutoDock Vina combines some advantages of knowledge-based potentials and empirical scoring functions: it extracts empirical information from both the conformational preferences of the receptor–ligand complex and from experimental affinity measurements. Ligands are ranked based on an energy scoring function and, to speed up the score calculation, a grid-based protein–ligand interaction is used [11]. The docking site for the ligands on 1CX2, 1PXX and 1CVU was defined by establishing a cube at the geometrical center of the native ligand present in each one of the evaluated PDB structures, with the dimensions  $24 \times 24 \times 24 \text{ \AA}$ , covering the ligand binding site with a grid point spacing of  $0.375 \text{ \AA}$ . The coordinates X, Y and Z for 1CX2 from center grid boxes were 25.374, 21.657 and 17.292; for 1PXX 27.058, 24.431 and 15.437, and finally for

1CVU 25.277, 22.358 and 40.308, respectively. Ten runs were performed per each ligand, and for each run the best pose was saved. Finally, the average binding affinity for best poses was accepted as the binding affinity value for a particular complex.

GOLD utilizes a score function called fitness to rank different binding modes. It comprises four terms: the protein–ligand hydrogen-bond score, the protein–ligand van der Waals score, the contribution to the fitness due to intramolecular hydrogen bonds in the ligand and the contribution due to intramolecular strain in the binding site using fitting points; and finally, it uses a search algorithm to explore possible binding modes [12]. The docking site was defined for each structure (1CX2, 1PXX and 1CVU) using the same coordinates X, Y and Z employed to localize the binding site with AutoDock Vina. A radius sphere of  $10 \text{ \AA}$  was defined around the geometrical center of the native ligand for each evaluated protein. For each independent algorithm run, a maximum number of 125,000 operations were performed. Operator weights for crossover, mutation, and migration were set in mode auto, the maximum distance between hydrogen donors and fitting points was set to  $3.0 \text{ \AA}$ , and non-bonded Van der Waals energies were cut-off at  $6.0 \text{ \AA}$ .

The Surflex-Dock module of SYBYL is a molecular docking unit that performs flexible alignments. Its results are presented as both docking accuracy and screening utility [13]. The docking procedure was started with the protomol generation. The protomol was created using a ligand-based approach (native ligand for each COX-2 structure). *Proto.threshold* was set to 0.5 and *proto.bloat* was left at 0 as a default parameter. For each protein–ligand pair, twenty top ranked docked solutions were saved and the Surflex-Dock score presented as the mean for these values.

These docking platforms were also used to calculate docking scores for COX-2 inhibitors, SC558 and diclofenac, as well as for the natural substrate arachidonic acid. These molecules were also obtained from PDB. All protein–ligand docking calculations conducted on COX-2 proteins were performed using the inhibitor binding site on the crystal structure (PDB: 1CX2 and 1PXX) or the substrate binding site (PDB: 1CVU). These binding sites are the same in these COX-2 structures. In all cases, affinities were reported as the mean value obtained for 10 docking runs performed per ligand.

## 2.3. Identification of residues interacting with the natural bioactive compounds on COX-2 binding site

The identification of protein residues that interact with the natural bioactive compounds having the greatest affinities was carried out using LigandScout 3.0 [47]. This program creates simplified pharmacophores to detect the number and type of primary existing ligand–residue interactions on the protein active site.

## 2.4. Docking validation with biological data for COX-2 inhibitors

The 2D structures and the biological data of 21 COX-2 inhibitors were obtained from the PubChem chemical library [48] and literature [49,50]. Docking procedures were performed with three docking tools: AutoDock Vina, GOLD and Surflex-Dock [11–13], following the same protocols previously described for studied natural products. The biological data consisted of median inhibitory concentrations ( $IC_{50}$ ), and the details of the testing protocols and materials are available on PubChem BioAssay [48]. The relationship between AutoDock Vina-calculated affinities of inhibitors on the three tested COX-2 (average values) and experimental activity data ( $\log IC_{50}$ ) was performed by linear correlation [51], using Graph Instat Software (Version 3.06, 2003).



## 2.5. Theoretical approach to study the synergistic effect between curcumin and celecoxib on COX-2

It has been reported that curcumin acts synergistically with celecoxib in the inhibition of prostaglandin E2 synthesis by COX-2 [52,53]. In order to gain insight in this process, we performed docking simulations on the whole COX-2 (3LN1) structure with both compounds. Aiming to evaluate if the curcumin shares the same binding site as celecoxib, a series of 500 AutoDock Vina docking runs were performed using the following docking parameters. The docking procedure on the 3LN1 structure was performed by establishing a cube with the dimensions  $60 \times 84 \times 72 \text{ \AA}$  covering the whole protein (Chain A), with a grid point spacing of  $1.0 \text{ \AA}$ , using as center of the grid box the protein itself.

## 3. Results and discussion

### 3.1. Structural similarities of COX-2 structures

The superpositioning of the 3D COX-2 structures (PDB: 1CX2, 1CVU and 1PXX) as well as the RMSD values for each pair of them are presented in Fig. 1. As can be seen, these three-dimensional structures of COX-2 have only minor differences (sequence identity > 99.5 and RMSD <  $0.507 \text{ \AA}$ ).

### 3.2. Docking calculations using AutoDock Vina, GOLD and SYBYL programs

The docking affinities of natural products for different COX-2, as calculated by three distinct docking programs are presented in Table 2. Results indicate that compared to the examined natural products, AutoDock Vina-calculated binding affinities for SC558, diclofenac (inhibitors) and arachidonic acid (substrate) were more consistent in terms of the magnitude of the expected predicted value, than the values generated for the scores calculated by GOLD and SYBYL. In the case of GOLD, the presence of the nitrogen seems to generate conflicting scores (negative values) for diclofenac, and high variability for binding scores obtained for the different COX-2 structures. SYBYL, on the other hand, also showed considerable variability for the scores obtained for the COX-2 structures. There-

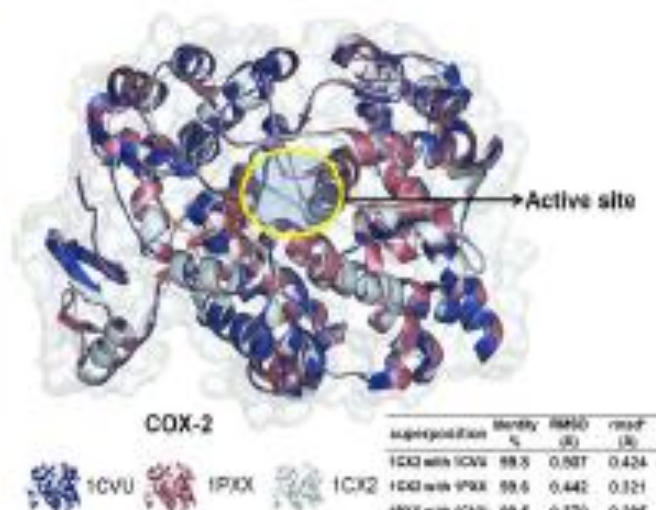


Fig. 1. 3D-Superposition of COX-2 structures (1CVU, 1PXX and 1CX2), showing sequence identity and RMSD values. \*RMSD for the binding site.

fore, successive calculations and discussions are referred solely to results provided by AutoDock Vina.

According to the AutoDock Vina-obtained affinity values (kcal/mol), several natural compounds are potential ligands for COX-2, with best scores obtained for PDB: 1CVU, including curcumin, all-trans retinoic acid (greatest docking scores, with identical mean absolute affinity value of  $9.3 \text{ kcal/mol}$ ), as well as genistein, apigenin, cyanidin, kaempferol and docosahexaenoic acid.

### 3.3. Interaction between residues in COX-2 and natural products

The complex COX-2 (PDB: 1CVU) with curcumin and all-trans retinoic acid, as well as the interactions between residues in the protein binding site and these ligands are shown in Fig. 2. Both ligands fit into the same binding site (Fig. 2A). The most important residues on the 1CVU-curcumin complex (Fig. 2B) are Met113, Val116, Ile345, Val340, Leu359, Leu384, Trp387, Phe518, Ala527, Val523, and Ser530. Most interactions are hydrophobic and

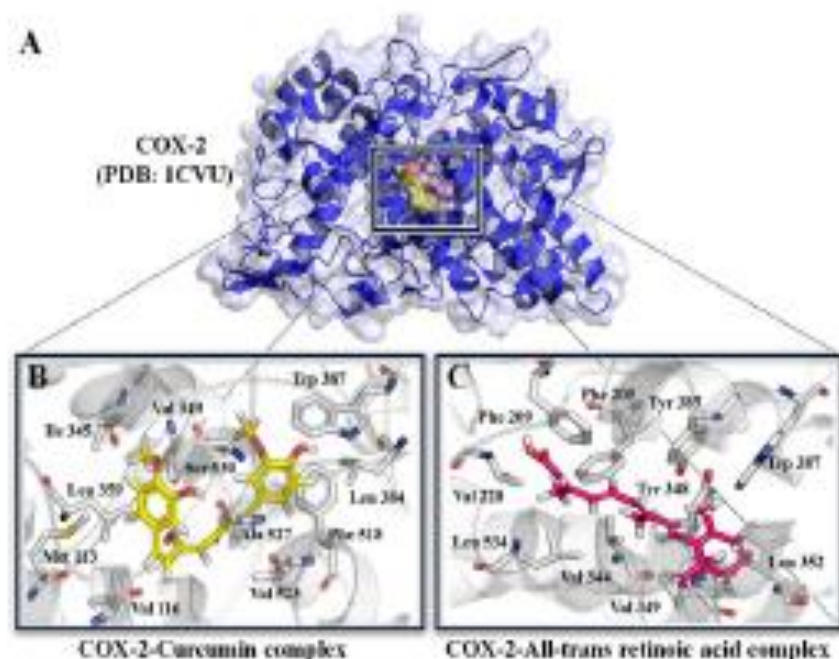


Fig. 2. 3D structure of COX-2(1CVU)-ligand complexes. (A) COX-2 bound to curcumin or all-trans retinoic acid (box). (B) Residues in the interaction COX-2-curcumin. (C) Residues in the interaction COX-2-all-trans retinoic acid.

**Table 2**  
Docking results for natural bioactive compound on three COX-2 structures.

Compound	Protein name: cyclooxygenase-2 (COX-2)								
	1CX2			1P9X			1CVU		
	AV <sup>a</sup> affinity (kcal/mol)	G fitness	S total score	AV affinity (kcal/mol)	G fitness	S total score	AV affinity (kcal/mol)	G fitness	S total score
Curcumin	-8.4	51.41	7.00	-8.7	52.18	5.44	-9.3	52.02	7.03
Silibinin	-7.8	25.33	4.07	-3.0	44.59	0.79	-7.8	37.70	3.37
Apigenin	-8.4	47.99	5.24	-8.6	49.48	4.96	-8.9	48.68	6.08
Genistein	-8.4	43.42	4.48	-9.1	49.05	5.13	-8.8	48.03	5.15
Naringenin	-8.3	50.78	6.04	-8.4	49.66	5.89	-8.6	47.11	5.43
[E]-Shogaol	-8.0	54.43	9.10	-7.6	49.73	8.24	-7.8	52.17	7.02
[E]-Gingerol	-8.0	55.73	7.54	-7.6	46.76	8.24	-7.7	55.00	7.89
Docosahexaenoic acid	-7.7	62.84	9.10	-7.5	60.62	9.57	-8.8	64.05	10.73
Cyanidin	-7.6	46.71	5.25	-8.1	49.41	3.24	-8.9	51.37	5.70
Quercetin	-7.6	46.78	5.84	-8.1	49.55	4.57	-8.8	47.97	6.23
Bowenitol	-7.6	45.19	5.11	-8.0	47.15	6.49	-8.0	46.02	5.31
Elecapentaenoic acid	-7.4	59.85	9.37	-7.5	58.10	8.98	-8.5	61.63	8.78
Tangeretin	-7.5	48.91	3.90	-7.7	65.16	6.82	-8.1	68.72	5.21
Epicatechin	-7.4	43.09	6.32	-8.5	47.23	5.19	-8.7	46.58	5.68
Kaempferol	-7.6	46.93	4.12	-7.9	48.48	3.85	-8.8	47.29	4.45
Delphinidin	-7.1	48.64	5.79	-8.1	49.77	3.84	-8.4	50.75	6.04
Pterostilbene	-6.9	49.10	6.94	-7.9	49.03	7.15	-8.2	48.09	6.79
All- <i>trans</i> retinoic acid	-7.2	36.84	5.08	-7.3	39.23	5.36	-9.3	46.28	6.90
Carosul	-6.8	17.40	2.81	-5.6	44.06	4.23	-8.1	48.73	5.56
Menthone	-6.3	29.56	3.30	-6.6	30.11	4.15	-6.6	29.62	4.03
Israxylthiocyanate	-5.9	39.73	2.83	-6.0	40.34	3.19	-6.1	39.02	2.95
Phenethylthiocyanate	-6.1	44.28	4.42	-6.1	41.84	3.48	-6.5	38.86	3.29
Epigallocatechin-3-gallate	-7.2	52.43	4.88	-6.7	54.01	3.26	-8.2	59.86	6.43
$\beta$ -carotene	-5.7	20.8	6.58	3.3	-103.52	5.60	-6.1	-21.11	6.66
Lycopene	-5.3	30.59	5.33	-5.6	31.64	3.30	-7.6	2.11	4.04
5-Hydroxy-3,5,7,8,4-hexamethoxyflavone	-6.1	48.27	8.33	-6.7	55.94	9.59	-7.9	49.00	8.06
Sulforaphane	-4.4	45.61	3.38	-4.7	42.94	4.04	-4.8	43.43	3.72
Lutrin	-3.9	31.69	4.99	3.6	-89.77	4.56	-5.6	-65.32	2.77
Proanthocyanidin B2	-1.8	-44.04	2.70	3.8	-48.54	-1.26	-4.5	-39.79	1.15
XCS8 (inhibitor)	-10.7	51.75	6.03	-10.0	45.21	5.59	-10.1	43.44	4.55
Diclofenac (inhibitor)	-8.0	-122.97	4.42	-8.6	-119.46	5.46	-8.8	-117.28	2.24
Arachidonic acid (substrate)	-8.0	59.70	8.64	-7.5	58.18	9.58	-7.8	66.83	10.81

<sup>a</sup> Docking scoring function values calculated for each protein: AV, AutoDock Vina; G, GOLD; S, Surflex-Dock (SYBYL).

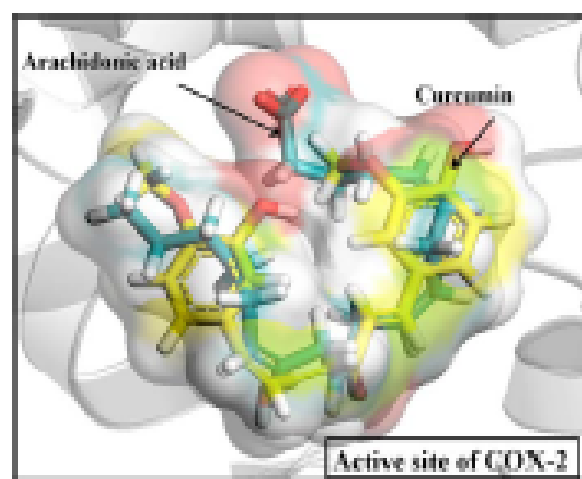
aromatic in nature, except for Ser 530, which interacts with curcumin through a hydrogen bond. For the 1CVU-all-*trans* retinoic acid complex (Fig. 2C), relevant aminoacids are Phe205, Phe209, Val228, Val344, Tyr348, Val349, Leu352, Tyr385, Trp387, and Leu534, showing only hydrophobic interactions with the ligand. Most of these residues have also been reported for chemicals having strong interactions with COX-2 [54,55].

The most favorable conformation resulted from the docking of curcumin into the active site of COX-2 is similar to that experimentally found for the COX-2 substrate arachidonic acid (Fig. 3). Accordingly, it is plausible to suggest that curcumin may be exerting its action by acting as a competitive inhibitor of arachidonic acid during prostaglandin E<sub>2</sub> synthesis by COX-2.

Among many natural products with known anti-inflammatory properties, curcumin is one of the most commonly referenced [56–59]. It is a phenolic yellow pigment present in curry powder, which has been associated with beneficial effects on human health as a result of its consumption in food [2]. It has been shown that curcumin exhibits antioxidant, anti-inflammatory and pro-apoptotic activities. Other food-related phenolic compounds with anti-inflammatory properties have also been reported in grapes, peanuts, blueberries, cranberries and red wine [60].

All-*trans* retinoic acid is a terpenoid derived from the mevalonate and isopentenyl pyrophosphate pathway [61]. This compound has been used for the treatment or alleviation of inflammatory diseases [62].

Other molecules that docked into COX-2 were genistein, apigenin, cyanidin and kaempferol. These are flavonoids commonly present in foods that have been used for the treatment of many dis-



**Fig. 3.** Docking conformation of curcumin and arachidonic acid (experimental) on the active site of COX-2 (1CVU).

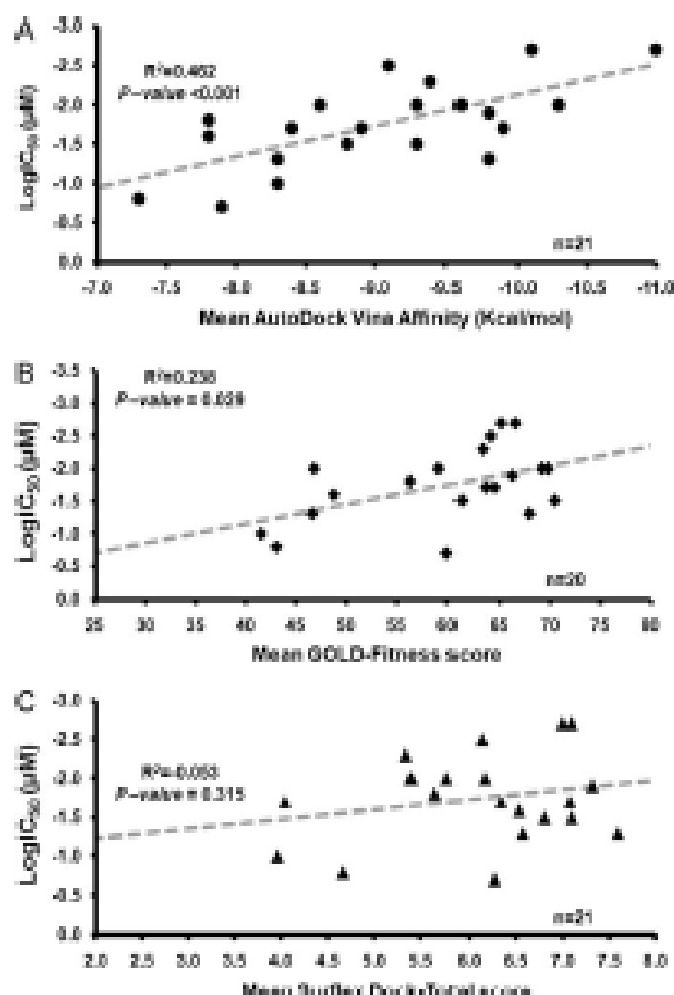
eases, mainly due to their anti-allergic, antiviral, anti-inflammatory and vasodilatory properties [63–67]. Similarly, docosahexaenoic acid has been reported to possess systemic anti-inflammatory effects and cardiovascular protection [68].

Although values obtained by docking analysis should be considered just as a theoretical approximation, this information could be useful to explore possible mechanisms by which these chemicals behave as anti-inflammatory compounds, in particular if those could directly bind proteins such as COX-2.



**Table 3**  
Calculated affinities (AutoDock Vina), binding scores values (GOLD and SYBYL) and median inhibitory concentrations [IC<sub>50</sub>] for selected COX-2 inhibitors.

COX-2 inhibitor	COX-2 structure													
	PDB:code: 1CX2			PDB:code: 1PXX			PDB:code: 1CVU			Mean AV values	Mean G values	Mean S values	IC <sub>50</sub> (μM)	Log IC <sub>50</sub> (μM)
	AV affinity (kcal/mol)	G fitness	S total score	AV affinity (kcal/mol)	G fitness	S total score	AV affinity (kcal/mol)	G fitness	S total score					
Valdecoxib (AID: 162347)	-9.5 ± 0.0	65.86 ± 0.02	4.80 ± 0.00	-8.5 ± 0.0	61.78 ± 0.02	4.62 ± 0.00	-10.0 ± 0.0	62.32 ± 0.02	6.60 ± 0.00	-9.4 ± 0.1	63.32 ± 0.34	5.34 ± 0.00	0.005	-2.3
Celecoxib (AID: 270014)	-10.8 ± 0.0	68.42 ± 0.02	6.63 ± 0.00	-9.7 ± 0.0	65.53 ± 0.06	8.14 ± 0.00	-9.8 ± 0.1	65.42 ± 0.08	6.52 ± 0.00	-10.1 ± 0.1	66.46 ± 0.26	7.10 ± 0.00	0.0022	-2.7
Meloxicam (AID: 162326)	-7.4 ± 0.1	35.65 ± 0.62	5.96 ± 0.00	-7.0 ± 0.0	38.51 ± 0.15	3.90 ± 0.00	-7.6 ± 0.0	54.82 ± 0.03	4.14 ± 0.00	-7.3 ± 0.1	42.99 ± 1.58	4.67 ± 0.00	0.16	-0.8
Roxicam (AID: 162326)	-8.3 ± 0.0	39.06 ± 0.04	3.54 ± 0.00	-8.0 ± 0.0	35.07 ± 0.24	3.80 ± 0.00	-8.5 ± 0.0	50.56 ± 0.16	4.55 ± 0.00	-8.3 ± 0.0	41.56 ± 1.22	3.96 ± 0.00	0.1	-1.0
Diclofenac (AID: 313125)	-8.0 ± 0.0	-122.97 ± 0.07	4.42 ± 0.00	-8.6 ± 0.0	-119.24 ± 0.24	5.46 ± 0.00	-8.8 ± 0.0	-117.28 ± 0.11	2.24 ± 0.00	-8.4 ± 0.1	-119.90 ± 0.11	4.04 ± 0.00	0.02	-1.7
Flosulide (AID: 162338)	-8.5 ± 0.0	67.40 ± 0.08	7.35 ± 0.00	-8.8 ± 0.0	63.56 ± 0.14	6.47 ± 0.00	-9.4 ± 0.0	62.38 ± 0.10	7.43 ± 0.00	-8.9 ± 0.1	64.45 ± 0.40	7.08 ± 0.00	0.021	-1.7
Tenidap (AID: 160880)	-8.4 ± 0.1	56.04 ± 0.15	6.47 ± 0.00	-8.3 ± 0.0	61.57 ± 0.08	4.20 ± 0.00	-9.1 ± 0.0	59.80 ± 0.10	5.56 ± 0.00	-8.6 ± 0.1	59.14 ± 0.43	5.41 ± 0.00	0.01	-2.0
Nimesulide (AID: 162655)	-7.6 ± 0.0	57.79 ± 0.10	6.77 ± 0.00	-7.6 ± 0.0	56.15 ± 0.13	5.28 ± 0.00	-8.2 ± 0.0	55.11 ± 0.24	4.92 ± 0.00	-7.8 ± 0.1	56.35 ± 0.22	5.66 ± 0.00	0.015	-1.8
Budolar (AID: 52141)	-7.2 ± 0.1	49.14 ± 0.23	7.09 ± 0.00	-7.9 ± 0.0	45.72 ± 0.13	6.05 ± 0.00	-8.3 ± 0.0	51.35 ± 0.08	6.24 ± 0.00	-7.8 ± 0.1	48.74 ± 0.44	6.53 ± 0.00	0.025	-1.6
Rofecoxib (AID: 241308)	-9.8 ± 0.0	63.40 ± 0.04	6.60 ± 0.00	-8.8 ± 0.0	60.60 ± 0.03	7.47 ± 0.00	-9.8 ± 0.0	59.57 ± 0.19	6.37 ± 0.00	-9.3 ± 0.1	61.20 ± 0.31	6.81 ± 0.00	0.032	-1.5
Dup 607 (AID: 162346)	-9.9 ± 0.2	73.47 ± 0.04	6.18 ± 0.00	-9.5 ± 0.0	69.63 ± 0.09	5.88 ± 0.00	-9.4 ± 0.0	66.28 ± 0.15	5.27 ± 0.00	-9.6 ± 0.1	69.80 ± 0.55	5.78 ± 0.00	0.01	-2.0
L-746337 (AID: 162346)	-9.3 ± 0.0	62.69 ± 0.18	6.92 ± 0.00	-10.9 ± 0.0	63.73 ± 0.03	6.19 ± 0.00	-9.6 ± 0.0	64.33 ± 0.08	5.90 ± 0.00	-9.9 ± 0.1	63.58 ± 0.14	6.34 ± 0.00	0.02	-1.7
SC558 Filirola [49]	-10.7 ± 0.2	51.75 ± 0.25	6.03 ± 0.00	-10.0 ± 0.1	45.21 ± 0.36	5.59 ± 0.00	-10.1 ± 0.2	43.44 ± 0.26	4.55 ± 0.00	-10.3 ± 0.1	46.80 ± 0.68	5.39 ± 0.00	0.0093	-2.0
NS 398 (AID: 46852)	-7.6 ± 0.0	60.55 ± 0.07	6.23 ± 0.00	-7.7 ± 0.0	57.99 ± 0.05	5.18 ± 0.00	-8.5 ± 0.0	59.26 ± 0.06	7.39 ± 0.00	-7.9 ± 0.1	59.93 ± 0.10	6.27 ± 0.00	0.19	-0.7
SC-58125 (AID: 162346)	-10.2 ± 0.2	69.83 ± 0.10	6.72 ± 0.00	-9.6 ± 0.2	67.76 ± 0.08	6.40 ± 0.00	-9.7 ± 0.0	66.09 ± 0.08	6.58 ± 0.00	-9.8 ± 0.1	67.89 ± 0.29	6.57 ± 0.00	0.05	-1.3
ClD: 10459826 (AID: 254745)	-7.0 ± 0.1	60.72 ± 0.64	6.28 ± 0.00	-7.3 ± 0.0	27.84 ± 1.31	7.27 ± 0.00	-10.6 ± 0.0	51.30 ± 0.41	9.24 ± 0.00	-8.3 ± 0.3	46.62 ± 2.61	7.60 ± 0.00	0.05	-1.3
ClD: 10895294 (AID: 162484)	-9.4 ± 0.0	73.59 ± 0.03	7.25 ± 0.00	-7.6 ± 0.0	69.78 ± 0.08	7.55 ± 0.00	-9.3 ± 0.0	68.08 ± 0.19	6.40 ± 0.00	-8.8 ± 0.2	70.48 ± 0.43	7.10 ± 0.00	0.034	-1.5
ClD: 9885354 (AID: 162507)	-10.6 ± 0.0	68.32 ± 0.03	7.40 ± 0.00	-9.4 ± 0.0	65.24 ± 0.06	8.29 ± 0.00	-9.3 ± 0.0	65.07 ± 0.12	6.23 ± 0.00	-9.8 ± 0.1	66.21 ± 0.28	7.32 ± 0.00	0.013	-1.9
2,3-Diarylcyclobutene methylsulfone Dewitt [50]	-9.4 ± 0.0	66.20 ± 0.03	6.64 ± 0.00	-8.7 ± 0.0	64.91 ± 0.09	5.34 ± 0.00	-9.2 ± 0.0	64.09 ± 0.06	6.45 ± 0.00	-9.1 ± 0.1	64.09 ± 0.17	6.14 ± 0.00	0.009	-2.5
2,3-Diaryltiazolotriazole methylsulfone Dewitt [50]	-11.0 ± 0.0	66.32 ± 0.05	6.80 ± 0.00	-10.7 ± 0.0	65.79 ± 0.03	7.27 ± 0.00	-11.4 ± 0.0	63.38 ± 0.09	6.93 ± 0.00	-11.0 ± 0.1	65.10 ± 0.24	7.00 ± 0.00	0.002	-2.7
2,3-Diaryltiazolotriazole methylsulfone Dewitt [50]	-8.9 ± 0.0	66.62 ± 0.03	7.23 ± 0.00	-9.3 ± 0.0	72.88 ± 0.06	6.42 ± 0.00	-9.5 ± 0.0	67.86 ± 0.07	4.86 ± 0.00	-9.3 ± 0.0	69.12 ± 0.50	6.17 ± 0.00	0.01	-2.0



**Fig. 4.** Correlation between docking theoretical data for inhibitors on COX-2 structures (1CX2, 1PXX and 1CVU) and their half maximal inhibitory concentration [ $\text{Log IC}_{50}$ ]. (A) AutoDock Vina, (B) GOLD and (C) Surflex-Dock. The regression line is shown for illustrative purposes. The GOLD score value for diclofenac ( $-113.59 \pm 0.11$ ) was not included in the analysis.

### 3.4. Relationship between biological activity of COX-2 inhibitors and protein–ligand docking data

In order to determine if affinity values calculated by AutoDock Vina, as well as the scores calculated by GOLD and Surflex-Dock, could be utilized as an indication of the likeliness of a compound to behave as a COX-2 inhibitor, a group of 21 active compounds with confirmed inhibition activity, reported in PubChem BioAssay database [48], were docked to COX-2 (PDB: 1CX2, 1PXX and 1CVU). The PubChem chemical structure identifier (CID), biological activity ( $\text{IC}_{50}$ ), AutoDock Vina affinity values, GOLD and Surflex-Dock scores for these compounds, and the biological activity ( $\text{Log IC}_{50}$ ) are shown in Table 3. The relationships between biological activity and docking data are presented in Fig. 4. Results suggest that for all examined docking tools, COX-2 activity follows a linear relationship only with binding affinity (AutoDock Vina) and the docking scores from GOLD, being highly significant with the first one. Although the magnitude of the correlation was moderate ( $R^2 = 0.462$ ,  $P < 0.001$ ), this value is similar to that obtained for other docking studies [60].

Moreover, data showed that ligands with absolute affinities greater than 10 kcal/mol have a better chance of interaction with COX-2. For instance, celecoxib, SC558, and 2,3-diarylphenyl sulfonamide have absolute affinity values greater than 10 kcal/mol and low  $\text{IC}_{50}$ s. However, molecules with absolute affinities values around 9 kcal/mol have also a good probability of acting as COX-2 inhibitors. This is reassured when biological data is revised

for our food-derived COX-2 inhibitors that presented best affinity values. Median inhibitory concentrations ( $\text{IC}_{50}$ ) tested in different cell lines for curcumin (range 2–15  $\mu\text{M}$ ) [70–75], all-trans retinoic acid (20.5  $\mu\text{M}$ ) [76], genistein (range: <15–200  $\mu\text{M}$ ) [77–79], apigenin (range: 8.04–50  $\mu\text{M}$ ) [77,80], cyanidin (range: 40–90  $\mu\text{M}$ ) [81,82], kaempferol (range: <15–50  $\mu\text{M}$ ) [77,80], docosahexaenoic acid (range: 9.8–30  $\mu\text{M}$ ) [83,84], naringenin ( $7.9 \pm 1.9 \mu\text{M}$ ) [85], [6]-shogaolol (2.1  $\mu\text{M}$ ) [86], resveratrol (range: 3.06  $\mu\text{M}$ ) [87], eicosapentaenoic acid (7.1  $\mu\text{M}$ ) [83] are supporting evidence that these compounds can modulate COX-2 activity not only at mRNA but also at the protein level.

### 3.5. Docking curcumin and celecoxib on COX-2

It is known that some of the chemicals studied here can modulate COX-2 activity not only by competitive inhibition, but also by allosteric binding [52,53]. It has been shown that curcumin produces a synergistic effect with celecoxib, a highly selective COX-2 inhibitor, almost abolishing all enzyme activity [52,53]. In order to determine if this additive process occurs due to curcumin (both the keto and the enol forms) binding on a site different from that used by celecoxib, a series of 500 AutoDock Vina docking runs were performed on the protein isolated from the complex COX-2–celecoxib (PDB: 3LN1), and the results are presented in Fig. 5. Celecoxib docks onto COX-2 (PDB: 3LN1) on two different sites (Fig. 5A). As expected, the most favorable was the active site of COX-2 (binding frequency, bf, 96.8%) (Fig. 5B), as found in the crystal structure of the celecoxib:COX-2 complex (PDB: 3LN1). An additional site (bf, 3.2%) was detected by the docking simulations, but it is less energetically favorable ( $-8.8$  kcal/mol vs.  $-11.2$  kcal/mol). On the other hand, in addition to the active site (celecoxib site), curcumin in the keto form prefers two additional (allosteric) sites on COX-2 (Fig. 5C) with binding frequencies of 38.6% and 38.2% (Fig. 5D). A different trend is observed for the enol form of curcumin. This form does not dock on the active site at all when the whole protein (3LN1) is used as docking surface (Fig. 5E), and it docks mainly to site 2 (bf, 94.12%), and in a minor grade to site 3 (bf, 5.88%) (Fig. 5F); however these interactions are less favorable than those detected for the keto form.

It is important to keep in mind that results from docking the keto and enol forms of curcumin on the whole protein surface (3LN1) are different from those acquired when the enol form is docked directly into the active site of 1CX2, 1PXX and 1CVU. In these last cases, the absolute binding affinities were greater by approximately 1–2 kcal/mol. The docking of the keto form of curcumin onto the active site of COX-2 generates not only different affinity values depending on the site, but also distinct spatial orientations. These last changes could require additional docking energy and this could be a reason explaining why this curcumin form prefers the other binding sites, where the docking implies less inner molecular consumption.

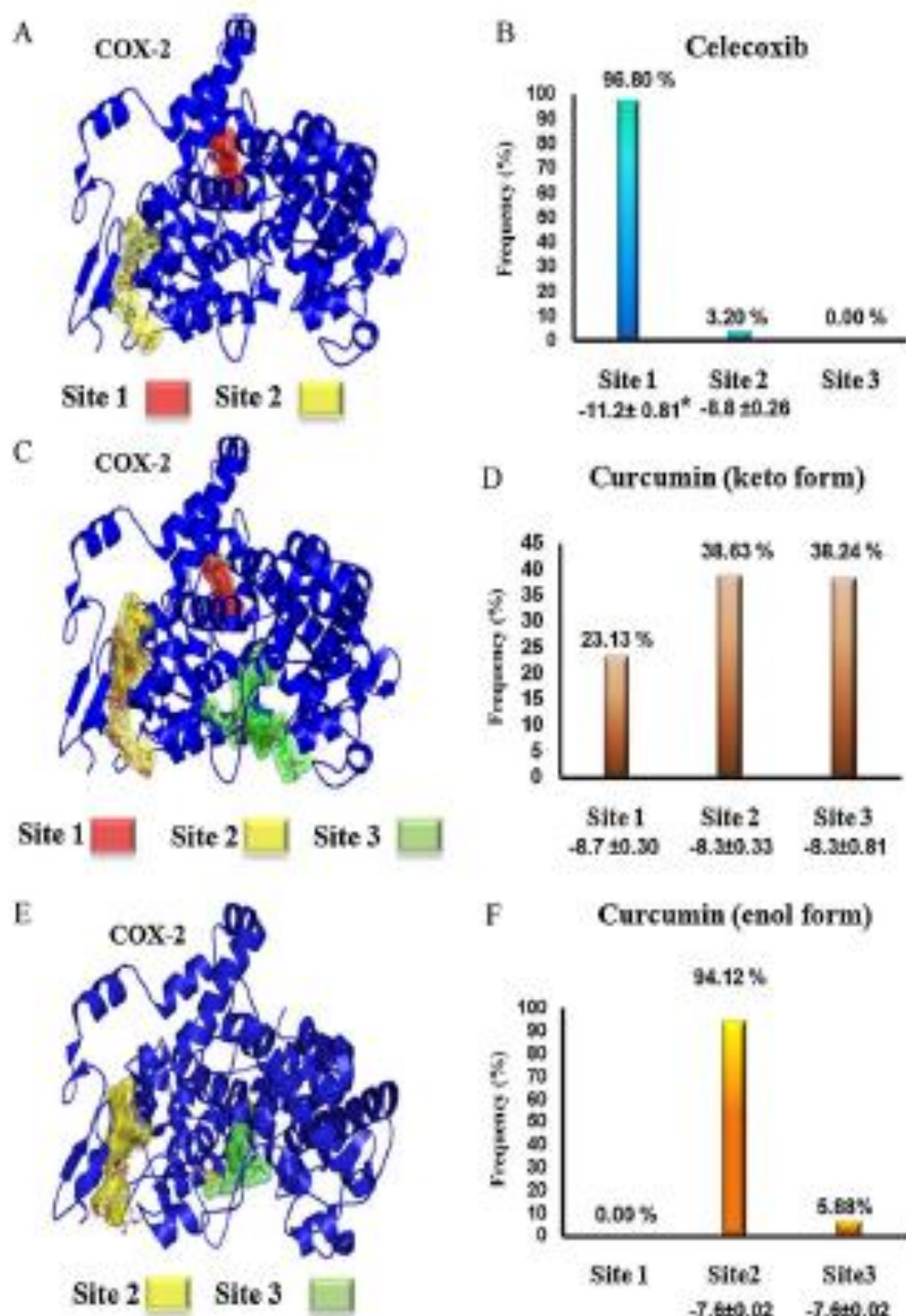
Docking runs ( $n = 100$ ) for celecoxib and the two curcumin forms, performed using the three docking tools examined in this work, on the three binding sites predicted for curcumin (keto form, PubChem) using AutoDock Vina are shown in Table 4. Results showed that AutoDock Vina, GOLD and Surflex-Dock predicted that celecoxib prefers only the known inhibitor binding site (Site 1). In the case of curcumin, all three docking tools suggested that both forms of this natural product can at some point interact with any of the three binding sites. However, there are minor changes in the preferences based on the curcumin form and the docking tool used. Taken together, these results suggest that independent from the tautomeric state of curcumin, it has the ability to interact with COX-2 on a binding site different from celecoxib.

This *in silico* evaluation of curcumin binding on COX-2 offers a plausible explanation for the synergism observed for celecoxib and

**Table 4**  
Binding affinity (AutoDock Vina) and binding score values (GOLD and Surflex-Dock) for curcumin (keto and enol forms) and celecoxib (inhibitor) on different predicted binding sites (1, 2, and 3) on COX-2.

Compound	Site 1			Site 2			Site 3		
	AV (kcal/mol)	G fitness	S total score	AV (kcal/mol)	G fitness	S total score	AV (kcal/mol)	G fitness	S total score
Celecoxib	-11.9 ± 0.1	68.54 ± 0.02	9.50 ± 0.00	-9.0 ± 0.0	61.04 ± 0.13	6.05 ± 0.00	-7.2 ± 0.0	60.87 ± 0.14	4.53 ± 0.00
Curcumin (keto)	-8.4 ± 0.0	56.51 ± 0.26	6.71 ± 0.00	-8.8 ± 0.0	52.58 ± 0.12	7.24 ± 0.00	-8.0 ± 0.0	52.64 ± 0.14	8.75 ± 0.00
Curcumin (enol)	-8.6 ± 0.2	48.29 ± 0.29	7.40 ± 0.00	-8.7 ± 0.0	51.57 ± 0.12	9.58 ± 0.00	-8.3 ± 0.0	51.52 ± 0.12	7.40 ± 0.00

AV, AutoDock Vina; G, GOLD; S, Surflex-Dock (SYBYL).



**Fig. 5.** Celecoxib (A) and curcumin (keto, C; enol E) binding sites on COX-2, and ligand binding site preferences for each one of them (B, D, and F, respectively). \*The affinity values (mean ± standard deviation, n = 500) in kcal/mol obtained for each protein–ligand complex are shown in below sites.

curcumin to inhibit the action of the enzyme. It also showed that the size of the used docking grid can have profound differences in the results. However, it was clear that for both keto and enol forms, a binding site different from the active site is preferred by curcumin, although this process is less energetically favorable.

Although the mechanisms involved in the anti-inflammatory action of chemicals present in edible plants may comprise distinct pathways, some of the compounds examined here are known for their actions on the regulation of transcription factors such as nuclear factor-kappa B (NF $\kappa$ B) [88,89], signal transducers and activators of transcription-1 (STAT-1) [90], peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR $\gamma$ ) [91], NF-E2-related factor-2 (Nrf2) [92], and also in the inhibition of mitogen-activated protein kinase (MAPK) (ERK, JNK, and p38) phosphorylation [93], among many other targets. These mechanisms may indeed alter the expression of COX-2. However, as shown here, it may be equally important to consider their direct action at the protein level, in order to have a better knowledge of their pharmacological benefits. In addition, it is clear that computational chemistry is a powerful tool that speeds up and lowers the cost of those approaches leading to find therapeutic agents to promote human health.

#### 4. Conclusion

In silico docking calculations performed with AutoDock Vina showed that binding affinities obtained for some natural compounds on COX-2, such as curcumin and all-trans retinoic acid, are of similar magnitude than those generated for known inhibitors of this protein. Affinities from AutoDock Vina and scores given by the docking software GOLD showed significant correlations with experimental data for COX-2 inhibition. Docking studies performed with curcumin and celecoxib, this last a synthetic inhibitor of COX-2, suggest that curcumin may be able to bind this protein both competitively and allosterically. Therefore, natural products present in the diet are important not only as transcriptional regulators of COX-2, but also they may modulate its enzyme activity to control inflammatory processes.

#### Acknowledgements

The authors wish to thank Colciencias, Bogotá (Colombia), and the University of Cartagena, Cartagena (Colombia) for their financial support (Grant 110745921616, 2009); as well as the program to support research groups, sponsored by the Vice-Rectoría for research of the University of Cartagena (2009–2011).

#### References

- [1] D.D. Kitts, Bioactive substances in food: identification and potential uses, *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 72 (1994) 423–434.
- [2] M.H. Pan, C.S. Lai, S. Dushenkov, C.T. Ho, Modulation of inflammatory genes by natural dietary bioactive compounds, *J. Agric. Food Chem.* 57 (2009) 4467–4467.
- [3] L. Bohls, U. Göransson, C. Alenmark, C. Wedin, A. Backlund, Natural products in modern life science, *Phytochem. Rev.* 9 (2010) 279–301.
- [4] C.L. Sherr, J.K. Yeh, J. Cao, J.S. Wang, Green tea and bone metabolism, *Nutr. Rev.* 29 (2009) 437–456.
- [5] A.K. Chakraborti, S.K. Garg, R. Kumar, H.P. Motiwala, P.S. Jadhava, Progress in COX-2 inhibitors: a journey so far, *Cur. Med. Chem.* 17 (2010) 1563–1593.
- [6] J.R. Kiefer, J.L. Pasell, K.T. Moreland, R.A. Stegman, W.F. Hood, J.R. Gierse, A.M. Stevens, D.C. Goodwin, S.W. Rowlinson, L.J. Marmitt, W.C. Stallings, R.G. Kurumbail, Structural insights into the stereochemistry of the cyclooxygenase reaction, *Nature* 405 (2000) 57–101.
- [7] R. Wilens, M.S. Yerra, M.B. Wang, E.S. Srivastava, Curcumin: a review of anti-cancer properties and therapeutic activity in head & neck squamous cell carcinoma, *Mol. Cancer* 10 (2011) 12.
- [8] G. Franca, A.M. Parico, F. Bonina, E. Messina, L. Ricca, G. Musumeci, P. Rappasarda, V. Cardile, Involvement of inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 in the anti-inflammatory effects of a red orange extract in human chondrocytes, *Nat. Prod. Res.* 24 (2010) 1469–1480.

- [9] M. Jin, S.J. Suh, J.H. Yang, Y. Lu, S.J. Kim, S. Ewon, T.H. Jo, J.W. Kim, Y.I. Park, G.W. Ahn, C.R. Lee, C.H. Kim, J.K. Son, K.H. Son, H.W. Chung, Anti-inflammatory activity of bark of *Dioscorea delavayi* DCNE through the inhibition of iNOS and COX-2 expressions in RAW264.7 cells via NF- $\kappa$ B and ERK1/2 inactivation, *Food Chem. Toxicol.* 48 (2010) 3073–3079.
- [10] A. May, M. Zacharias, Accounting for global protein deformability during protein-protein and protein-ligand docking, *BBA Protein Proteomics* 1754 (2005) 225–231.
- [11] O. Trott, A.J. Olson, AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization and multithreading, *J. Comput. Chem.* 31 (2010) 455–461.
- [12] M.L. Verdonk, J.C. Cole, M.J. Hartshorn, C.W. Murray, R.D. Taylor, Improved protein-ligand docking using GOLD, *Protein: Struct. Funct. Gen.* 52 (2003) 609–623.
- [13] A.N. Jain, Surflex-Dock 2.1: robust performance from ligand energetic modeling, ring flexibility, and knowledge-based search, *J. Comput. Aided Mol. Des.* 21 (2007) 281–306.
- [14] Y. Tang, W. Zhu, K. Chen, H. Jiang, New technologies in computer-aided drug design: toward target identification and new chemical entity discovery, *Drug Discov. Today Techn.* 3 (2006) 307–313.
- [15] M. Ubainong, T.T. Talley, P.W. Taylor, A.J. Olson, O. Vajragupta, Virtual screening against alpha-cobalamin, *J. Biomed. Screen.* 14 (2009) 1109–1118.
- [16] RCSB PDB Protein Data Bank | Home, <http://www.pdb.org/pdb/home/home.do>.
- [17] SYBYL Molecular Modeling Software, Version 8.1, Tripos, St. Louis, MO, USA, 2007.
- [18] M.J. Frisch, G.W. Trucks, H.B. Schlegel, G.E. Scuseria, M.A. Robb, J.R. Cheeseman Jr., J.A. Montgomery, T. Vreven, K.N. Kudin, J.C. Burant, J.M. Millam, S.S. Iyengar, J. Tomasi, V. Barone, B. Mennucci, M. Cossi, G. Scalmani, N. Rega, G.A. Petersson, H. Nakatsuji, M. Hada, M. Ehara, K. Toyota, R. Fukuda, J. Hasegawa, M. Ishida, T. Nakajima, Y. Honda, O. Kitao, H. Nakai, M. Klene, X. Li, J.E. Knox, H.P. Hratchian, J.B. Cross, V. Bakken, C. Adamo, J. Jaramillo, R. Gomperts, R.E. Stratmann, O. Yazyev, A.J. Austin, E. Cammi, C. Pomelli, J.W. Ochterski, P.Y. Ayala, K. Morokuma, G.A. Voth, P. Salvador, J.J. Dannenberg, V.G. Zakrzewski, S. Dapprich, A.D. Daniels, M.C. Strain, O. Farkas, O.D. Malick, A.D. Rabuck, K. Raghavachari, J.B. Foresman, J.V. Ortiz, Q. Cui, A.G. Baboul, S. Clifford, J. Cioslowski, B.B. Stefanow, G. Liu, A. Liashenko, P. Piskorz, I. Komaromi, R.L. Martin, D.J. Fox, T. Keith, M.A. Al-Lahiani, C.Y. Peng, A. Nanayakkara, M. Challacombe, P.M.W. Gill, B. Johnson, W. Chen, M.W. Wong, C. Gonzalez, J.A. Pople, Gaussian03, Gaussian, Inc., Pittsburgh, PA, USA, 2003.
- [19] R. Guha, M.T. Howard, G.R. Hutchison, P. Murray-Rust, H. Røpke, C. Steinbeck, J.K. Wiegner, E. Willighagen, The blue obelisk—interoperability in chemical informatics, *J. Chem. Inf. Model.* 46 (2006) 991–998.
- [20] Y. Yao, W. Sang, M. Zhou, G. Ren, Phenolic composition and antioxidant activities of 11 celery cultivars, *J. Food Sci.* 75 (2010) 9–13.
- [21] W. Shantz, T. Prapromkul, S. Hongpibsong, H.K. Binsakul, Polymethoxylated flavones, flavanone glycosides, carotenoids, and antioxidants in different cultivation types of tangerines (*Citrus reticulata* Blanco cv. Satrupung) from Northern Thailand, *J. Agric. Food Chem.* 58 (2010) 6069–6074.
- [22] L. Abenavoli, R. Capasso, N. Mile, F. Capasso, Milk thistle in liver diseases: past, present, future, *Phytother. Res.* 24 (2010) 1423–1432.
- [23] A. Sarić, S. Sobocanec, T. Balog, B. Rudić, V. Sverko, V. Dragović-Urošić, B. Levač, Z. Cović, Z.M. Satrić, T. Marotti, Improved antioxidant and anti-inflammatory potential in mice consuming sour cherry juice (*Prunus cerasus* cv. Maraska), *Plant Foods Hum. Nutr.* 64 (2009) 221–227.
- [24] S.D. Castellari, G. Di Gasparo, Transcriptional control of anthocyanin biosynthetic genes in extreme phenotypes for berry pigmentation of naturally occurring grapevines, *BMC Plant Biol.* 10 (2007) 7–46.
- [25] G. Rinaldi, S. Russolati, S.E. Santini, F. Grasselli, The impact of the phytoestrogen genistein on rat mammary gland cell function, *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr. (Berl.)* 94 (2010) 374–382.
- [26] P. Wang, W.J. Aronson, M. Huang, Y. Zhang, R.P. Lee, D. Heber, S.M. Henning, Green tea polyphenols and metabolites in prostatic tissue: implications for cancer prevention, *Cancer Prev. Res.* 3 (2010) 985–993.
- [27] L.T. Lim, H.S. Yeh, W.T. Su, Effect of adding extracted hesperetin, naringenin and pectin on egg cholesterol, serum lipids and antioxidant activity in laying hens, *Arch. Anim. Nutr.* 62 (2008) 33–43.
- [28] H.R. Vasanthi, S. Mukherjee, D.K. Das, Potential health benefits of broccoli—a chemico-biological overview, *Mini Rev. Med. Chem.* 9 (2009) 749–753.
- [29] C.S. Lai, S. Li, C.Y. Chai, C.Y. Lo, C.T. Ho, Y.J. Wang, M.H. Pan, Inhibitory effect of citrus 5-hydroxy-3,6,7,8,2',4'-hexamethoxyflavone on 12-O-tetradecanoylphorbol 13-acetate-induced skin inflammation and tumor promotion in mice, *Carcinogenesis* 28 (2007) 2581–2588.
- [30] S. Kaur, N.H. Modib, D. Pandey, N. Roy, Probing the binding site of curcumin in *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis* Pae—a structural insight to unveil antibacterial activity of curcumin, *Eur. J. Med. Chem.* 45 (2010) 4209–4214.
- [31] A. Rayidi, A.R. Rahman, K. Jalani, A. Lelo, Effect of different curcumin dosages on human gall bladder, *Asia Pac. J. Clin. Nutr.* 11 (2002) 314–318.
- [32] H. Kalantari, D.K. Das, Physiological effects of resveratrol, *BioFactors* 35 (2010) 401–406.
- [33] C.J. Wong, C.F. Wu, H.W. Huang, C.T. Ho, G.C. Yen, Anti-invasion effects of 6-shogaol and 6-gingerol, two active components in ginger, on human hepatocarcinoma cells, *Mol. Nutr. Food Res.* 54 (2010) 1618–1627.
- [34] W.A. Bernardes, R. Lucarini, M.G. Tonoff, M.G. Souza, M.L. Andrade Silva, A.A. da Silva Filho, C.H. Martins, A.E. Miller Grotti, P.M. Pauletti, M. Groppo, W.R. Cunha, Antimicrobial activity of *Bacillus subtilis* against oral pathogens: relevance of carboxylic acid and carnosol, *Chem. Biodivers.* 7 (2010) 1825–1840.

- [35] J.A. Aloni, D.E. McDonald, J.S. Schneider, A.R. Privette, D.W. McFadden, Pterostilbene inhibits breast cancer in vitro through mitochondrial depolarization and induction of caspase-dependent apoptosis, *J. Surg. Res.* 161 (2010) 195–201.
- [36] J.M. Viswanji, S.J. Duthie, L. Friis, D.G. Thompson, P.J. Padfield, Dietary isothiocyanates inhibit Caco-2 cell proliferation and induce G2/M phase cell cycle arrest, DNA damage, and G2/M checkpoint activation, *J. Nutr.* 134 (2004) 3123–3126.
- [37] K. Skupinska, I. Misiewicz-Kozminska, K. Lubelka, T. Kasprzycka-Gutman, The effect of isothiocyanates on CYP1A1 and CYP1A2 activities induced by polycyclic aromatic hydrocarbons in MCF7 cells, *Toxicol. In Vitro* 23 (2009) 763–771.
- [38] E.A. Dabiel, K. Patel, C. Neto, K. Gottschall-Pass, E.A. Harts, Proanthocyanidins from the American cranberry (*Vaccinium macrocarpon*) inhibit matrix metalloproteinase-2 and matrix metalloproteinase-9 activity in human prostate cancer cells via alterations in multiple cellular signaling pathways, *J. Cell. Biochem.* 111 (2010) 742–754.
- [39] M. Theodoridou, V. Laudel, M. Schubert, From carrot to clinic: an overview of the retinoic acid signaling pathway, *Cell. Mol. Life Sci.* 67 (2010) 1423–1445.
- [40] G.L. Ambrosini, N.H. de Klerk, L. Fribschi, D. Mackerras, B. Musk, Fruit, vegetable, vitamin A intakes, and prostate cancer risk, *Prostate Cancer Prostatic Dis.* 11 (2008) 61–66.
- [41] S.A. Muhammad, S. Muhammad, A. Waqar, F. Masood, Y. Raghav, Chlorinated monoterpene ketone, acylated  $\beta$ -sitosterol glycosides and a flavanone glycoside from *Mentha longifolia* (Lamiaceae), *Phytochemistry* 59 (2002) 889–895.
- [42] J.T. Vogel, D.M. Tierman, C.A. Sims, A.Z. Delabast, D.G. Clark, H.J. Kim, Carotenoid content impacts flavor acceptability in tomato (*Solanum lycopersicum*), *J. Sci. Food Agric.* 90 (2010) 2233–2240.
- [43] F.A. Thümann, J. Steffen, C. Zwersmann, C.P. Arltbacher, W. Cohn, G. Wendt, W. Schulz, Plasma concentration response to drinks containing beta-carotene as carrot juice or formulated as a water dispersible powder, *Eur. J. Nutr.* 41 (2002) 228–235.
- [44] B.L. Burns-Whitmore, E.H. Haddad, J. Sabuti, K. Jacinto-Siegl, J. Tarzman, S. Rajaram, Effect of n-3 fatty acid enriched eggs and organic eggs on serum lipids in free-living lacto-ovo vegetarians, *Eur. J. Clin. Nutr.* 64 (2010) 1332–1337.
- [45] J.D. Mills, J.E. Bates, C.L. Sedney, R. Hutchins, B. Sears, Omega-3 fatty acid supplementation and reduction of traumatic axonal injury in a rodent head injury model, *J. Neurosurg.* 114 (2010) 77–84.
- [46] N.J. Mann, S.L. O'Connell, K.M. Baldwin, I. Singh, R.J. Meyer, Effects of anal oil and tuna-fish oil on platelet parameters and plasma lipid levels in healthy subjects, *Lipids* 45 (2010) 689–691.
- [47] G. Wöller, T. Langst, LigandScout: 3-D pharmacophores derived from protein-bound ligands and their use as virtual screening filters, *J. Chem. Inf. Model.* 45 (2005) 160–169.
- [48] PubChem, <http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>.
- [49] M. Filizola, J.J. Perez, A. Palomar, D. Marzulin, Comparative molecular modeling study of the three-dimensional structures of prostaglandin endoperoxide H2 synthase 1 and 2 (COX-1 and COX-2), *J. Mol. Graph. Model.* 15 (1997) 299–300.
- [50] D.L. Dewitt, Cox-2-selective inhibitors: the new super aspirin, *Mol. Pharm.* 55 (1999) 625–631.
- [51] Z. Zhou, Y. Wang, S.H. Bryant, Computational analysis of the cathepsin B inhibitors activities through 18-MMPBSA binding affinity calculation based on docked complex, *J. Comput. Chem.* 30 (2009) 2165–2175.
- [52] S. Lev-Ari, L. Strier, D. Karamov, L. Madar-Shapiro, H. Dvory-Sobel, I. Pinchuk, B. Marjan, D. Lichtenberg, N. Arber, Celecoxib and curcumin synergistically inhibit the growth of colorectal cancer cells, *Clin. Cancer Res.* 11 (2005) 6738–6744.
- [53] S. Lev-Ari, L. Strier, D. Karamov, O. Elkayam, D. Lichtenberg, D. Caspi, N. Arber, Curcumin synergistically potentiates the growth-inhibitory and pro-apoptotic effects of celecoxib in osteoarthritis synovial adherent cells, *Rheumatology* 45 (2006) 171–177.
- [54] C. Selvan, S.M. Jachak, E. Thilagavathi, A.K. Chakraborti, Design, synthesis, biological evaluation and molecular docking of curcumin analogues as antioxidant, cyclooxygenase inhibitory and anti-inflammatory agents, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 15 (2005) 1739–1737.
- [55] K.E. Rouse, D.A. Prati, N.A. Porter, T.P. Lybrand, Molecular dynamics simulations of arachidonic acid complex with COX-1 and COX-2: insights into equilibrium behavior, *Biochemistry* 45 (2006) 3189–3195.
- [56] S.J. Wu, K.W. Tam, Y.H. Tsai, C.C. Chang, J.C. Chao, Curcumin and saikosaponin a inhibit chemical-induced liver inflammation and fibrosis in rats, *Am. J. Chin. Med.* 38 (2010) 99–111.
- [57] E. Sikora, G. Scapagnini, M. Barbagallo, Curcumin, inflammation, ageing and age-related diseases, *Immun. Ageing* 7 (2010) 1.
- [58] S.J. Moghaddam, P. Barta, S.G. Mirabolghinas, Z. Ammar-Aouchiche, N.T. Garza, T.T. Vu, E.A. Newman, B.B. Aggarwal, C.M. Evans, M.J. Timm, R. Lotan, B.E. Dickory, Curcumin inhibits COPD-like airway inflammation and lung cancer progression in mice, *Carcinogenesis* 30 (2009) 1949–1956.
- [59] J.S. Jurenska, Anti-inflammatory properties of curcumin, a major constituent of *Curcuma longa*: a review of preclinical and clinical research, *Altern. Med. Rev.* 14 (2009) 141–153.
- [60] G. Galati, O. Salazar, J.X. Wilson, P.J. O'Brien, Prooxidant activity and cellular effects of the phenoxyl radicals of dietary flavonoids and other polyphenolics, *Toxicology* 177 (2002) 91–104.
- [61] T. Akhisa, E. Yasukawa, M. Yamana, M. Uchiya, Y. Kimura, N. Shimizu, A. Koichi, Triterpene alcohol and steroid saponins from rice bran and their anti-inflammatory effects, *J. Agric. Food Chem.* 48 (2000) 2313–2319.
- [62] K. Leslawski, K. Okuchida, K. Mizumoto, C. Mahido, M. Tanaka, All-trans retinoic acid inhibits the cell proliferation but enhances the cell invasion through up-regulation of c-met in pancreatic cancer cells, *Cancer Lett.* 234 (2005) 303–310.
- [63] R.R. Li, L.L. Fang, Q. Du, Y. Shi, W.J. Dai, K.S. Yu, Apigenin inhibits allergen-induced airway inflammation and switches immune response in a murine model of asthma, *Immunopharmacol. Immunotoxicol.* 32 (2010) 364–370.
- [64] E.M. Vela, K.A. Knostman, J.M. Mott, R.L. Warren, J.N. Garver, L.J. Vela, R.L. Stammen, Genistein, a general kinase inhibitor, as a potential antiviral for arenaviral hemorrhagic fever as described in the Pital virus-Syrian golden hamster model, *Antiviral Res.* 87 (2010) 318–328.
- [65] E.A. Watkins, E. Hanson, M. Ferruzzi, Y. Li, Dietary PUFA and flavonoids as deterrents for environmental pollutants, *J. Nutr. Biochem.* 18 (2007) 196–205.
- [66] V. Calderone, S. Chericoni, C. Martinelli, L. Testai, A. Nardi, I. Morelli, M.C. Brnchi, E. Martinotti, Vasorelaxing effects of flavonoids: investigation on the possible involvement of potassium channels, *Nahrung Schmeldeberg Arch. Pharmacol.* 370 (2004) 290–298.
- [67] K.M. Lee, K.W. Lee, S.K. Jung, E.J. Lee, Y.S. Heo, A.M. Bode, R.A. Lubet, H.J. Lee, Z. Dong, Kaempferol inhibits UVB-induced COX-2 expression by suppressing Src kinase activity, *Biochem. Pharmacol.* 80 (2010) 2042–2049.
- [68] M. Masuro, A. Habbu, L. Lubrano, S. Del Turco, G. Lucarini, T. Bourcier, B.B. Weksler, R. De Caterina, The omega-3 fatty acid docosahexaenoate attenuates endothelial cyclooxygenase-2 induction through both NAD(P)H oxidase and PKC $\alpha$  inhibition, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103 (2006) 15184–15189.
- [69] A.A. Hani, I. Leng, S. Gandawati, X. Du, Z. Courina, E. Buzala, W.L. Jørgensen, Optimization of N-benzyloxy-oxazol-2-one as receptor antagonists of macrophage migration inhibitory factor (MIF), *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 20 (2010) 5811–5814.
- [70] A.M. Gonzalez, E.A. Orlando, Curcumin and resveratrol inhibit nuclear factor-kappaB-mediated cytokine expression in adipocytes, *Nutr. Metab.* 5 (2008) 17.
- [71] S. Lev-Ari, Y. Maimon, L. Strier, D. Karamov, N. Arber, Down-regulation of prostaglandin E2 by curcumin is correlated with inhibition of cell growth and induction of apoptosis in human colon carcinoma cell lines, *J. Soc. Integr. Oncol.* 4 (2006) 21–26.
- [72] B. Du, L. Jiang, Q. Xia, L. Zhong, Synergistic inhibitory effects of curcumin and 5-fluorouracil on the growth of the human colon cancer cell line HT-29, *Chemotherapy* 52 (2006) 23–28.
- [73] S. Lev-Ari, A. Starr, A. Vroder, V. Karamov, V. Loew, J. Greif, E. Perig, D. Adirka, E. Ben-Yosef, Inhibition of pancreatic and lung adenocarcinoma cell survival by curcumin is associated with increased apoptosis, down-regulation of COX-2 and EGFR and inhibition of Erk1/2 activity, *Anticancer Res.* 26 (2006) 4423–4430.
- [74] S. Gahner, S.K. Lee, M. Casadei, S. Barthelemy, L. Vergnes, S. Labidielle, R.G. Mehta, C.W. Boone, J.M. Pezzuto, Biologic evaluation of curcumin and structural derivatives in cancer chemoprevention model systems, *Phytochemistry* 65 (2004) 2849–2859.
- [75] J. Hong, M. Bost, J. Ju, J.H. Ryu, X. Chen, S. Sang, M.J. Lee, C.S. Yang, Modulation of arachidonic acid metabolism by curcumin and related  $\beta$ -diketone derivatives: effects on cytosolic phospholipase A2, cyclooxygenases and 5-lipoxygenase, *Carcinogenesis* 25 (2004) 1671–1679.
- [76] B.H. Kim, K.S. Kang, Y.S. Lee, Effect of retinoids on LPS-induced COX-2 expression and COX-2 associated PGE2 release from mouse peritoneal macrophages and TNF- $\alpha$  release from rat peripheral blood mononuclear cells, *Toxicol. Lett.* 150 (2004) 191–201.
- [77] Y.C. Liang, Y.T. Huang, S.H. Tsai, S.Y. Lin-Shiau, C.F. Chen, J.K. Lin, Suppression of inducible cyclooxygenase and inducible nitric oxide synthase by apigenin and related flavonoids in mouse macrophages, *Carcinogenesis* 20 (1999) 1945–1952.
- [78] V.P. Dila, M.A. Berhow, E. Gonzalez de Mejia, Bowman-birk inhibitor and genistein among soy compounds that synergistically inhibit nitric oxide and prostaglandin E2 pathways in lipopolysaccharide-induced macrophages, *J. Agric. Food Chem.* 56 (2008) 11707–11717.
- [79] F. Ye, J. Wu, T. Duan, J. Yi, X. Tong, D. Zhang, Inhibition of cyclooxygenase-2 activity in head and neck cancer cells by genistein, *Cancer Lett.* 211 (2004) 39–46.
- [80] Y.C. Liang, S.H. Tsai, D.C. Tsai, S.Y. Lin-Shiau, J.K. Lin, Suppression of inducible cyclooxygenase and nitric oxide synthase through activation of peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$  by flavonoids in mouse macrophages, *FASEB Lett.* 486 (2001) 13–18.
- [81] H. Wang, M.G. Nair, G.M. Strasburg, Y.C. Chang, A.M. Booren, J.I. Gray, D.L. DeWitt, Antioxidant and anti-inflammatory activities of anthocyanins and their aglycons, cyanidin, from tart cherries, *J. Nat. Prod.* 62 (1999) 294–296.
- [82] N.P. Seeram, Y. Zhang, M.G. Nair, Inhibition of proliferation of human cancer cells and cyclooxygenase enzymes by anthocyanidins and catechins, *Nutr. Cancer* 46 (2003) 101–106.
- [83] T. Ringborn, U. Huan, A. Stenholm, S. Rock, L. Skattebøl, P. Perera, L. Bohlin, COX-2 inhibitory effects of naturally occurring and modified fatty acids, *J. Nat. Prod.* 64 (2001) 745–749.
- [84] G. Cabriello, F. Di Nicuolo, S. Cragnoli, E. Piccioni, S. Serini, N. Muggiano, G. Tringali, P. Navarra, F.D. Ranellietti, P. Palanca, n-3 PUFA reduce VEGF

- expression in human colon cancer cells modulating the COX-2/PGE2 induced ERK-1 and -2 and HIF-1 $\alpha$  induction pathway , *Carcinogenesis* 25 (2004) 2303–2310.
- [85] Y. Takano-Ishikawa, M. Gozsa, K. Yamaki, Structure-activity relations of inhibitory effects of various flavonoids on lipopolysaccharide-induced prostaglandin E2 production in rat peritoneal macrophages: comparison between subclasses of flavonoids , *Phytotherapy* 13 (2008) 310–317.
- [86] E. Tjendraputra, V.H. Tran, D. Blu-Brennan, B.D. Boufogalis, C.C. Duke, Effect of ginger constituents and synthetic analogues on cyclooxygenase-2 enzyme in intact cells , *Bioorg. Chem.* 29 (2001) 156–163.
- [87] H. Cao, R. Yu, Y. Tao, D. Nikolic, R.B. van Breemen, Measurement of cyclooxygenase inhibition using liquid chromatography–tandem mass spectrometry , *J. Pharm. Biomed. Anal.* 54 (2011) 230–235.
- [88] Y.J. Suh, K.S. Chan, H.H. Chu, S.S. Han, Y.S. Kwon, K.K. Park, S.S. Lee, Molecular mechanisms underlying chemopreventive activities of anti-inflammatory phytochemicals: down-regulation of COX-2 and iNOS through suppression of NF- $\kappa$ B activation , *Mutat. Res.* 480–481 (2001) 243–258.
- [89] L. Kole, B. Giri, S.K. Manna, B. Pal, S. Ghosh, Biochanin-A, an isoflavon, showed anti-proliferative and anti-inflammatory activities through the inhibition of iNOS expression, p38-MAPK and Akt-3 phosphorylation and blocking NF- $\kappa$ B nuclear translocation , *Eur. J. Pharmacol.* 653 (2011) 8–15.
- [90] E.Y. Chung, B.H. Kim, J.T. Hong, C.K. Lee, B. Ahn, S.Y. Nam, S.B. Han, Y. Kim, Resveratrol down-regulates interferon- $\gamma$ -inducible inflammatory genes in macrophages: molecular mechanism via decreased STAT-1 activation , *J. Nutr. Biochem.* (2010), doi:10.1016/j.jnutbio.2010.07.012.
- [91] H.M. Wang, Y.X. Zhao, S. Zhang, G.D. Liu, W.Y. Kang, H.D. Tang, J.Q. Ding, S.D. Chen, PPAR $\gamma$  agonist curcumin reduces the amyloid- $\beta$ -stimulated inflammatory responses in primary astrocytes , *J. Alzheimer Dis.* 30 (2010) 1189–1199.
- [92] R. Garg, S. Gupta, G.B. Manu, Dietary curcumin modulates transcriptional regulators of phase I and phase II enzymes in benzo(a)pyrene-treated mice: mechanism of its anti-initiating action , *Carcinogenesis* 29 (2008) 1022–1032.
- [93] J. Ahn, H. Lee, S. Kim, T. Ha, Curcumin-induced suppression of adipogenic differentiation is accompanied by activation of Wnt/ $\beta$ -catenin signaling , *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 298 (2010) 1510–1518.

# **ANEXO C**

**Artículo:**

**Searching of Protein Targets for Alpha Lipoic Acid**

**Journal of the Brazilian Chemical Society, Vol. 22, No.  
12, 2250-2259, 2011.**

## Searching of Protein Targets for Alpha Lipoic Acid

Wilson Maldonado-Rojas, Jesus Olivero-Verbel\* and Carlos Ortega-Zuñiga

Environmental and Computational Chemistry Group, Faculty of Pharmaceutical Sciences,  
University of Cartagena, Campus of Zaragocilla, Cartagena, Colombia

Ácido alfa lipoico (ALA) é um dos oxidantes mais poderosos e um cofator em complexos enzimáticos, apesar de seus mecanismos ainda não serem conhecidos. A pesquisa por alvos proteicos de ALA é fundamental para compreender seus processos de sinalização. Uma abordagem bioinformática foi usada a fim de se encontrar alvos hipotéticos para ALA usando o servidor *Target Fishing Dock* (TarFisDock). Contagens de afinidade para os melhores resultados foram calculadas pelo *AutoDock Vina*. Alvos relevantes incluíram leucotrieno A4 hidrolase, canal de potássio voltagem-dependente, alfa-hidroxiesteróide desidrogenase, epóxido hidrolase, proteínas estas envolvidas no câncer, diabetes, desordens neurológica e cardiovascular. As energias de interação corrigidas segundo padrão *counterpoise* foram calculadas para proteínas que ligam *R*-ALA, e mostraram interações *R*-ALA-resíduos favoráveis. A sobreposição de *R*-ALA com inibidores conhecidos daquelas proteínas, permitiu concluir que *R*-ALA adota diferentes conformações espaciais em seus sítios de ligação, podendo ser um inibidor fraco plausível destes alvos e, portanto, este efeito deveria ser considerado quando da realização de estudos sobre seus efeitos bioquímicos.

Alpha lipoic acid (ALA) is one of the most powerful antioxidants and a cofactor in enzyme complexes, although its mechanisms are still unknown. The search for protein targets of ALA is fundamental to understand its signaling pathways. A bioinformatics approach was used to find hypothetical targets for ALA using the Target Fishing Dock Server (TarFisDock). Affinity scores for the best hits were calculated by AutoDock Vina. Relevant targets included leukotriene A4 hydrolase, voltage gated potassium channel, alpha hydroxysteroid dehydrogenase and epoxide hydrolase, proteins involved in cancer, diabetes, and neurological and cardiovascular disorders. The counterpoise-corrected interaction energies calculated for proteins that bind *R*-ALA showed favorable interactions *R*-ALA-residues. Superpositioning of *R*-ALA with known inhibitors of those proteins, together with the finding that *R*-ALA adopts different spatial conformations in their binding sites, suggests *R*-ALA could be a plausible weak inhibitor of these targets, and this effect should be considered when studying its biochemical effects.

**Keywords:** antioxidant, cofactor, inhibitor, docking, TarFisDock, AutoDock Vina

## Introduction

The alpha lipoic acid (ALA) is a relatively small molecule, a five-carbon carboxylic acid bound to a five-atom cyclic disulfide. It has two enantiomeric configurations (*R*-ALA and *S*-ALA) and its reduced form is known as dihydrolipoic acid (DHLA)<sup>1</sup> (Figure 1). ALA was previously considered as a vitamin, but later it was shown to be synthesized by animals and humans, primarily in the liver and kidneys, where it is found at higher concentrations.<sup>2,3</sup> *R*-ALA naturally occurs in foods, covalently bound to lysine (lipoyllysine),<sup>4</sup> although quantitative information

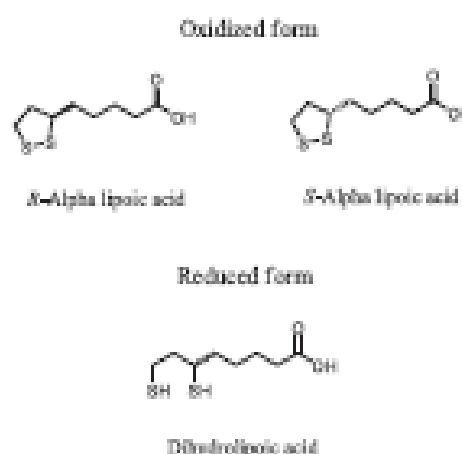


Figure 1. Existing forms of alpha lipoic acid.

\*e-mail: jolivero@unicartagena.edu.co



about such adducts is limited. Tissues from animals that are rich in lipoyllysine (ca.  $1.3 \mu\text{g g}^{-1}$  dry wt.) include the kidney, heart and liver, while among vegetables, it is found in spinach and broccoli. A small amount of lipoyllysine (ca.  $0.5 \mu\text{g g}^{-1}$  dry wt.) has also been measured in tomatoes, peas and brussels sprouts.<sup>36</sup>

ALA is an antioxidant for fatty acids. It is considered an important metabolite for energy production in mitochondria, and it also serves as a potent free radical scavenger in both aqueous and lipophilic media.<sup>7,10</sup> This compound is used as a drug in many European countries, mainly to treat liver disorders and neuropathies.<sup>11</sup> Lipoate, or its reduced form, dihydrolipoate, reacts with reactive oxygen species such as superoxide radicals, hydroxyl radicals, hypochlorous acid, peroxy radicals and singlet oxygen.<sup>12,13</sup> In general, antioxidant properties of ALA have been related to its capacity to reduce reactive oxygen species (ROS), regenerate endogenous antioxidants, repair oxidative tissue damage and to its chelating capacity.<sup>14-16</sup>

The antioxidant properties of ALA vary depending on the species: the oxidized form is antioxidant, chelating agent for Fe and Cu, and it can remove ROS. Its reduced form is antioxidant and a Cd-chelating drug. It can also remove ROS, regenerate vitamins C, E and glutathione; and increase levels of proteins involved in repair ( $\alpha$ -1-antiprotease).<sup>14</sup> Dihydrolipoic acid (DHLA) can increase the activity of antioxidants in both aqueous and hydrophobic membrane phases.<sup>17-19</sup>

*In vitro* experiments have demonstrated that ALA increases glucose uptake by promoting translocation of the glucose transporter GLUT4 to the cell membrane, and this property has been used during alleviation of diseases such as diabetes.<sup>20-22</sup> The biochemical importance of ALA is mainly represented by its participation as a cofactor in several biological processes, and due to its antiapoptotic action via activation of the insulin receptor/PI3-kinase/Akt pathway.<sup>23</sup>

Nowadays, *in silico* screening has made possible to find suitable biological targets for particular compounds. Target Fishing Dock (TarFisDock) is a web server that docks small molecules with protein structures in the Potential Drug Target Database (PDTD), as a tool to discover new drug targets. It works performing reverse molecular docking. This process allows docking a particular compound into known binding pockets of proteins found in the PDTD. This server has been used to predict protein binding sites for chemicals such as vitamin E and 4H-tamoxifen. Experimental evidence has shown that nearly 50% of the predicted proteins can in fact bind these compounds, indicating the reliability of this server tool.<sup>24</sup> This tool has been used to identify molecular targets for developing

new drugs against *Helicobacter pylori*, and also as a complementary approach of functional genomics.<sup>25</sup> In another study, Olivero *et al.*,<sup>26</sup> have used TarFisDock to find possible target proteins for TCDD, in particular those related to AhR-independent activities of TCDD. However, in addition to TarFisDock, there are other available approaches to perform multiple target identification.<sup>27</sup>

In this paper, TarFisDock server has been used to perform virtual screening of molecular targets for ALA, with proper validation of this prediction with different methods of computational chemistry, discussing the possible role of this compound in diseases for which these proteins are important.

## Experimental

### Molecular modeling

For the present study *R*-ALA, *S*-ALA and DHLA structures were optimized using density functional theory (DFT) at the B3LYP/6-31G level. Calculations were carried out with Gaussian 03 package program.<sup>28</sup> The resultant geometry was translated to Mol2 format with Open Babel<sup>29</sup> and the optimized ALA structures were submitted to TarFisDock<sup>24</sup> to find proteins with tri-dimensional structures having theoretical binding sites for each one of the studied species. The search started using the "targets in all categories" option, and ligand docking was performed on all proteins (1207 proteins currently available) present in PDTD. The output consisted of the best hits ranked by an energy score, providing binding conformations and a table with related target information.

### Docking validation

As AutoDock Vina can detect protein cavities for ligand binding on any given protein, it was used to find cavities on randomly selected proteins taken from Protein Data Bank.<sup>30</sup> Randomly selected protein models 1ABI, 1CA2, 1CAI, 1DFR, 1FDH, 1LCT, 1LFH, 1RHG, 2DHF, 2HHM, 2PAB, 2W9I, 2XAI, 3AIF, 3GPD, 3GRC, 3LHM, 4HVP, 4IIB and 8FAB were docked to *R*-ALA using AutoDock Vina, and the output affinities were utilized to determine a theoretical value for non-specific affinities for *R*-ALA.

### Docking ALA structures to target proteins predicted by TarFisDock

*R*-ALA, *S*-ALA and DHLA were docked on each one of the target proteins predicted by TarFisDock, after preparing them using Sybyl 8.1 program.<sup>31</sup> For protein preparation,

all hydrogens were added using the Biopolymer module of Sybyl package, and inhibitors within the active site, heteroatoms, and all water molecules were removed. Proteins were minimized applying Kollman's all partial atomic charges, Powell's conjugate gradient method with distance-dependent dielectric constant value of 1.0, and a gradient convergence value of  $0.001 \text{ kcal mol}^{-1}$ .<sup>32</sup> Once minimized, the protein is loaded in MGLTools<sup>33</sup> creating a PDBQT file that contains a protein structure with hydrogens in all polar residues, and it is then used by the docking program AutoDock Vina 1.0<sup>34</sup> to obtain the affinity binding values for a particular ligand. The docking site for ALA structures on protein targets was defined by establishing a cube with the dimensions  $24 \times 24 \times 24 \text{ \AA}$ , covering the binding site predicted for TarFisDock with a grid spacing of  $0.375 \text{ \AA}$  centered on the center of mass of the ligand. Ten runs with AutoDock Vina were performed in all cases *per* each ALA structure, and for each run the best pose was saved. The average affinity for best poses was taken as the final affinity value for a particular complex. Mammal proteins that showed greater affinity scores for ALA were checked with the program LigandScout 2.0<sup>35</sup> to detect those primary interactions prevailing in the protein-ALA complex. LigandScout is a software tool that allows to rapidly and transparently derive 3D chemical feature-based pharmacophores from structural data of macromolecule-ligand complexes. Its algorithms perform a stepwise interpretation of the ligand molecules: planar ring detection, assignment of functional group patterns, determination of the hybridization state, and finally the assignment of Kekulé pattern.<sup>36</sup>

#### Counterpoise-corrected interaction energy (CP-CIE) calculations

In order to evaluate the theoretical likeliness of residues present in the protein binding site being interacting with *R*-ALA, CP-CIE calculations were performed. The protein-*R*-ALA complexes for the mammalian proteins selected by TarFisDock were processed by AutoDock Vina. From these complexes, one was randomly selected *per* target protein, and then minimized using the standard Tripos molecular mechanics (MM) force field of the SYBYL molecular modeling package, following a Powell energy minimization algorithm, applying Gasteiger-Hückel charges and  $0.005 \text{ kcal mol}^{-1} \text{ \AA}^{-1}$  energy gradient convergence criterion.<sup>37,38</sup> Following this optimization, molecular dynamics (MD) simulations were performed in vacuo using SYBYL 8.1 force field.<sup>39</sup> The protocol included (i) a 5000 fs period, beginning at 0 to 300 K, as a heating protocol, (ii) a 10000 fs period at 300 K was employed for

equilibration and (iii) 20000 fs at 300 K were used in the simulations with a time step of 1 fs.<sup>40</sup>

After these simulations were concluded, the affinities of *R*-ALA for the protein in each one of the final complexes obtained under MM and MD protocols were calculated,<sup>41</sup> and the geometry and affinities of these complexes were compared to that given by the structure directly obtained from TarFisDock server.

The relative binding contribution of different residues in the binding site, as predicted by LigandScout 2.0,<sup>35</sup> was evaluated calculating CP-CIE values,<sup>42</sup> computed from single-point calculations. This was performed on the structures of the protein-*R*-ALA complexes with the best AutoDock Vina-calculated ligand affinities, following the "Boys and Bernardi" method,<sup>43</sup> according to equation 1:

$$\Delta E(AB)^{CP} = E_{AB}^{AB}(AB) - E_A^{AB}(A) - E_B^{AB}(B) \quad (1)$$

where,  $\Delta E(AB)^{CP}$  is CP-CIE, and  $E_{AB}^{AB}(AB)$ ,  $E_A^{AB}(A)$  and  $E_B^{AB}(B)$  are the total energies computed in a balanced basis set (AB) for complex, residue and ligand (*R*-ALA) systems,<sup>44,45</sup> respectively, in order to correct the basis set superposition error (BSSE).

Known inhibitors for TarFisDock-predicted *R*-ALA-binding proteins were found in PubChem and DrugBank, and their affinity scores to such molecules were calculated using AutoDock Vina 1.0. The binding site was set specifically at the site proposed by the TarFisDock server. Similar docking parameters and run number employed for ALA structures were also used for the affinity calculations of inhibitors on target proteins. In order to determine if the docking of *R*-ALA on target proteins takes place under the same ligand conformation, a superposition of the 3D structures of *R*-ALA docked on the binding sites, together with the optimized *R*-ALA structure as a template, was performed using Sybyl 8.1.1, and visualized by Pymol.<sup>46</sup> For comparison purposes, CP-CIE values for protein-*R*-ALA complexes were compared to those obtained for the leukotriene A4 hydrolase (LHS6) bound to its inhibitor, bestatin, structure that was taken from Protein Data Bank (PDB).

## Results and Discussion

TarFisDock server was used to find target proteins for *R*-ALA, and AutoDock Vina allowed the calculation of affinity scores for ALA-protein complexes. Based on affinity data provided by AutoDock Vina, non-specific binding of *R*-ALA to randomly selected proteins from PDB occurs at absolute affinity values lower than  $5.1 \text{ kcal mol}^{-1}$  (Figure 2). Accordingly, from the best 25 hits suggested by the TarFisDock server as *R*-ALA protein targets, affinities for

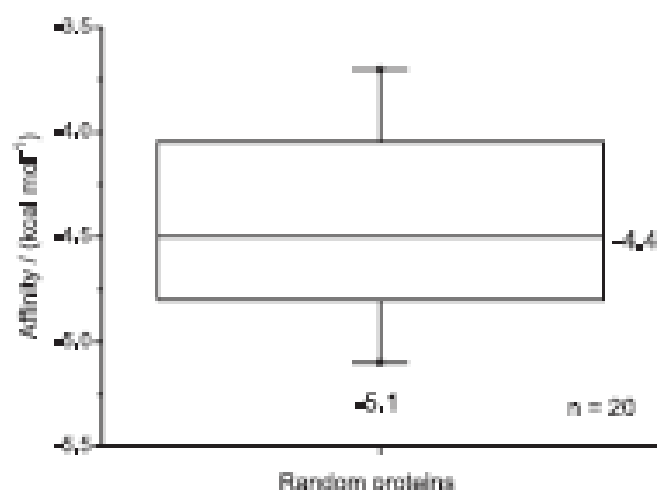


Figure 2. Box-and-whisker diagram showing the affinity of *R*-ALA for twenty randomly selected proteins from PDB.

those with values greater than the maximum ( $5.1 \text{ kcal mol}^{-1}$ ) plus its 10% (0.5), that is  $5.6 \text{ kcal mol}^{-1}$ , in addition to data obtained for *S*-ALA and DHLA on the same proteins, are shown in Table 1.

Virtual screening of protein targets for ALA showed that, at least hypothetically, this antioxidant could interact with different enzymes such as hydrolases, isomerases, ATPases, oxidases and DNA topoisomerases, among others. In addition, *R*-ALA has indeed similar affinities than *S*-ALA for target proteins, although when the disulfide cycle is broken, as in DHLA, the affinity scores drop significantly (Table 1). Accordingly, it is plausible to think that only the oxidized form of *R*-ALA is more prone to act as a pharmacological agent targeting several proteins.

Some of the proteins predicted to bind ALA are found in mammals (*Mus musculus*, *Homo sapiens*, *Oryctolagus cunicular* and *Bos Taurus*) and those represent important pharmacological targets such as leukotriene A4 hydrolase, voltage gated potassium channel, alpha hydroxysteroid dehydrogenase and epoxide hydrolase.

The ligand binding sites for the mammal proteins mentioned before, as well as the interactions between their residues and *R*-ALA in the docking complex, as identified by LigandScout 2.0, are shown in Figure 3. The

Table 1. TarFisDock-predicted proteins that interact with *R*-, *S*-ALA and DHLA

Protein	PDB code (Organism source)	<i>R</i> -ALA		<i>S</i> -ALA		DHLA	
		ES (THD)	Affinity / ( $\text{kcal mol}^{-1}$ ) <sup>a</sup>	ES (THD)	Affinity / ( $\text{kcal mol}^{-1}$ )	ES (THD)	Affinity / ( $\text{kcal mol}^{-1}$ )
D-xylase isomerase	1D1D ( <i>Arthrobacter</i> sp)	-30.14	-5.4	-27.78	-5.4	-29.89	-4.7
Aldehyde oxidoreductase	1VLB ( <i>Deinoflavobrio gigas</i> )	-29.40	-6.2	-28.06	-6.2	-28.43	-5.5
Tryptophan synthase alpha chain	1K3U ( <i>Salin. typhimuriana</i> )	-27.68	-6.2	-	-	-28.61	-5.4
Epoxide hydrolase	1CQZ ( <i>Mus musculus</i> )	-27.03	-6.1	-25.25	-6.1	-	-
Leukotriene A4 hydrolase	1HS6 ( <i>Homo sapiens</i> )	-26.86	-6.6	-26.28	-6.7	-27.13	-5.8
DNA topoisomerase II	1PVG ( <i>Sacch. cerevisiae</i> )	-26.44	-5.7	-	-	-	-
Fab fragment of monoclonal antibody D63	1D8M ( <i>Mus musculus</i> )	-25.96	-6.1	-26.56	-5.9	-26.37	-5.3
Voltage gated potassium channel	1ZSX ( <i>Homo sapiens</i> )	-25.66	-6.5	-	-	-	-
Beta-glucosidase	1H1F ( <i>Zea mays</i> )	-25.55	-6.0	-25.21	-6.2	-26.47	-5.4
Alpha hydroxysteroid dehydrogenase	1Q5M ( <i>Oryct. cunicular</i> )	-25.31	-6.2	-	-	-25.96	-5.6
Fab fragment of monoclonal antibody D63	1D8J ( <i>Mus musculus</i> )	-25.23	-5.6	-	-	-	-
Beta-glucosidase	1E55 ( <i>Zea mays</i> )	-25.17	-6.0	-26.12	-6.0	-26.68	-5.3
Polyamine oxidase	1HR2 ( <i>Zea mays</i> )	-25.14	-6.0	-27.08	-6.2	-27.09	-5.5
Bovine mitochondrial F1-ATPase	1EHR ( <i>Bos Taurus</i> )	-25.04	-5.7	-	-	-	-

<sup>a</sup>Mean value ( $n = 10$ ); in all the cases, the standard error of the mean was lower than  $0.09 \text{ kcal mol}^{-1}$ ; ES: energy score; THD: TarFisDock; -: THD did not propose this protein as a target for the ligand.

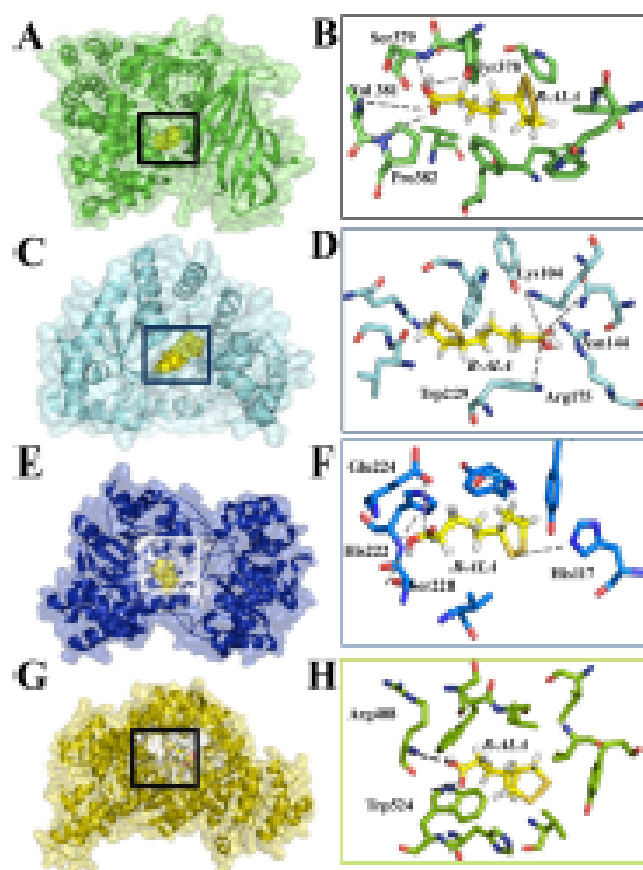


Figure 3. 3D structures of proteins showing the binding sites (left), and main residues involved in the interaction ligand-protein (right) of *R*-ALA to leukotriene A4 hydrolase (A,B), voltage gated potassium channel (C,D), alpha hydroxysteroid dehydrogenase (E,F) and epoxide hydrolase (G,H), respectively.

ALA-protein binding site for leukotriene A4 hydrolase is determined by Tyr378, Ser379, Val381 and Pro382. For voltage gated potassium channel, these aminoacids are Lys104, Asn144, Arg175 and Trp229, whereas for alpha hydroxysteroid dehydrogenase Glu224, His222, Ser221 and His117. Unlike the previous protein-ligand interactions, this last one occurs with one of the sulfur atoms present in the *R*-ALA. Finally, epoxide hydrolase showed the smaller number of interacting aminoacids in the *R*-ALA binding site, Arg408 and Trp524.

The AutoDock Vina-calculated affinities of *R*-ALA on target proteins (1HS6, 1ZSX, 1Q5M and 1CQZ) using

the structure directly obtained from TarFisDock, the one generated after the optimization by MM, or that resulted from MD simulations of the MM minimized complexes are presented in Table 2. Greater absolute values for affinity binding were obtained for complexes optimized by MM. RMSD values calculated between the 3D structure complexes obtained from TarFisDock and that generated after MM minimization were the lowest, meaning that MM optimization does not dramatically change the 3D structure of the complexes. However, this protocol is important to guarantee better binding affinity scores. Therefore, the MM optimized structure was used to calculate the CP-CIE values between *R*-ALA and all interacting residues, as predicted by LigandScout, and the results are presented in Table 3.

For leukotriene A4 hydrolase (1HS6), all CP-CIE values for binding residues with *R*-ALA were predicted to be negative, suggesting that there is little repulsion between system elements, and therefore a theoretically greater stability in the 1HS6-*R*-ALA complex formation.<sup>23</sup> Regarding the other examined proteins (1ZSX, 1Q5M and 1CQZ), not all CP-CIE values were negative, and consequently, the interactions are not totally favorable, although the affinity value calculated for 1ZSX was the same as that obtained for 1HS6.

In order to perform a validation procedure, CP-CIE values were calculated for the 1HS6-bestatin complex, which was available from Protein Data Bank (Table 4). As expected, there is a difference in the number of interacting residues for bestatin (ten), when compared to *R*-ALA (four). Interestingly, the interacting residue in both cases (TYR378) presented a greater absolute CP-CIE value for bestatin (2.85 kcal mol<sup>-1</sup>) than for *R*-ALA (0.43 kcal mol<sup>-1</sup>). However, the interaction between *R*-ALA and SER379 on 1HS6 generated an absolute CP-CIE value of 7.9 kcal mol<sup>-1</sup>, much greater than those obtained with any residue predicted on the bestatin interaction. This may suggest that *R*-ALA could be acting as a weak inhibitor of 1HS6.

Proteins predicted by TarFisDock to be *R*-ALA targets are key biochemical mediators of several known signaling pathways, for which several inhibitors have been identified. The AutoDock Vina-calculated affinity

Table 2. AutoDock Vina-calculated affinities and RMSD values for protein-*R*-ALA complexes obtained from different methods

Protein	Affinity / (kcal mol <sup>-1</sup> ) TarFisDock complex	Affinity / (kcal mol <sup>-1</sup> ) MM complex	RMSD TFD vs. MM	Affinity / (kcal mol <sup>-1</sup> ) MD complex	RMSD TFD vs. MD
1HS6	-6.6	-6.7	0.230	-6.3	1.447
1ZSX	-6.5	-6.7	0.193	-6.5	1.539
1Q5M	-6.2	-6.2	0.105	-5.5	1.879
1CQZ	-6.1	-6.1	0.204	-5.7	1.603

MM: molecular mechanics; MD: molecular dynamics.

Table 3. Counterpoise-corrected interaction energies (CP-CIE) between various residues in protein-*R*-ALA complex<sup>a</sup>

Protein	Residue	Complex energy (Eh)	Residue energy (Eh)	<i>R</i> -ALA energy (Eh)	CP-CIE / (kcal mol <sup>-1</sup> )
IHS6	TYR378	-1886.07	-628.34	-1257.73	-0.43
	SER379	-1655.71	-397.97	-1257.73	-7.15
	VAL381	-1658.99	-401.26	-1257.73	-0.27
	PRO382	-1657.81	-400.08	-1257.73	-0.87
IZSX	LYS104	-1753.35	-495.64	-1257.71	-0.80
	ASN144	-1748.94	-491.22	-1257.71	-3.18
	ARG175	-1862.60	-604.89	-1257.71	1.37
	TRP229	-1942.22	-684.50	-1257.71	-5.51
IQSM	HIS117	-1804.99	-547.51	-1257.68	-0.06
	SER221	-1655.62	-397.95	-1257.68	4.13
	HIS222	-1805.01	-547.32	-1257.68	-6.97
	GLU224	-1807.89	-550.22	-1257.68	2.75
ICQZ	TRP524	-1942.24	-684.50	-1257.73	-1.84
	ARG408	-1862.63	-604.89	-1257.73	0.43

<sup>a</sup>All calculations were performed with MP2 at the 6-311+g<sup>\*</sup> level of theory; Eh: Hartree energy.

Table 4. Counterpoise-corrected interaction energies CP-CIE for various residues in site active of IHS6-Bestatin complex<sup>a</sup>

Protein	Residue	Complex energy (Eh)	Residue energy (Eh)	<i>R</i> -ALA energy (Eh)	CP-CIE / (kcal mol <sup>-1</sup> )
IHS6	GLY269	-1315.36	-283.62	-1031.72	-6.00
	ARG563	-1636.52	-604.80	-1031.72	0.81
	HIS295	-1578.95	-547.23	-1031.72	2.17
	HIS299	-1578.95	-547.23	-1031.72	1.70
	TYR378	-1659.97	-628.34	-1031.72	-2.85
	GLU271	-1581.95	-550.22	-1031.72	-4.32
	GLU296	-1581.98	-550.25	-1031.72	-6.10
	GLU318	-1580.36	-548.63	-1031.72	-3.72
	TYR383	-1660.07	-628.34	-1031.72	-3.01
	MET270	-1830.64	-798.91	-1031.72	-3.16

<sup>a</sup>All calculations were performed with MP2 in 6-311+g<sup>\*</sup> level.

values obtained for some of them are shown in Table 5, and their superposition with *R*-ALA are presented in Figure 4. With the exception of pergolide, inhibitor of IZSX, affinities for these inhibitors were found to be greater than that obtained for *R*-ALA. It is known that bestatin, meclofenamic acid and 1-cyclohexyl-3-decylurea

act as ligands in a competitively manner for leukotriene A<sub>4</sub> hydroxylase, alpha hydroxysteroid dehydrogenase and epoxide hydrolase, respectively, whereas pergolide works by direct binding on voltage-gated potassium channels.<sup>47-51</sup> In all these cases, results from AutoDock Vina showed that their binding site is the same predicted

Table 5. AutoDock Vina-calculated affinities for known inhibitors on target proteins

Protein (PDB-code)	Inhibitor	Affinity / (kcal mol <sup>-1</sup> ) <sup>a</sup>	Biological activity	Reference
IHS6	bestatin	-8.5 ± 0.2	IC <sub>50</sub> = 4 μM	Thurmon <i>et al.</i> <sup>47</sup>
IZSX	pergolide	-5.9 ± 0.1	IC <sub>50</sub> = 120 nM	Hiro <i>et al.</i> , <sup>48</sup> Hong <i>et al.</i> <sup>49</sup>
IQSM	meclofenamic acid	-8.8 ± 0.0	K <sub>i</sub> = 18.9 μM	Haiching <i>et al.</i> <sup>50</sup>
ICQZ	1-cyclohexyl-3-decylurea	-8.7 ± 0.0	K <sub>i</sub> = 6.3 ± 0.5 nM	Arjriadi <i>et al.</i> <sup>51</sup>

<sup>a</sup>Mean value ± standard error (n = 10); IC<sub>50</sub>: half maximal inhibitory concentration; K<sub>i</sub>: inhibition constant.

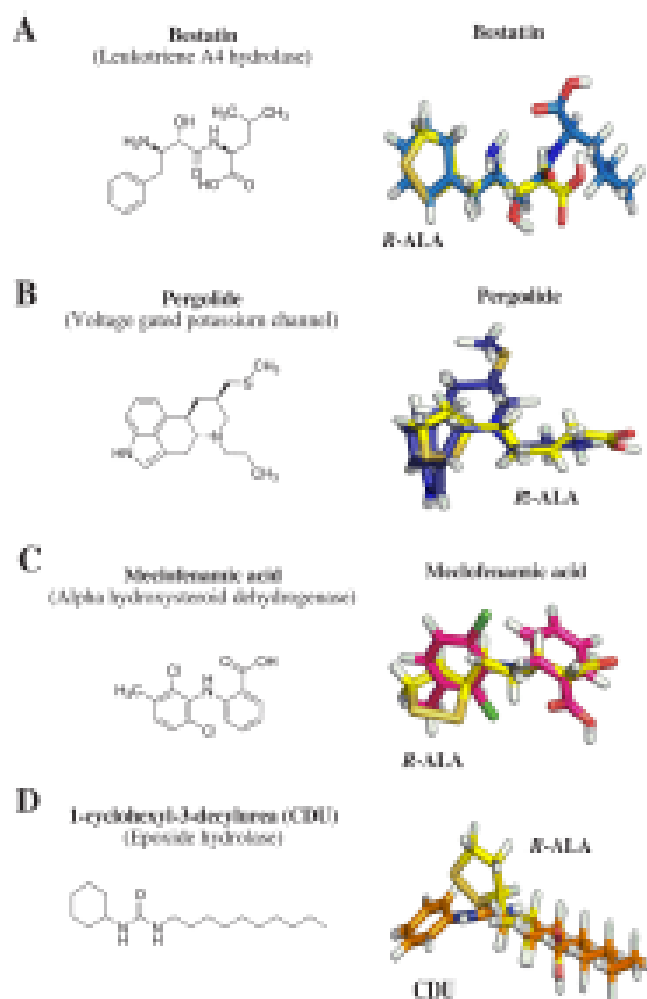


Figure 4. 3D Structure of inhibitors of selected proteins (left) and their 3D-superposition with *R*-ALA (right).

for *R*-ALA. The results of the superposition of different *R*-ALA conformations acquired on binding sites of targets proteins are shown in Figure 5. This analysis shows that *R*-ALA undergoes different spatial conformations when docked on the binding sites of these proteins. This is also

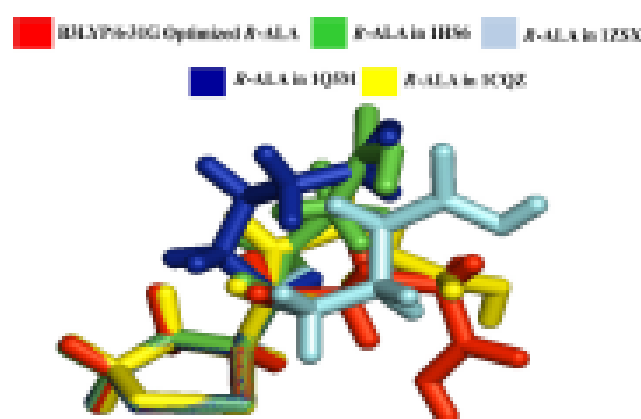


Figure 5. Superposition of the different conformations taken by *R*-ALA in the four target proteins.

in agreement with Figure 3, which shows that *R*-ALA can fit in protein cavities having different types of residue arrangements.

The physiological and toxicological relevance of the interactions between *R*-ALA and predicted targets is still unknown. However, this study unveils the opportunity to open new possibilities for the physiological role of ALA on different biochemical systems in the organisms. The role in human health of those proteins predicted to be *R*-ALA targets by TarFisDock is presented in Table 6. These data suggest that *R*-ALA can have a wide spectrum of possible biochemical targets within the cell, probably, independently from its major biochemical function as antioxidant. Clearly, these targets are well known for their importance on diabetes, cancer, inflammation and heart disease, among others.

The highest binding affinity for *R*-ALA was obtained for leukotriene A4 hydrolase (LTA4 hydrolase,  $-6.6 \text{ kcal mol}^{-1}$ ) and voltage gated potassium channel ( $-6.5 \text{ kcal mol}^{-1}$ ). LTA4 hydrolase specifically acts on ether bonds, and it is

Table 6. Diseases related to the four most important proteins (or their counterparts in humans), predicted to be targets of *R*-ALA

Protein	Related disease	Reference
IHSE Leukotriene A4 hydrolase	cancer	Chen <i>et al.</i> <sup>32,33</sup>
	psoriasis, cystic fibrosis, asthma and arthritis rheumatoid	Hicks <i>et al.</i> , <sup>34</sup> Tager and Luster, <sup>35</sup> Iversen <i>et al.</i> <sup>36</sup> and Penning <i>et al.</i> <sup>37</sup>
	cardiovascular disease and inflammation	Fark <sup>38</sup>
LZSX Voltage gated potassium channel	diabetes	Yan <i>et al.</i> <sup>39</sup>
	cancer	Teissieyre <i>et al.</i> <sup>40</sup>
	neurological and cardiovascular disorders Parkinson's and Alzheimer's disease	Walff <i>et al.</i> <sup>41</sup> Bednarczyk <sup>42</sup>
IQSM <sup>a</sup> Alpha hydroxysteroid dehydrogenase	cancer	Lewis <i>et al.</i> <sup>43</sup>
	premature birth	Pickart <i>et al.</i> <sup>44</sup>
ICQZ <sup>b</sup> Epoxide hydrolase	diabetes	Oguro <i>et al.</i> <sup>45</sup>
	hypertension and others cardiovascular diseases	Chiaravincenzi <i>et al.</i> , <sup>46</sup> Imig and Hammock <sup>47</sup> and Imig <i>et al.</i> <sup>48</sup>

<sup>a</sup>This protein is not present in humans, however its human counterpart 3CSU (AKR1C1), which has about 70% identity with IQSM; <sup>b</sup>this protein is not present in humans, but its human counterpart, 3IIY (soluble epoxide hydrolase), which has about 70% identity with ICQZ.

encoded by the human gene LTA4H.<sup>68,70</sup> It is a bifunctional zinc enzyme (EC: 3.3.2.6) which converts leukotriene A4 to leukotriene B4, a proinflammatory mediator that has the ability to recruit and activate inflammatory cells, causing tissue damage and disease.<sup>71</sup> Besides, this leukotriene is as a potent lipid chemoattractant involved in inflammation, immune responses, host defense against infection, platelet activating factor-induced shock,<sup>72,73</sup> psoriasis, cystic fibrosis, asthma and arthritis rheumatoid, among others.<sup>74,62</sup> LTA4 hydrolase also acts as aminopeptidase,<sup>74</sup> and it has been linked to esophageal cancer, as its over expression appears to be an early event in this process, therefore being a potential target for the chemoprevention of this disease.<sup>75,73</sup> Moreover, some authors have linked the presence of this enzyme to the inflammatory component of cardiovascular diseases.<sup>76</sup>

Voltage-gated potassium channels (*Kv* channels) regulate cellular processes such as the secretion of hormones and repolarization of excitable cells. In pancreatic  $\beta$ -cells, prolongation of the action potential by blocking of delaying rectifier potassium channels would be expected to increase intracellular free calcium, and to promote insulin release in a glucose-dependent manner, making this protein a potential target for the treatment of type 2 diabetes.<sup>79</sup> Moreover, alterations in the smooth operation of this transmembrane protein can cause heart diseases, such as arrhythmias.<sup>81,75,76</sup> Some authors have suggested that inhibition of these potassium channels may exert antiproliferative function in diseases such as of colon, breast and prostate cancer,<sup>82</sup> as well as benefits in the treatment of Parkinson's and Alzheimer's diseases.<sup>62</sup>

Alpha hydroxysteroid dehydrogenase plays an important role in regulating hormone since it exerts its activity both on androgens (C19 steroids) and progestins (C21 steroids) in rabbits and rats.<sup>66,77</sup> Its counterpart in humans is AKR1C1, which belongs to the hydroxysteroid dehydrogenase (HSDs) family of enzymes, and plays an important role in the metabolism of progesterone which is essential for the maintenance of pregnancy. This enzyme has been linked to diseases such as cancer<sup>62</sup> and premature birth.<sup>64</sup>

Epoxide hydrolase is an enzyme that is responsible for the detoxification of mutagenic and carcinogenic agents by the hydrolysis of epoxide substrates.<sup>78,79</sup> In humans, this enzyme can be deficient in diseases such as diabetes,<sup>62</sup> although an important role on the metabolism of key inflammatory mediators, like the epoxyeicosatrienoic acids,<sup>67</sup> and in hypertension have also been reported.<sup>66</sup> Soluble epoxide hydrolase inhibitors have been considered as potential pharmacologic agents due to their ability to improve vascular function and to reduce renal damage in angiotensin related hypertension.<sup>68</sup>

As presented before, proteins predicted by TarFisDock to be targets for ALA were different from those already known to interact with the antioxidant. This may be explained considering the relatively low number of proteins existing in the PDTD. However, pyruvate dehydrogenase kinase 2 (ZBU5), a protein present in the PDTD, known to be inhibited by *R*-alpha lipoic acid,<sup>7</sup> did not show up as a target. This is consistent with the fact that AutoDock Vina predicted a relatively low binding affinity ( $-5.8 \pm 0.03$  kcal mol<sup>-1</sup>) of *R*-ALA for this protein.

Finally, one of the most interesting findings in this work was to establish that the 3D-structure of *R*-ALA can be effectively superimposed to well known inhibitors of target proteins. Although the absolute AutoDock Vina-calculated affinities of these inhibitors for their target proteins are considerably greater than those obtained for *R*-ALA (with the exception of pergolide, inhibitor of 1ZSX). The docking on the binding site, as well as the structural similarities for at least some parts of the inhibitors, suggests that *R*-ALA may be able to enter the ligand binding site of these proteins, probably competing with the endogenous ligands. However, the relative lower affinity bindings recorded for ALA imply that only weak inhibitory or agonist activities may be expected. These computational observations must be validated with experimental evidence, and this will support the findings revealing the pharmacological effect of *R*-ALA on many diseases.

## Conclusion

Virtual screening and docking data suggest that it is plausible that *R*-ALA could behave as a weak inhibitor of proteins such as leukotriene A4 hydrolase and voltage gated potassium channel, characteristics that could explain some of the benefits that have been observed for *R*-ALA on the control and alleviation of diseases on which those have been involved.

## Acknowledgements

The authors wish to thank Colciencias (Bogotá, Colombia) and the University of Cartagena (Cartagena, Colombia) for their financial support (grant 110745921616, 2009), as well as the program to support research groups, sponsored by the Vice-Rectoría for research of the University of Cartagena (2009-2011).

## References

1. Krämer, K.; Hoppe, P.; Packer, L. In *R- $\alpha$ -Lipoic Acid*; Krämer, K.; Packer, L., eds.; Marcel Dekker Inc.: New York, 2001; chapter 9.

2. Carreau, J. P.; *Methods Enzymol.* **1979**, *62*, 152.
3. Chifu, S.; Richard, C.; Delemasure, S.; Vergely, C.; Mogosanu, C.; Muresan A.; *Ann. Cardiol. Angiol. (Paris)* **2008**, *57*, 161.
4. Packer, L.; Hiramatsu, M.; Yoshikawa K.; *Antioxidant Food Supplements in Human Health*; Academic Press: New York, 1999.
5. Lodge, J. K.; Youn, H. D.; Handelman, G. J.; Kozlshi, T.; Matsugo, S.; Maffur, W.; Packer, L.; *J. Appl. Nutr.* **1997**, *49*, 3.
6. Singh, U.; Jhalal I.; *Nutr. Rev.* **2008**, *66*, 646.
7. Packer, L.; Cadenas, E.; *J. Clin. Biochem. Nutr.* **2011**, *48*, 26.
8. Odabasoglu, F.; Halici, Z.; Aygun, H.; Halici, M.; Altay, F.; Cakir, A.; Cadirci, E.; Bayir, Y.; Suleyman, H.; *Br. J. Nutr.* **2011**, *105*, 31.
9. Valko, M.; Rhodes, C. J.; Moncol, J.; Izakovic M.; Mazur, M.; *Chem. Biol. Interact.* **2006**, *160*, 1.
10. Hassan, B. H.; Crossan, J. E.; *J. Biol. Chem.* **2011**, *286*, 8263.
11. Rakel, D. In *Dyslipidemias*; Underbakke, G.; McBride, P. H., eds.; Elsevier: España, 2008; chapter 40.
12. Packer, L.; Will, R. H.; Tritschler, H. J.; *Free Rad. Bio. Med.* **1995**, *19*, 227.
13. Biliska, A.; Wlodek, L.; *Postepy Hig. Med. Dosw.* **2002**, *56*, 201.
14. Biewenga, G. P.; Haenen, G. R. M. N.; Bast, A.; *Gen. Pharmacol.* **1997**, *29*, 315.
15. Foo, N. P.; Lin, S. H.; Lee, Y. H.; Wu, M. J.; Wang, Y. J.; *Toxicology* **2011**, *282*, 39.
16. Moreira, P. I.; Harris, P. L. R.; Zhu, X.; Santos, M. S.; Oliveira, C. R.; Smith, M. A.; Perry, G.; *J. Alzheimer's Dis.* **2007**, *12*, 195.
17. Kagan, V. H.; Shvedova, A.; Serbinova, H.; Khan, S.; Swanson, C.; Powell, R.; Packer, L.; *Biochem. Pharmacol.* **1992**, *44*, 1637.
18. Çakalay, U.; *Med. Hypotheses* **2006**, *66*, 110.
19. Moini, H.; Packer, L.; Saris, N. H. L.; *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **2002**, *182*, 84.
20. Henriksen, H. J.; *Free Rad. Bio. Med.* **2006**, *40*, 3.
21. Packer, L.; Kraemer, K.; Rimbach, G.; *Nutrition* **2001**, *17*, 888.
22. Luz, J.; Zemdega, J. C.; Amari, L. S.; *Diabetes Metab.* **2008**, *35*, 137.
23. Diesel, B.; Kuhanek-Heinze, S.; Hollje, M.; Brandl, B.; Hollje, H. D.; Vollmar, A. M.; Klamer, A. K.; *Biochemistry* **2007**, *46*, 2146.
24. Li, H.; Gao, Z.; Kang, L.; Zhang, H.; Yang, K.; Yu, K.; Luo, X.; Zhu, W.; Chen, K.; Shen, J.; Wang, X.; Jiang, H.; *Nucleic Acids Res.* **2006**, *1*, 219.
25. Cai, J.; Han, C.; Hu, T.; Zhang, J.; Wu, D.; Wang, F.; Liu, Y.; Ding, J.; Chen, K.; Yue, J.; Shen, X.; Jiang, H.; *Protein Sci.* **2006**, *15*, 2071.
26. Olivero, J.; Cabarcas, M.; Ortega, C.; *Chemosphere* **2010**, *80*, 116.
27. Hui-fang, L.; Qing, S.; Jian, Z.; Wei, F.; *J. Mol. Graph. Model.* **2010**, *29*, 326.
28. Frisch, M. J.; Trucks, G. W.; Schlegel, H. R.; Scuseria, G. E.; Robb, M. A.; Cheeseman, J. R.; Montgomery Jr., J. A.; Vreven, T.; Kudin, K. N.; Baroni, J. C.; Millam, J. M.; Iyengar, S. S.; Tomasi, J.; Barone, V.; Mennucci, B.; Cossi, M.; Scalmani, G.; Rega, N.; Petersson, G. A.; Nakatsuji, H.; Hada, M.; Ehara, M.; Toyota, K.; Fukuda, R.; Hasegawa, J.; Ishida, M.; Nakajima, T.; Honda, Y.; Kitao, O.; Nakai, H.; Klene, M.; Li, X.; Knox, J. E.; Hratchian, H. P.; Cross, J. B.; Bakken, V.; Adamo, C.; Jaramillo, J.; Gomperis, R.; Stratmann, R. E.; Yazyev, O.; Austin, A. J.; Cammi, R.; Pomelli, C.; Ochterski, J. W.; Ayala, P. Y.; Morokuma, K.; Voth, G. A.; Salvador, P.; Dannenberg, J. J.; Zakrzewski, V. G.; Dapprich, S.; Daniels, A. D.; Strain, M. C.; Farkas, O.; Malick, D. K.; Rabuck, A. D.; Raghavachari, K.; Foresman, J. B.; Ortiz, J. V.; Cui, Q.; Baboul, A. G.; Clifford, S.; Cioslowski, J.; Stefanov, B. B.; Liu, G.; Liashenko, A.; Piskorz, P.; Komaromi, I.; Martin, R. L.; Fox, D. J.; Keith, T.; Al-Laham, M. A.; Peng, C. Y.; Nanayakkara, A.; Challacombe, M.; Gill, P. M. W.; Johnson, B.; Chen, W.; Wong, M. W.; Gonzalez, C.; Pople, J. A.; *Gaussian03*; Gaussian Inc.: Pittsburgh, 2003.
29. Guha, R.; Howard, M. T.; Hutchison, G. R.; Murray-Rust, P.; Rzepa, H.; Steinbeck, C.; Wegner, J. K.; Willighagen, E.; *J. Chem. Inf. Model.* **2006**, *46*, 991.
30. <http://www.pdb.org/pdb/home/home.do>, accessed in November 2010
31. Tripos: A Certera™ Company, SYBYL. *Molecular Modeling Software*, version 8.1, Tripos Inc.: St. Louis, MO, USA, 2007.
32. Badrinarayan, P.; Sasry, G. N.; *J. Chem. Inf. Model.* **2011**, *51*, 115.
33. Sanner, M. F.; *J. Mol. Graph. Model.* **1999**, *17*, 57.
34. Troli, O.; Olson, A. J.; *J. Comput. Chem.* **2009**, *31*, 455.
35. Wolber, G.; Langer, T.; *J. Chem. Inf. Model.* **2005**, *45*, 160.
36. Chen, Z.; Tian, G.; Wang, Z.; Jiang, H.; Shen, J.; Zhu, W.; *J. Chem. Inf. Model.* **2010**, *50*, 615.
37. Włodarczyk, N.; Le Broc-Ryckewaert, D.; Gilleron, P.; Lemoine, A.; Farce, A.; Chavatte, P.; Dubois, J.; Pommery, N.; Halchard, J. P.; Furman, C.; Millet, R.; *J. Med. Chem.* **2011**, *54*, 1178.
38. Kongsaeree, P. T.; Ratananikom, K.; Choengpanya, K.; Tongtublima, N.; Sujjwallanarat, P.; Porcharoennop, C.; Ooptuma, A.; Svasit, J.; *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2010**, *67*, 257.
39. Demutha, C.; Zerbet, O.; Rognanth, D.; Söllb, R.; Beck-Sickingere, A.; Folkersb, G.; Spöchliger, U. E.; *Biosens. Bioelectron.* **2001**, *16*, 783.
40. Salt, D. W.; Hudson, B. D.; Batling, L.; Ellis, M. J.; Ford, M. G.; *J. Med. Chem.* **2005**, *48*, 3214.
41. Sivannang, N.; Nantasenamat, C.; Isarakura-Na-Ayudhya, C.; Prachayasittikul, V.; *Molecular (Washington, DC, U. S.)* **2011**, *16*, 3597.
42. Kee, E. A.; Livegood, M. C.; Carter, E. E.; McKenna, M.; Cafero, M.; *J. Phys. Chem. B* **2009**, *1139*, 14810.
43. Sordo, J. A.; *J. Mol. Struct.* **2001**, *537*, 245.
44. Daza, M. C.; Dobado, J. A.; Molina, J.; *J. Chem. Phys.* **1999**, *110*, 24.



45. Dąbkowska, I.; Jurečka, P.; Hobza, P.; *J. Chem. Phys.* **2005**, *122*, 204322.
46. DeLano, W.; *The PyMol Molecular Graphics System*, DeLano Scientific: San Carlos, CA, USA, 2003.
47. Thunnissen, M. M. G. M.; Andersson, B.; Samuelsson, B.; Wong, C. H.; Haeggsström, J. Z.; *FASEB J.* **2002**, *16*, 1648.
48. Hursi, R. S.; Higdon, N. R.; Lawson, J. A.; Clark, M. A.; Rutherford-Boot, K. L.; McDonald, W. G.; Haas, J. V.; McGrath, J. P.; Mehlsson, M. D.; *Eur. J. Pharmacol.* **2003**, *482*, 31.
49. Halchig, M. A.; Penning, T. M.; *Biochem. J.* **1999**, *341*, 853.
50. Argiriadi, M. A.; Morisseau, C.; Goodrow, M. H.; Dowdy, D. L.; Hammock, B. D.; Christianson, D. W.; *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 15265.
51. Hong, Z.; Smith, A. J.; Archer, S. L.; Wu, X. C.; Nelson, D. P.; Peterson, D.; Johnson, G.; Weir, H. K.; *Circulation* **2005**, *112*, 1494.
52. Chen, X.; Li, N.; Wang, S.; Wu, N.; Hong, J.; Jiao, X.; Krasna, M. J.; Beer, D. G.; Yang, C. S.; *J. Natl. Cancer Inst.* **2003**, *95*, 1053.
53. Chen, X.; Wang, S.; Wu, N.; Yang, C. S.; *Curr. Cancer Drug Targets* **2004**, *4*, 267.
54. Hicks, A.; Monkash, S. P.; Hoffman, A. F.; Jr. Goodrow, R.; *Exp. Opin. Invest. Drugs* **2007**, *16*, 1909.
55. Tager, A. M.; Luster, A. D.; *Prostaglandins, Leukotrienes Ezent. Fatty Acids* **2003**, *69*, 123.
56. Iversen, L.; Kraghalla, K.; Ziboh, V. A.; *Skin Pharmacol.* **1997**, *10*, 169.
57. Penning, T. D.; Russell, M. A.; Chen, B. B.; Chen, H. Y.; Liang, C. D.; Mahoney, M. W.; Malesha, J. W.; Miyashiro, J. M.; Yu, S. S.; Askonas, L. J.; Gliese, J. K.; Harding, E. L.; Highkin, M. K.; Kachur, J. F.; Kim, S. H.; Villani-Price, D.; Pyla, E. Y.; Choreshti-Haack, N. S.; Smith, W. G.; *J. Med. Chem.* **2002**, *45*, 3482.
58. Funk, C. D.; *Nat. Rev. Drug Discovery* **2005**, *4*, 664.
59. Yan, L.; Figueroa, D. J.; Ausita, C. P.; Liu, Y.; Buglonesi, R. M.; Slaughter, R. S.; Kaczorowski, G. J.; *Diabetes* **2004**, *53*, 597.
60. Telssevre, A.; Duarte, N.; Ferreira, M. J.; Michalak, K.; *J. Physiol. Pharmacol.* **2009**, *60*, 69.
61. Wulff, H.; Castle, N. A.; Pardo, L. A.; *Nat. Rev. Drug Discovery* **2009**, *8*, 982.
62. Bednarczyk, P.; *Acta Biochim. Pol.* **2009**, *56*, 385.
63. Lewis, M. J.; Wiebe, J. P.; Heathcote, J. G.; *BMC Cancer* **2004**, *4*, 27.
64. Plekorz, R. P.; Gingras, S.; Hoffmeyer, A.; Ihle, J. N.; Weinstein, Y.; *Mol. Endocrinol.* **2005**, *19*, 431.
65. Oguro, A.; Fujita, N.; Imacka, S.; *Drug Metab. Pharmacokin.* **2009**, *24*, 438.
66. Chiamvimonchai, N.; Ho, C. M.; Tsai, H. J.; Hammock, B.; *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **2007**, *50*, 225.
67. Imig, J. D.; Hammock, B. D.; *Nat. Rev. Drug Discovery* **2009**, *8*, 794.
68. Imig, J. D.; Carpenter, M. A.; Shaw, S.; *Pharmaceuticals* **2009**, *2*, 217.
69. Mancini, J. A.; Evans, J. F.; *Eur. J. Biochem.* **1995**, *231*, 65.
70. Jiang, X.; Zhou, L.; Wu, Y.; Wei, D.; Sun, C.; Jia, J.; Liu, Y.; Lal, L.; *ChemBioChem* **2010**, *11*, 1120.
71. Haeggsstrom, J. Z.; *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **2000**, *16*, 25.
72. Thunnissen, M. M.; Nordlund, P.; Haeggsstrom, J. Z.; *Nat. Struct. Biol.* **2001**, *8*, 131.
73. Sharma, J. N.; Mohammed, L. A.; *Inflammopharmacology* **2006**, *14*, 10.
74. Rudberg, P. C.; Tholander, F.; Andberg, M.; Thunnissen, M. G.; Haeggsström, J. Z.; *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 27376.
75. Wickman, K.; Krapivinsky, G.; Corey, S.; Kennedy, M.; Nemes, J.; Medina, I.; Clapham, D. E.; *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1999**, *888*, 386.
76. Schmalhofer, W. A.; Swensen, A. M.; Thomas, B. S.; Felix, J. P.; Haedo, R. J.; Solly, K.; Kiss, L.; Kaczorowski, G. J.; Garcia M. L.; *Amey Drug Dev. Technol.* **2010**, *8*, 714.
77. Couture, J. F.; Legrand, P.; Cantin, L.; Labrie, F.; Lun-The, V.; Breton, R.; *J. Mol. Biol.* **2004**, *339*, 89.
78. Argiriadi, M. A.; Morisseau, C.; Hammock, B. D.; Christianson, D. W.; *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1999**, *96*, 10637.
79. Yang, X.; Liang, S. H.; Weyant, D. M.; Lazarus, P.; Gallagher, C. J.; Omiecinski, C. J.; *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2009**, *330*, 23.

Submitted: March 17, 2011

Published online: July 14, 2011