

# UCUENCA

**Universidad de Cuenca**

Facultad de Ciencias Químicas

Carrera de Bioquímica y Farmacia

**Comparación Computacional de la Afinidad de Unión de AINES Selectivos y No  
Selectivos hacia la COX-2 mediante Docking Molecular**


Trabajo de titulación previo a la obtención  
del título de Bioquímico Farmacéutico

**Autor:**

Doménica Alexandra Flores Trujillo

**Director:**

Fanny Carola Jerves Vázquez

ORCID:  0000-0002-5313-039X

**Cuenca, Ecuador**

2024-09-24

## Resumen

La ciclooxigenasa (COX) es una enzima clave en la síntesis de prostaglandinas inflamatorias, con dos isoformas principales: COX-1, que se encuentra en diversos tejidos y está implicada en funciones de homeostasis, y COX-2, que se expresa principalmente en tejidos inflamados. Los antiinflamatorios no esteroideos (AINES) se utilizan ampliamente por sus efectos antiinflamatorios, analgésicos y antipiréticos. Estos fármacos se dividen en AINES no selectivos, que inhiben tanto COX-1 como COX-2, y AINES selectivos, que inhiben de forma preferente la COX-2, lo que reduce los efectos secundarios gastrointestinales. Esta investigación tiene como objetivo comparar, mediante simulaciones computacionales, la afinidad de unión de AINES selectivos y no selectivos hacia la enzima COX-2, clave en procesos inflamatorios. Empleando técnicas avanzadas de docking molecular, se evaluaron las interacciones entre los fármacos y COX-2, analizando valores como la energía libre de unión y la constante de inhibición. Las diferencias observadas entre ambos tipos de AINES resaltan la relevancia de estas interacciones moleculares, lo que a su vez aporta un valioso entendimiento para la optimización de agentes terapéuticos que actúen de manera específica sobre COX-2. Los resultados de este estudio ofrecen nuevas perspectivas para el diseño de antiinflamatorios más eficaces, mejorando las estrategias de tratamiento para diversas patologías inflamatorias.

*Palabras clave del autor:* COX-2, AINES, afinidad, docking, interacciones



El contenido de esta obra corresponde al derecho de expresión de los autores y no compromete el pensamiento institucional de la Universidad de Cuenca ni desata su responsabilidad frente a terceros. Los autores asumen la responsabilidad por la propiedad intelectual y los derechos de autor.

Repositorio Institucional: <https://dspace.ucuenca.edu.ec/>

### Abstract

Cyclooxygenase (COX) is a key enzyme in the synthesis of inflammatory prostaglandins, with two main isoforms: COX-1, which is found in various tissues and is involved in homeostatic functions, and COX-2, which is primarily expressed in inflamed tissues. Non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) are widely used for their anti-inflammatory, analgesic, and antipyretic effects. These drugs are divided into non-selective NSAIDs, which inhibit both COX-1 and COX-2, and selective NSAIDs, which preferentially inhibit COX-2, thereby reducing gastrointestinal side effects. This research aims to compare, through computational simulations, the binding affinity of selective and non-selective NSAIDs towards the COX-2 enzyme, which plays a key role in inflammatory processes. Using advanced molecular docking techniques, the interactions between drugs and COX-2 were evaluated by analyzing parameters such as binding free energy and inhibition constant. The observed differences between both types of NSAIDs highlight the relevance of these molecular interactions, providing valuable insights for optimizing therapeutic agents that specifically target COX-2. The results of this study offer new perspectives for the design of more effective anti-inflammatory drugs, improving treatment strategies for various inflammatory conditions.

*Author Keywords:* COX-2, NSAIDS, affinity, docking, interactions



The content of this work corresponds to the right of expression of the authors and does not compromise the institutional thinking of the University of Cuenca, nor does it release its responsibility before third parties. The authors assume responsibility for the intellectual property and copyrights.

Institutional Repository: <https://dspace.ucuenca.edu.ec>

## Índice de Contenido

INTRODUCCIÓN .....	11
MARCO TEÓRICO .....	13
Enzima Ciclooxygenasa .....	13
Introducción a los AINES .....	14
Ácido Acetilsalicílico .....	15
Ibuprofeno.....	15
Diclofenaco .....	16
Naproxeno .....	16
Celecoxib .....	17
Rofecoxib.....	17
Etoricoxib .....	18
Riesgos Asociados a los AINES y Desarrollo de AINES Selectivos de la COX-2.....	19
Interacciones Enzima-Ligando .....	20
Docking Molecular .....	22
Aplicaciones del Docking Molecular en el Estudio de AINES .....	23
METODOLOGÍA .....	26
Preparación de los Ligandos .....	26
Selección de los AINES .....	26
Obtención de los Ligandos.....	26
Preparación de los AINES.....	26
Preparación de las Proteínas .....	26
Obtención de la Estructura Proteica.....	26
Preparación de la Proteína .....	27
Configuración del Docking.....	27
Software de Docking.....	27

Configuración del Grid .....	27
Parámetros del Docking.....	28
Ejecución del Docking .....	28
AutoDock 4 .....	28
AutoDock Vina .....	29
Visualización y Análisis de Resultados .....	29
Análisis Estadístico.....	29
RESULTADOS .....	31
Resultados de Valores de Afinidad .....	31
Interacciones AINES No Selectivos .....	37
Diclofenaco .....	37
Naproxeno .....	38
Ibuprofeno.....	40
Ácido Acetilsalicílico .....	42
Interacciones AINES Selectivos.....	44
Etoricoxib .....	44
Celecoxib .....	45
Rofecoxib.....	48
DISCUSIÓN .....	50
CONCLUSIONES .....	54
RECOMENDACIONES .....	55
REFERENCIAS .....	56

## Índice de Figuras

Figura 1. Comparación de los residuos del sitio activo de la enzima COX-1 y COX-2.....	14
<i>Figura 2. Estructura bidimensional del ácido acetilsalicílico. ....</i>	<i>15</i>
<i>Figura 3. Estructura tridimensional del ácido acetilsalicílico. ....</i>	<i>15</i>
Figura 4. Estructura bidimensional del ibuprofeno.....	16
Figura 5. Estructura tridimensional del ibuprofeno. ....	16
Figura 6. Estructura bidimensional del diclofenaco. ....	16
Figura 7. Estructura tridimensional del diclofenaco. ....	16
Figura 8. Estructura bidimensional del naproxeno.....	17
Figura 9. Estructura tridimensional del naproxeno. ....	17
<i>Figura 10. Estructura bidimensional del celecoxib.....</i>	<i>17</i>
Figura 11. Estructura tridimensional del celecoxib.....	17
Figura 12. Estructura bidimensional del rofecoxib. ....	18
Figura 13. Estructura tridimensional del rofecoxib. ....	18
Figura 14. Estructura bidimensional del etoricoxib. ....	18
Figura 15. Estructura tridimensional del etoricoxib. ....	18
Figura 16. Diagrama de flujo de los pasos ejecutados en el docking en AutoDock 4. ....	29
Figura 17. Diagrama de flujo de los pasos ejecutados en el docking en AutoDock Vina. ....	29
<i>Figura 18. Comparación de los Diagramas de Dispersión de la Variación de Energía de Unión...</i> .....	<i>33</i>
Figura 19. Diagrama de Dispersión de los Valores de Energía de Unión en AutoDock 4 vs AutoDock Vina. ....	35
Figura 20. Visualización en 3D de los Puentes de Hidrógeno entre el Diclofenaco y la COX-2 en el Sitio Activo. ....	37
Figura 21. Visualización en 2D del Total de Interacciones entre Diclofenaco y la COX-2 en el Sitio Activo.....	38
Figura 22. Visualización en 3D de los Puentes de Hidrógeno entre el Naproxeno y la COX-2 en el Sitio Activo. ....	39
Figura 23. Visualización en 2D del Total de Interacciones entre Naproxeno y la COX-2 en el Sitio Activo.....	40
Figura 24. Visualización en 3D de los Puentes de Hidrógeno entre el Ibuprofeno y la COX-2 en el sitio activo. ....	41

Figura 25. Visualización en 2D del Total de Interacciones entre el Ibuprofeno y la COX-2 en el Sitio Activo. ....42

Figura 26. Visualización en 3D de los Puentes de Hidrógeno entre el AAS y la COX-2 en el Sitio Activo.....42

Figura 27. Visualización en 2D del total de interacciones del AAS y la COX-2 en el sitio activo43

Figura 28. Visualización en 3D de los Puentes de Hidrógeno entre el Etoricoxib y la COX-2 en el Sitio Activo. ....44

Figura 29. Visualización en 2D del Total de Interacciones del Etoricoxib y la COX-2 en el Sitio Activo.....45

Figura 30. Visualización en 3D de los Puentes de Hidrógeno entre el Celecoxib y la COX-2 en el Sitio Activo. ....46

Figura 31. Visualización en 2D del Total de Interacciones entre Celecoxib y la COX-2 en el Sitio Activo.....47

Figura 32. Visualización en 3D de los Puentes de Hidrógeno entre el Rofecoxib y la COX-2 en el Sitio Activo .....48

Figura 33. Visualización en 2D del Total de Interacciones entre el Rofecoxib y la COX-2 en el Sitio Activo. ....49

### Índice de Tablas

Tabla 1. Valores de la Energía Libre de Unión y la Constante de Inhibición para AINES Selectivos y No Selectivos de la COX-2.....	32
Tabla 2. Comparación de los valores medios de la energía libre de unión para AINES selectivos y no selectivos de la COX-2.....	34
<i>Tabla 3. Comparación de los Valores de la Energía Libre de Unión para AINES Selectivos y No Selectivos de la COX-2 Según AutoDock 4 y AutoDock Vina.....</i>	<i>34</i>
Tabla 4. Promedios de la Energía Libre de Unión de los AINES Selectivos y No selectivos según AutoDock4 y AutoDock Vina. ....	36



### **Agradecimientos**

En primer lugar, deseo expresar mi profundo agradecimiento a Dios, cuya guía y fortaleza han sido fundamentales en cada paso de este arduo pero gratificante camino académico. Su divina providencia ha sido mi luz y mi fuerza, inspirándome y dándome la perseverancia necesaria para superar los desafíos y alcanzar esta meta académica tan significativa.

Agradezco de manera especial a mi tutora de tesis, la Ing. Carola Jerves, por su dedicación incansable, paciencia infinita y experta orientación a lo largo de este proceso. Su compromiso con mi crecimiento académico y profesional ha sido invaluable. Cada reunión y cada consejo que compartió conmigo fueron fundamentales para la calidad y el desarrollo de este trabajo.

Igualmente, quiero expresar mi sincero agradecimiento a la asesora de tesis, Bqf. Martiza Ochoa, por su disposición constante y sus valiosos aportes que enriquecieron enormemente este estudio. Su conocimiento profundo y su habilidad para ofrecer consejos precisos fueron esenciales el desarrollo de este trabajo.

### **Dedicatoria**

Dedico este trabajo a mis amados padres, Wilo y Alex, cuyo amor incondicional, sacrificios y constante apoyo han sido la fuerza detrás de cada logro en mi vida. Su dedicación y ejemplo han sido mi inspiración, y este trabajo es un testimonio del buen trabajo que han hecho como padres. Gracias por su infinito amor, paciencia, sus mimos y por creer siempre en mí.

También dedico el trabajo de titulación a mi Mami Abuela. Su amor tan puro me ha dado un refugio durante las largas jornadas. Su cariño y apoyo han sido fundamentales para mi bienestar y éxito académico. Este logro también es suyo, gracias por estar siempre a mi lado con tu amor incondicional y por ser mi súper abuela.

Por último, pero no menos importante, quiero dedicar este trabajo a mis amigas de toda la vida, Emi, Mica, Queso, Any y Vivi. Las personas que con su chispa y luz han iluminado mi vida en los momentos más agotadores.

## INTRODUCCIÓN

A nivel mundial, cerca del 18% de los medicamentos son de venta libre (OTC), mientras que en América Latina este porcentaje alcanza el 30% (Ortiz-Prado et al., 2014). En Ecuador, la ARCSA registró en 2018 aproximadamente 500 medicamentos OTC, lo que representa el 13% del total disponible en el país (Agencia Nacional de Regulación Control Vigilancia Sanitaria, 2019). Entre estos, los antiinflamatorios no esteroideos (AINES) destacan por su fácil acceso. Aunque los medicamentos OTC, como los AINES, están diseñados para su uso seguro sin supervisión médica, el abuso, uso crónico o irracional de estos fármacos plantea serios riesgos. En Ecuador, el 60% de la población accede a medicamentos sin la adecuada supervisión médica (Ortiz-Prado et al., 2014), lo que incrementa el riesgo de un uso inapropiado, incluyendo los AINES. El uso prolongado o excesivo de estos fármacos puede generar efectos adversos graves, como sobredosis, interacciones medicamentosas peligrosas y complicaciones a largo plazo, subrayando la necesidad de educar al público sobre su uso adecuado para evitar consecuencias dañinas.

Los AINES son ampliamente empleados debido a sus efectos para reducir el dolor, la inflamación y la fiebre. La clasificación de estos fármacos como de venta libre, sumada a sus características farmacológicas, ha incrementado la frecuencia de reacciones adversas, particularmente en tratamientos prolongados utilizados para mitigar los síntomas de dolencias crónicas. El uso continuo o inapropiado de AINES conlleva riesgos significativos, destacándose los problemas gastrointestinales, renales y cardiovasculares. Los AINES no selectivos inhiben tanto la COX-1 como la COX-2, comprometiendo las funciones protectoras de la primera. Por su parte, los AINES selectivos (Coxibs) actúan predominantemente sobre la COX-2 en los tejidos inflamados, lo que reduce ciertos efectos adversos. No obstante, la hipersensibilidad es la reacción adversa más relevante asociada a su uso, pudiendo ser severa. Si bien los AINES selectivos ofrecen mayor seguridad en algunos aspectos, diversos estudios han señalado un aumento del riesgo cardiovascular, lo que genera incertidumbre en cuanto a su seguridad a largo plazo, particularmente en tratamientos crónicos.

El docking molecular es una herramienta clave en la investigación farmacológica para estudiar la interacción entre fármacos y sus objetivos biológicos. Este método predice la orientación de un ligando en el sitio activo de una enzima, proporcionando información sobre la afinidad y especificidad del fármaco. Este estudio utiliza docking molecular para comparar la afinidad de unión entre AINES selectivos y no selectivos hacia la enzima COX-2, midiendo y analizando la

energía libre de unión y las interacciones moleculares para ofrecer una visión detallada de sus mecanismos de acción.

Comparar la afinidad de unión entre AINES selectivos y no selectivos hacia la COX-2 brinda una perspectiva valiosa para entender cómo estos medicamentos interactúan con sus objetivos moleculares. Este conocimiento es crucial para futuros estudios en química computacional que optimicen fármacos y mejoren sus perfiles de eficacia y seguridad. A través del análisis de la energía libre de unión y las interacciones específicas entre los fármacos y la enzima, este estudio pretende contribuir significativamente al campo de la farmacología computacional en Ecuador, sentando las bases para el desarrollo de investigaciones futuras.

El objetivo de esta investigación es evaluar y comparar la afinidad de unión de AINES selectivos y no selectivos hacia la enzima COX-2 mediante técnicas de docking molecular. Esto implica determinar la energía libre de unión de los fármacos, analizar las interacciones moleculares para identificar patrones de unión y diferencias en los mecanismos de inhibición, y comparar la afinidad de estos medicamentos para detectar variaciones en su capacidad de inhibición y especificidad en el sitio activo de la enzima.

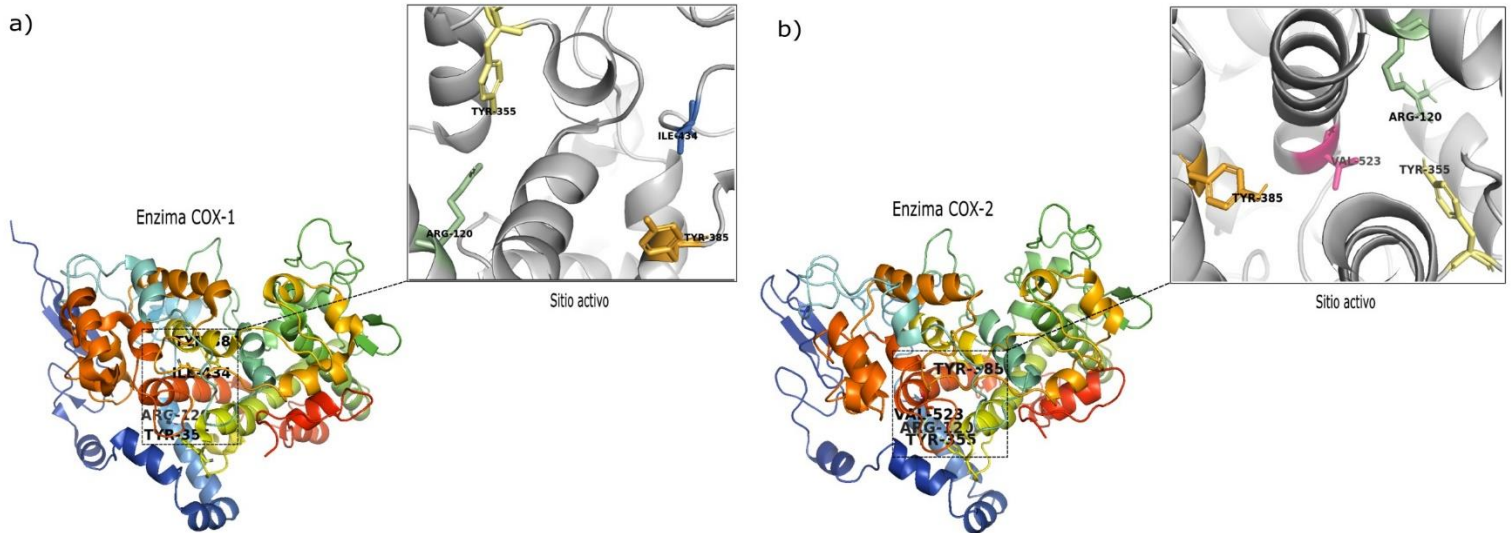
## MARCO TEÓRICO

### Enzima Ciclooxygenasa

La enzima ciclooxygenasa (COX) es un homodímero que contiene un grupo hemo en cada monómero y se encarga de catalizar la síntesis de prostaglandinas, mediadores inflamatorios, a partir de ácido araquidónico cuando este es liberado de la membrana fosfolipídica gracias a la acción de la fosfolipasa A<sub>2</sub> y fosfolipasa C (Fitzpatrick, 2005). Las prostaglandinas son responsables de varios procesos fisiopatológicos como: reclutamiento de células del sistema inmunitario, vasodilatación, la coagulación sanguínea, fiebre, dolor, la plasticidad neuronal y la muerte neuronal (Martín-Vázquez et al., 2023).

Se han identificado dos isoformas de esta enzima, la enzima COX-1 y la enzima COX-2. Estas dos isoformas son similares en un 60% en cuanto a estructura y función, sin embargo, su principal diferencia radica en el patrón de regulación y la expresión tisular (Salido et al., 2001). La COX-1 es una estructura de 602 aminoácidos, por cada monómero, que se expresa en la mayoría de tejidos y cumple una función de homeostasis mediante de la síntesis de un determinado tipo de prostaglandinas que posee un rol de protección de la mucosa gástrica, regulación del equilibrio electrolítico y de la hemostasis. A diferencia de la COX-1, la COX-2 está formada por 604 aminoácidos y su síntesis es estimulada por mediadores de la inflamación como interleucinas, lipopolisacáridos y el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), es decir, esta es una enzima que se expresa en tejidos inflamados. No obstante, se ha observado que esta isoforma también tiene un papel sobre la función renal, función reproductiva, resorción ósea y neurotransmisión (Martín-Vázquez et al., 2023; Rao & Knaus, 2008).

En la **Figura 1**, se puede observar otra diferencia importante en cuanto a la selectividad de los fármacos. Dicha diferencia es la sustitución de un residuo isoleucina 434 (Ile) de la COX-1 por un residuo valina 523 (Val) en la COX-2. El menor tamaño de la valina permite que los inhibidores accedan a la denominada “*bolsa lateral*”, este es un sitio activo más amplio que permite que los coxibs, que poseen un mayor tamaño que los AINES convencionales, encajen en este sitio e inhiban a la COX-2; esta bolsa lateral está presente solo en la isoforma de tipo 2. En contra parte, en la enzima COX-1 la isoleucina en posición 434, al ser de un mayor tamaño, permite que solamente encajen en el sitio activo los AINES de menor tamaño, como son los inhibidores no selectivos de la COX (Ahmadi et al., 2022).



*Figura 1. Comparación de los residuos del sitio activo de la enzima COX-1 y COX-2. a) Sitio activo de la COX-1: Arg120 (verde), Tyr355 (amarillo), Tyr385 (naranja) e ILE434 (azul). (b) Sitio activo de la COX-2: Arg120 (verde), Tyr355 (amarillo), Tyr385 (naranja) y Val 523 (fucsia).*

### **Introducción a los AINES**

Los antiinflamatorios no esteroideos (AINES) son fármacos ampliamente usados debido a sus propiedades antiinflamatorias, analgésicas y antipiréticas. Estos fármacos se clasifican por su estructura química y su mecanismo de acción. En cuanto a su estructura química se encuentran los derivados de ácido salicílico, derivados del ácido acético y fenilacético, derivados de ácido propiónico, derivados del ácido fenámico y derivados del ácido enólico (Bindu et al., 2020; Tomić et al., 2017a).

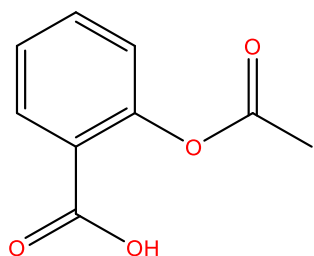
La clasificación según el mecanismo de acción se divide en AINES selectivos y no selectivos de la enzima COX. Los fármacos no selectivos, conocidos también como AINES convencionales, inhiben tanto a la enzima COX-1 y a la COX-2, algunos muestran mayor preferencia por alguna de las dos, sin embargo, la inhibición ocurre en ambas isoformas de la enzima. Por otra parte, están los inhibidores selectivos de la COX-2 que como su nombre lo indica, inhiben exclusivamente a la ciclooxigenasa de tipo 2; estos AINES suelen también nombrarse como coxibs (Bindu et al., 2020).

El mecanismo de inhibición de los AINES sobre la COX se da por medio de una inhibición competitiva. La inhibición competitiva se da cuando el ligando, es este caso el fármaco, compete con el sustrato endógeno, el ácido araquidónico, en el sitio activo de la enzima. El fármaco impide

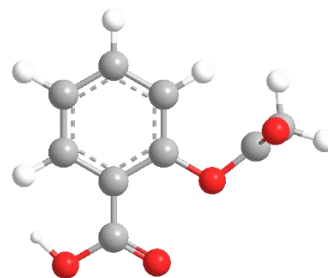
ocupar un lugar en el sitio catalítico e impide la fijación del ácido araquidónico en la COX evitando la síntesis enzimática de prostaglandinas; este mecanismo se ve refleja en las principales acciones farmacológicas de los AINES (Bacchi et al., 2012; Richard et al., 2023)

### **Ácido Acetilsalicílico**

El ácido acetilsalicílico (AAS) o el ácido 2-acetiloxybenzoico (según nomenclatura IUPAC), con peso molecular de 180.16 g/mol es un fármaco que además de ser usado por sus propiedades características de los AINES, también se emplea como anticoagulante. Esta molécula inhibe de forma no selectiva a la COX y a diferencia de los demás fármacos de este grupo, el ácido acetilsalicílico no inhibe de forma competitiva (o reversible) a la enzima, sino lo hace de forma irreversible acetilando el residuo Ser530 (National Center for Biotechnology Information, 2024a). Obsérvese su estructura en 2D y 3D en las **Figuras 1 y 2**, respectivamente.



*Figura 2. Estructura bidimensional del ácido acetilsalicílico.*



*Figura 3. Estructura tridimensional del ácido acetilsalicílico.*

### **Ibuprofeno**

El ácido 2-(4-Isobutilfenil)propanoico o ibuprofeno es un AINE derivado del ácido propiónico cuyo peso molecular es de 206.28 g/mol. Es un fármaco ampliamente utilizado debido a que se considera uno de los AINES más seguros y generalmente es bien tolerado. En los productos comerciales, el ibuprofeno se administra como una mezcla racémica. Después de su administración, *in vivo*, el enantiómero R se convierte en el enantiómero S, mediante la acción de la alfa-metilacil-CoA racemasa. Se sugiere que el enantiómero S tiene una actividad farmacológica más potente que el enantiómero R (National Center for Biotechnology Information, 2024d). Obsérvese su estructura en 2D y 3D en las **Figuras 4 y 5**, respectivamente.

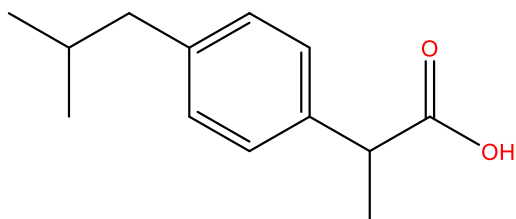


Figura 4. Estructura bidimensional del ibuprofeno.

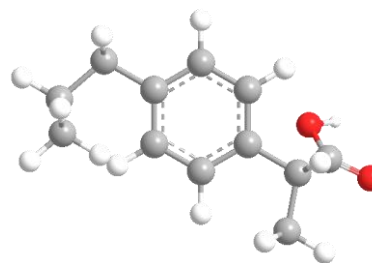


Figura 5. Estructura tridimensional del ibuprofeno.

### Diclofenaco

El diclofenaco es un derivado del ácido fenilacético, su nomenclatura IUPAC es ácido 2-((2,6-Diclorofenil)amino)fenil)acético y su peso molecular es 269.1 g/mol. Junto con otros AINES, es un fármaco de primera elección para el tratamiento del dolor y la inflamación tanto crónica como aguda. La adición de dos grupos cloro en la posición orto del anillo fenílico fija el anillo en una torsión máxima, lo cual parece estar relacionado con una mayor potencia. Este fármaco es formulado en forma de su sal sódica (National Center for Biotechnology Information, 2024c). Obsérvese su estructura en 2D y 3D en las **Figuras 6 y 7**, respectivamente.

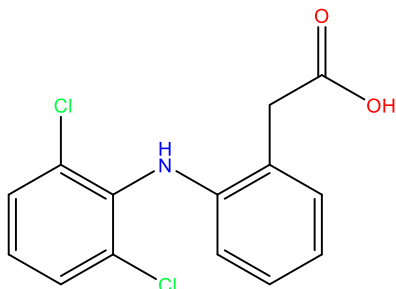


Figura 6. Estructura bidimensional del diclofenaco.

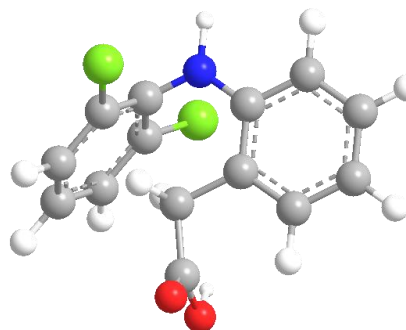


Figura 7. Estructura tridimensional del diclofenaco.

### Naproxeno

El ácido (S)-2-(6-metoxynaftalen-2-yl)propanoico o naproxeno es un derivado del ácido propiónico y tiene un peso molecular de 230.26 g/mol. Es un fármaco ampliamente empleado en el tratamiento de diferentes tipos de artritis y en la terapia de otra clase de dolores clasificados como leve-moderados, es decir, su principal uso farmacológico es como analgésico (National Center for Biotechnology Information, 2024g). Obsérvese su estructura en 2D y 3D en las **Figuras 8 y 9**, respectivamente.



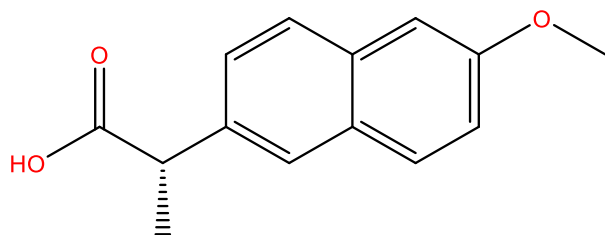


Figura 8. Estructura bidimensional del naproxeno.

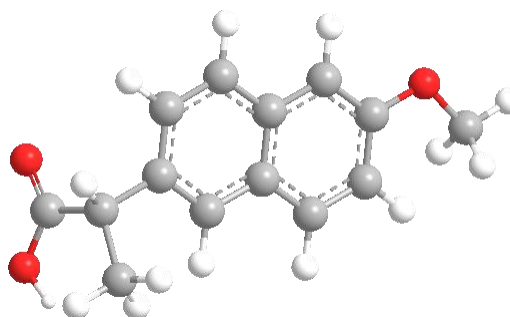


Figura 9. Estructura tridimensional del naproxeno.

### Celecoxib

El celecoxib es una molécula con un peso molecular de 381.4 g/mol y su denominación IUPAC es 4-[5-(4-metilfenil)-3-(trifluorometil)pirazol-1-yl]bencenosulfonamida. Es un fármaco de la clase de los pirazoles y también es usado frecuentemente en patologías como la artritis, además también en artrosis y en pacientes con poliposis adenomatosa familiar. Es un fármaco que se encuentra bajo patente por la empresa Pfizer y su nombre comercial es Celebrex (National Center for Biotechnology Information, 2024b). Obsérvese su estructura en 2D y 3D en las Figuras 10 y 11, respectivamente.

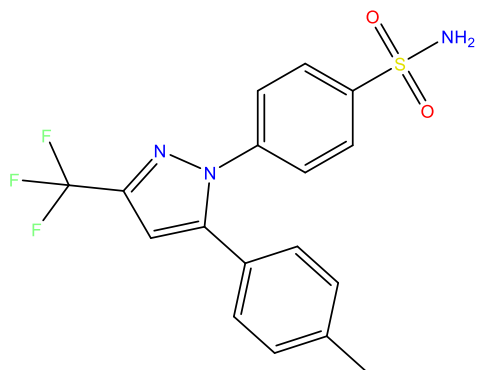


Figura 10. Estructura bidimensional del celecoxib.

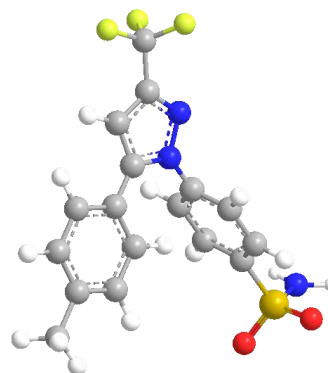
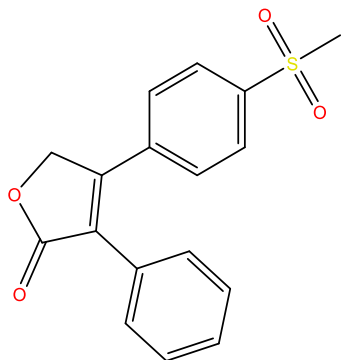


Figura 11. Estructura tridimensional del celecoxib.

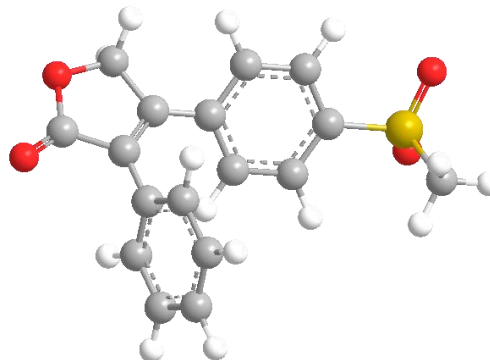
### Rofecoxib

El 3-(4-metilsulfonilfenil)-4-fenil-2H-furan-5-ona o rofecoxib es una molécula butenólida con un peso molecular de 314.4 g/mol. Este es un fármaco administrado especialmente en paciente con osteoartritis, artritis y migrañas. El fármaco solía comercializarse bajo la patente de la empresa Merck, sin embargo, esta lo retiró voluntariamente del mercado debido a que fue

asociado a un incremento del riesgo de ocasionar ictus e infarto del miocardio (National Center for Biotechnology Information, 2024e). Obsérvese su estructura en 2D y 3D en las **Figuras 12 y 13**, respectivamente.



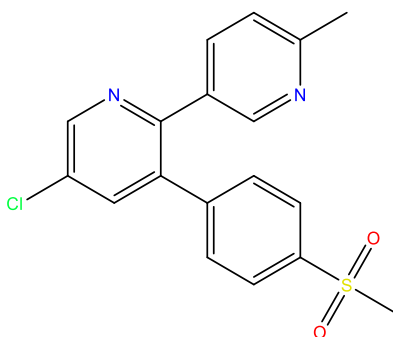
*Figura 12. Estructura bidimensional del rofecoxib.*



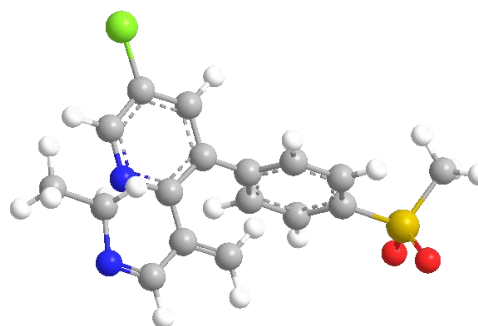
*Figura 13. Estructura tridimensional del rofecoxib.*

## **Etoricoxib**

El etoricoxib es una molécula con un peso molecular de 358.8 g/mol y su nomenclatura IUPAC es 5-cloro-2-(6-metilpiridin-3-il)-3-(4-metilsulfonilfenil)piridina. Es un fármaco que además de sus propiedades analgésicas, antipiréticas y antiinflamatorias, también posee propiedades antineoplásicas. Es empleado en padecimientos como dolor agudo, dolor lumbar crónico, espondilitis anquilosante, osteoartritis, artritis reumatoide y gota (National Center for Biotechnology Information, 2024f). Obsérvese su estructura en 2D y 3D en las **Figuras 14 y 15**, respectivamente.



*Figura 14. Estructura bidimensional del etoricoxib.*



*Figura 15. Estructura tridimensional del etoricoxib.*

### **Riesgos Asociados a los AINES y Desarrollo de AINES Selectivos de la COX-2**

Si bien los AINES son fármacos bien tolerados, y por ello son medicamentos de venta libre o over-the-counter (OTC), es considerable el número de reacciones adversas que han sido reportadas como resultado de un uso irracional, administración crónica y/o elevadas dosis de dichos medicamentos. Las reacciones adversas más frecuentes se dan a nivel del sistema gastrointestinal, cardiovascular y renal, sin embargo, también se han documentado reacciones adversas el sistema en nervioso central (SNC), hematológico, reproductivo, además de las reacciones de hipersensibilidad que también pueden ocasionar (Tomić et al., 2017).

Las reacciones adversas más frecuentes son las de tipo gastrointestinal. Estas reacciones se manifiestan como dispepsia, hinchazón, náuseas, anorexia, úlcera gástrica e incluso hemorragia en el tracto gastrointestinal. Los eventos gastrointestinales asociados a los AINES se han vinculado con el compromiso de la mucosa gástrica consecuencia de la inhibición de la enzima COX-1. La COX-1 inhibe prostaglandinas y prostaciclina de tipo gastroprotectores, la prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) y la prostaglandina I<sub>2</sub> (PGI<sub>2</sub>); es por ello, que su inhibición resulta en daños del tracto gastrointestinal tanto superior como inferior (Bindu et al., 2020; Peura & Goldkind, 2005; Tomić et al., 2017a).

Los diversos efectos cardiovasculares significativos se deben a la influencia de los AINES en la síntesis de eicosanoides mediante la inhibición de las enzimas COX-1 y COX-2. La COX-1, presente en las plaquetas, es responsable de la producción de tromboxano A<sub>2</sub>, el cual promueve la agregación plaquetaria, la vasoconstricción y la proliferación de células musculares lisas. Por otro lado, la COX-2, expresada en las células endoteliales, media la producción de prostaciclina, un potente vasodilatador y un inhibidor de la agregación plaquetaria. La inhibición de la COX-2 por los AINES selectivos (coxibs) reduce la producción de prostaciclina sin afectar la síntesis de tromboxano, lo cual puede desequilibrar la homeostasis vascular y aumentar el riesgo de eventos trombóticos. Este desequilibrio se asocia con un mayor riesgo de trombosis y otros eventos cardiovasculares adversos. Por otro lado, los AINES no selectivos, como el ibuprofeno y el naproxeno, inhiben tanto COX-1 como COX-2, lo que equilibra la reducción de prostaciclina con la inhibición de la función plaquetaria, aunque no exentos de riesgo cardiovascular. Adicionalmente, el precondicionamiento miocárdico, un mecanismo protector contra la isquemia, también es afectado por la inhibición de COX-2, ya que esta enzima es crucial para los efectos cardioprotectores mediados por prostaglandinas PGE<sub>2</sub> y PGI<sub>2</sub> (Batlouni, 2010a; Jones & Power, 2005; Schjerning et al., 2020).

Así mismo, los AINES tienen significativos efectos renales. La COX-1 es responsable de la producción de prostaglandinas que mantienen la perfusión renal y la tasa de filtración glomerular, principalmente mediante la dilatación de las arterias aferentes y la redistribución del flujo sanguíneo renal hacia las nefronas intramedulares. La inhibición de la COX-1 por AINES puede llevar a una disminución de la perfusión renal, vasoconstricción, isquemia medular y, en casos extremos, insuficiencia renal aguda. Por otro lado, la COX-2, que se expresa en respuesta a inflamación y lesión, también juega un papel crucial en la regulación del flujo sanguíneo renal y la excreción de sodio y agua. La inhibición de COX-2 puede provocar retención de líquidos, edema, hipertensión y desequilibrios electrolíticos, exacerbando condiciones como la insuficiencia cardíaca y renal. Además, los AINES reducen la producción de prostaglandinas que antagonizan la acción de la vasopresina, lo que puede resultar en una menor excreción de agua y sodio, agravando aún más la disfunción renal. La inhibición combinada de COX-1 y COX-2 compromete los mecanismos autorreguladores del riñón, aumentando el riesgo de nefrotoxicidad, particularmente en pacientes con afecciones preexistentes como hipovolemia o insuficiencia renal crónica (Batlouni, 2010).

Además, investigaciones preliminares han indicado que los inhibidores selectivos de la COX-2 podrían tener beneficios terapéuticos en pacientes con Alzheimer, debido a la alta producción de COX-2 observada en las placas amiloides del cerebro. Sin embargo, se necesita más investigación para confirmar su impacto en el deterioro cognitivo y los efectos secundarios en estos pacientes. En el sistema reproductivo, las prostaglandinas regulan procesos cruciales como la ovulación y la menstruación. Los AINES, al inhibir la producción de PG endometriales, reducen el dolor de la dismenorrea primaria. La COX-2, en particular, parece jugar un papel en la ovulación y el embarazo, estando presente en los ovocitos en desarrollo y en el útero, lo que sugiere que los inhibidores selectivos de la COX-2 podrían influir en estos procesos, aunque aún se requieren más estudios para comprender plenamente sus efectos (Salido et al., 2001).

### **Interacciones Enzima-Ligando**

Las enzimas son macromoléculas que poseen alta especificidad al discriminar ligandos. El poder catalítico y la especificidad de las enzimas se debe a la capacidad de formar enlaces covalentes y no covalentes con el ligando. Los grupos funcionales de la enzima, como pueden ser aminoácidos de cadenas laterales, iones metálicos o coenzimas, pueden formar enlaces covalentes transitorios con el ligando. Estas reordenaciones de tipo covalente tienden a disminuir la energía de activación y por lo tanto aceleran la reacción. Sin embargo, son los enlaces no covalentes los principales responsables de disminuir la energía de activación. El complejo

enzima-ligando esta mediada por fuerzas que además de hacer posible la reacción enzimática, también permiten estabilizar la estructura proteica. La formación de enlaces débiles en el complejo permite la liberación de energía libre, la misma que convierte la reacción en una interacción favorable. La energía que proviene de las interacciones mediante la formación de enlaces entre la enzima y el ligando se denomina *energía de fijación o energía de unión*, esta es la energía que contribuye tanto a la catálisis como a la especificidad (Lehninger, 2008).

Los cuatro tipos principales de enlaces no covalentes son: interacciones electrostáticas, puentes de hidrógeno, fuerzas de Van der Waals y las interacciones hidrofóbicas. Las interacciones electrostáticas tienen lugar cuando un grupo cargado de una molécula puede atraer otro grupo con carga opuesto de una molécula diferente. A su vez, los puentes de hidrógeno se forman cuando un átomo de hidrógeno está parcialmente compartido entre dos átomos electronegativos. El grupo donador del enlace de hidrógeno, o sea, el grupo al cuál el hidrógeno está unido covalentemente, desarrolla una electronegatividad con carga parcial positiva ( $\delta^+$ ), lo que permite que el átomo de hidrógeno interactúe con un átomo que posea una carga parcial negativa ( $\delta^-$ ). Este tipo de enlace no covalente suele tener energías que pueden variar entre 1-5 kcal/mol. También, existen puentes de hidrógeno no convencionales. Estos son enlaces carbono-hidrógeno, si bien estos son una variación de los puentes de hidrógeno convencionales, la fuerza de enlace es menor, pudiendo encontrarse valores entre 1-2 kcal/mol. Este tipo de interacción en lugar de formarse entre un hidrógeno unido a átomos electronegativos y otro átomo electronegativo, se da entre un donante de hidrógeno menos electronegativo como un carbono y otro átomo altamente electronegativo (Stryer et al., 2007).

También se encuentran las interacciones de Van der Waals, estas son fuerzas intermoleculares débiles que incluyen fuerzas de dispersión (o de London), fuerzas dipolo-dipolo y fuerzas dipolo inducido. Las fuerzas de dispersión surgen de fluctuaciones temporales en la densidad electrónica, induciendo dipolos instantáneos que atraen a otras moléculas. Las fuerzas dipolo-dipolo ocurren entre moléculas polares debido a la atracción entre dipolos permanentes. Las fuerzas dipolo inducido se producen cuando un dipolo permanente induce un dipolo en una molécula no polar adyacente. Las energías asociadas a este tipo de interacción pueden fluctuar entre 0.5-1 kcal/mol. Finalmente, las interacciones hidrofóbicas son fuerzas atrayentes entre regiones no polares de moléculas. En una enzima, estas interacciones ocurren entre grupos hidrofóbicos del sitio activo y ligandos que también poseen regiones no polares, son fundamentales para estabilizar la unión entre la enzima y su ligando. Esto contribuye a la

especificidad de la unión, la estabilidad del complejo enzima-ligando y la eficiencia catalítica al reducir la interferencia del agua en el sitio activo (Stryer et al., 2007).

Si bien, las interacciones mencionadas anteriormente son los principales enlaces no covalentes que se forman entre el complejo enzima-ligando, también existen otros enlaces débiles mencionados por la literatura. Entre estos se encuentran las interacciones conocidas como  $\pi$ -stacking (apilamiento  $\pi$ ), también conocidas como interacciones  $\pi$ - $\pi$ , interacción aromática, interacción aromática-aromática, etc. El apilamiento de anillos aromáticos es una interacción que facilita la unión de ligandos al sitio activo de la enzima. Según el modelo de Hunter & Sanders (1990), la interacción  $\pi$ -stacking implica una atracción esencial entre cuadrupolos, que contrarresta la repulsión entre las nubes electrónicas. Estos sistemas  $\pi$  conjugados típicamente tienen un centro rico en electrones ( $\pi$ -básico) que puede interactuar con átomos de hidrógeno débilmente polarizados. El centro de un anillo aromático también puede ser deficiente en electrones ( $\pi$ -ácido), permitiendo la interacción con pares ricos en electrones como los aniones. Se forman interacciones  $\pi$ - $\pi$  cuando el apilamiento se produce entre dos anillos aromáticos dispuestos paralelamente de forma axial. Mientras que, se conoce como atracción  $\pi$ - $\sigma$  cuando se da una atracción entre un anillo aromático y enlaces tipo  $\sigma$ . A su vez, existen numerosos ejemplos de interacciones de apilamiento  $\pi$  heteroaromático que involucran pares de apilamiento no aromáticos. Es decir, se puede dar la interacción  $\pi$  con átomos de B, C, N, O, S, halógenos, iones, radicales alquilo y pares no apareados (Molcanov & Kojić-Prodić, 2019; Timmer & Mooibroek, 2021).

### **Docking Molecular**

El docking molecular, también conocidos como acoplamiento molecular, es una herramienta fundamental en la búsqueda y selección virtual de compuestos terapéuticos, permitiendo predecir la posición más favorable de interacción entre un ligando y su blanco proteico. Inicialmente desarrollado en 1982, el acoplamiento molecular ha evolucionado significativamente desde entonces, desempeñando un papel crucial en el diseño racional de fármacos. Al emplear algoritmos y funciones de puntuación, este método bioinformático estima la fuerza de la conexión entre los compuestos basándose en su orientación preferencial, lo que resulta esencial para anticipar la actividad biológica de los fármacos. Además, el docking se ha aplicado no solo en la interacción proteína-ligando, sino también en el acoplamiento de macromoléculas, como en el caso del docking proteína-proteína. Aunque existen diversos programas para realizar el docking molecular, es importante recordar que ninguna herramienta es universalmente adecuada para todos los sistemas, lo que resalta la importancia de utilizar múltiples enfoques para obtener

resultados más confiables energía (Muhammed & Aki-Yalcin, 2022; Novikov & Chilov, 2009; Raval & Ganatra, 2022; Torrez & Enrique, 2019).

El proceso de docking molecular implica dos tareas interrelacionadas: el muestreo de posibles estados conformacionales del complejo proteína-ligando y el cálculo de la energía libre de tales complejos o la producción de una puntuación que se correlaciona con la actividad biológica. Tanto el muestreo como la puntuación son cruciales, ya que un muestreo deficiente podría pasar por alto los mejores candidatos en el espacio de búsqueda, mientras que una puntuación deficiente distorsionaría la superficie de energía potencial y conduciría a estimaciones incorrectas de estructura y energía (Muhammed & Aki-Yalcin, 2022; Novikov & Chilov, 2009; Raval & Ganatra, 2022a; Torrez & Enrique, 2019).

Las funciones de puntuación se clasifican típicamente en tres grupos: campo de fuerza, empíricas y basadas en conocimientos. Las funciones de puntuación del campo de fuerza cuantifican la energía potencial de un complejo como una suma de términos energéticos derivados de interacciones ligadas y no ligadas. Por otro lado, las funciones de puntuación basadas en conocimientos utilizan coordenadas tridimensionales de un conjunto grande de complejos proteína-ligando como una base de conocimientos, evaluando la similitud estructural de un complejo proteína-ligando con los existentes en la base de conocimientos. Las funciones de puntuación empírica calculan la energía libre de unión como una suma de términos contribuyentes identificados con contribuciones físico-químicas distintas a la energía libre de unión. A pesar de su utilidad, estas funciones de puntuación no tienen en cuenta completamente algunos procesos físicos importantes para el reconocimiento molecular, lo que limita su capacidad para seleccionar y ordenar pequeñas moléculas por sus afinidades de unión calculadas (Ballester & Mitchell, 2010).

### **Aplicaciones del Docking Molecular en el Estudio de AINES**

La aplicación del docking molecular en el estudio de los AINES es esencial para comprender y mejorar su eficacia terapéutica. A través de esta técnica, los investigadores pueden explorar cómo los AINES interactúan con las enzimas ciclooxigenasas (COX-1 y COX-2), fundamentales en la biosíntesis de prostaglandinas y en la modulación de procesos inflamatorios. Por ejemplo, estudios han demostrado que el docking puede revelar la capacidad de ciertos compuestos para inhibir selectivamente la actividad de COX-2, lo que los convierte en candidatos prometedores para el tratamiento de enfermedades como el cáncer, la enfermedad de Alzheimer y otras patologías inflamatorias y neurodegenerativas (Azam et al., 2018; Świątek et al., 2022).

Además, el uso del docking molecular permite no solo entender cómo los AINES interactúan con sus dianas terapéuticas, sino también optimizar su diseño y desarrollo. Mediante la predicción de la interacción molecular entre los compuestos y las enzimas COX, los investigadores pueden modificar estructuras químicas para mejorar la selectividad y la potencia de los AINES, al tiempo que reducen la toxicidad. Esto representa un avance significativo en la búsqueda de tratamientos más efectivos y seguros para una amplia gama de enfermedades (Moussa et al., 2021; Świątek et al., 2017).

El docking también desempeña un papel crucial en la identificación y priorización de nuevos compuestos con potencial terapéutico. Al utilizar modelos farmacofóricos y QSAR (Modelos de Relación Cuantitativa Estructura-Actividad), los investigadores pueden virtualmente tamizar grandes bases de datos de compuestos en busca de ligandos prometedores para COX-2. Esta estrategia ha llevado al descubrimiento de nuevos inhibidores de COX-2 con actividades biológicas previamente desconocidas, lo que demuestra el potencial del docking para acelerar el proceso de desarrollo de fármacos (Moussa et al., 2021).

En el campo del acoplamiento molecular, existen diversos programas que pueden clasificarse en tres categorías principales: rígidos, flexibles e híbridos. Los programas de docking rígido consideran tanto al ligando como al receptor como estructuras inmóviles durante el proceso de acoplamiento, simplificando así los cálculos a expensas de la precisión. Por otro lado, los programas de docking flexible permiten que el ligando, el receptor, o ambos, adopten múltiples conformaciones, lo que incrementa la precisión del acoplamiento, pero también la demanda computacional (Raval & Ganatra, 2022). Los programas híbridos, conocidos como de "cuerpo rígido-flexible", combinan estos enfoques al permitir cierta flexibilidad en partes específicas del ligando o del receptor mientras mantienen otras áreas rígidas, logrando un equilibrio entre precisión y eficiencia. Además, estos programas pueden ser tanto gratuitos como comerciales, ofreciendo diferentes niveles de funcionalidad y soporte dependiendo de su costo y licencia. Entre los programas más populares usados por investigadores están: AutoDock Tools, que emplea un modelo híbrido y es de acceso gratuito; DOCK, que desarrolla un modelo de tipo flexible al igual que LeDock; y también los softwares de paga, entre estos están FlexX, que usa un modelamiento híbrido, y Glide y GOLD, que usan métodos de acoplamiento de tipo flexible. Si bien existen muchos otros softwares que pueden adaptarse a las necesidades de los investigadores, estos son los más mencionados por la literatura (Muhammed & Aki-Yalcin, 2022; Novikov & Chilov, 2009).



En resumen, el uso del docking molecular en el estudio de los AINES es fundamental para mejorar nuestra comprensión de estos compuestos y sus interacciones con las enzimas COX. Esta técnica no solo facilita el diseño y desarrollo de nuevos fármacos, sino que también acelera la identificación de compuestos prometedores para el tratamiento de diversas enfermedades inflamatorias y relacionadas.

## METODOLOGÍA

En esta sección se describen los métodos y procedimientos utilizados para realizar el estudio de docking computacional de AINES selectivos y no selectivos de la COX-2. Se detallan los pasos seguidos desde la preparación de los compuestos y proteínas hasta el análisis de los resultados obtenidos.

### **Preparación de los Ligandos**

#### ***Selección de los AINES***

Para este estudio se revisaron investigaciones locales previas que analizaron el uso de AINES más comunes en estas áreas. Según los estudios de Jara et al.(2011) y Encalada et al.(2015), se identificaron los AINES de mayor consumo y se seleccionaron siete de ellos para el análisis in silico. Jara et al. encontró que el 69,6% de los hogares de la parroquia San Blas recurría al uso de AINES, mientras que Encalada et al. reportó que en las 15 parroquias urbanas de Cuenca, el 26% de los adultos mayores utilizaba AINES de manera prolongada para controlar síntomas. A partir de estos datos, se eligieron los fármacos a estudiar. Se seleccionaron cuatro AINES no selectivos, que inhiben tanto COX-1 como COX-2: ácido acetilsalicílico, ibuprofeno, diclofenaco y naproxeno. Además, se incluyeron tres inhibidores selectivos de COX-2 (coxibs): celecoxib, rofecoxib y etoricoxib.

#### ***Obtención de los Ligandos***

Las estructuras moleculares de cada uno de los AINES fueron obtenidas de la plataforma virtual PubChem, en formato 3D sdf.

#### ***Preparación de los AINES***

En la preparación de los ligandos se realizó una optimización geométrica y minimización de energía empleando el software Avogadro 1.2.0 (Hanwell et al., 2012). Se ejecutó la optimización de cada fármaco uno a uno empleando la Herramienta de Auto Optimización en los parámetros MMFF94. Finalmente, se procedió a guardar un archivo final de cada molécula en formato pdb.

### **Preparación de las Proteínas**

#### ***Obtención de la Estructura Proteica***

La estructura enzimática de la COX-2 se obtuvo de la plataforma virtual Protein Data Bank (PDB). Para la elección de la estructura para el estudio computacional se evaluaron criterios de resolución, mientras menor sea el valor, la resolución será mejor, por ello se eligen estructuras que muestren una resolución igual o menor a 3.00 Å. También se consideraron las puntuaciones

percentiles para las métricas de validación global, la presencia de cofactores, la no presencia de mutaciones y que hayan sido obtenidas a partir de células eucariotas.

La enzima elegida después del análisis de dichos criterios fue la 1CX2. Esta enzima de la plataforma PDB con una resolución de 3.00 Å, se obtuvo a partir del organismo *Mus musculus*, el factor HEM (cofactor de la enzima) poseía un valor óptimo según la evaluación de la calidad de la estructura del ligando y la enzima se encontraba en su forma nativa.

### ***Preparación de la Proteína***

La enzima fue descargada en formato pdb. Esta molécula además de contar con el grupo HEM en cada cadena, venía acoplada con un inhibidor selectivo denominado como SC-558, el mismo que fue eliminado de la estructura, aquí, además de eliminar a las moléculas SC-558 también se eliminaron las conectividades para de esta manera evitar complicaciones en el momento de la ejecución del docking.

### **Configuración del Docking**

#### ***Software de Docking***

Se empleó el software AutoDockTools 1.5.7, el mismo que integra AutoDock 4 (G. Morris et al., 2009) y AutoDock Vina (Eberhardt et al., 2021). La combinación de estas herramientas simplifica el proceso de preparación, realización y análisis de experimentos. Ofrece la detallada configurabilidad de AutoDock 4 junto con la rapidez y precisión de AutoDock Vina, todo presentado en una interfaz gráfica amigable cortesía de AutoDockTools.

El análisis principal del docking se realizó empleando AutoDock 4 y AutoDock Vina se empleó para la comparación de los resultados. AutoDock 4 lleva a cabo el docking molecular usando un algoritmo genético que explora el espacio conformacional del ligando, identificando las orientaciones óptimas en el sitio de unión; requiere la preparación de archivos de entrada específicos y una configuración de parámetros detallada. Mientras que AutoDock Vina ejecuta empleando un algoritmo de minimización de gradiente, el cual se caracteriza por su mayor rapidez y eficiencia en comparación con el algoritmo genético utilizado por AutoDock 4. Esta opción alternativa provee una solución más ágil y precisa, al mismo tiempo que simplifica la configuración requerida para llevar a cabo los estudios.

#### ***Configuración del Grid***

La configuración del grid se realizó a partir de la identificación del sitio activo según la investigación realizada por los autores que obtuvieron la estructura tridimensional de la enzima

1CX2 empleada en este estudio. Kurumbail et al. (1996) identificaron en su estructura que el sitio activo de la COX-2 está constituido por los residuos Arg120, Tyr355, Tyr385 y Val523. Previo a setear el grid, se escoge como receptor/macromolécula a la COX-2 y como ligando al fármaco correspondiente a cada ejecución. La caja del grid se construyó alrededor de estos residuos con dimensiones de 50x50x50 en los ejes x,y,z, con un espaciado de 0.414 y el centro de 24.447, 22.535 y 16.327 en los ejes x,y,z, respectivamente. Para finalizar la configuración, se guardan estos parámetros en formato Grid Parameters File (gpf).

### ***Parámetros del Docking***

En los parámetros del docking en AutoDock 4 se escoge el receptor que es la COX-2 tipo rígido, el ligando es cada fármaco correspondiente, algoritmo de tipo genético de tipo Lamarckiano con las opciones predeterminadas. Finalmente, se almacenan los parámetros en formato Docking Parameters File (dpf).

### **Ejecución del Docking**

#### ***AutoDock 4***

El diagrama de flujo a continuación ofrece una visión clara y simplificada del proceso integral de docking molecular. Desde la preparación inicial de las moléculas, que incluye pasos cruciales como la eliminación de hidrógenos no polares y la configuración del grid, hasta la ejecución del docking y el análisis de los resultados, cada etapa está delineada de manera accesible. Este esquema facilita la comprensión de los procedimientos involucrados, resaltando los pasos esenciales para realizar un estudio de docking molecular de manera eficiente y precisa.

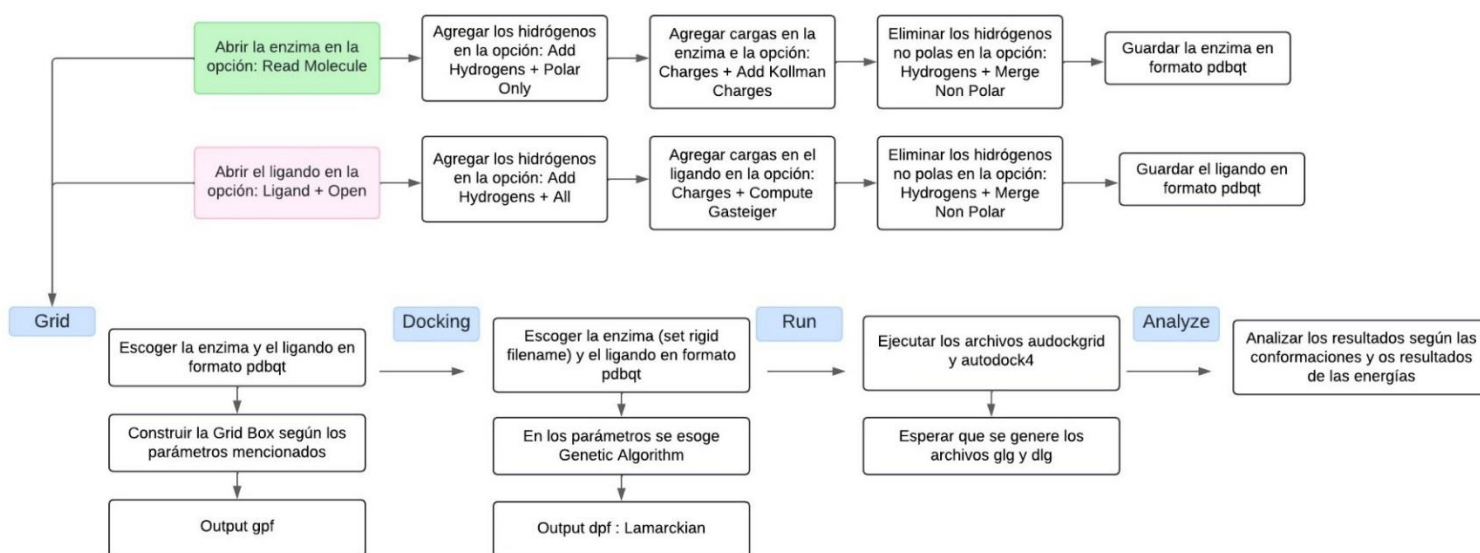


Figura 16. Diagrama de flujo de los pasos ejecutados en el docking en AutoDock 4.

### AutoDock Vina

Para el procedimiento realizado en AutoDock Vina se utilizaron los mismos archivos generados por AutoDock 4 en formato pdbqt tanto de la enzima y el ligando. Posteriormente se realizó el procedimiento que se detalla en la **Figura 17**.

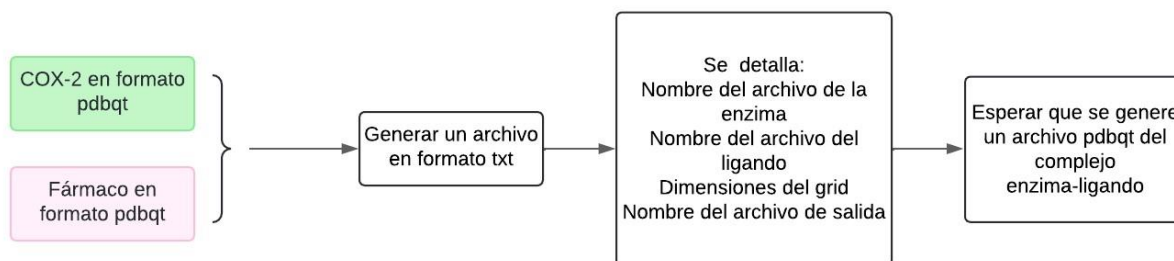


Figura 17. Diagrama de flujo de los pasos ejecutados en el docking en AutoDock Vina.

### Visualización y Análisis de Resultados

Para el análisis y visualización de resultados se emplearon los archivos en formato dlz generados por AutoDock 4. Se escogieron solo los resultados de AutoDock 4 para la visualización de resultados debido a que la interfaz gráfica de este software permite analizar estructuras moleculares, sitio de unión y sus interacciones; a diferencia de AutoDock Vina que brinda información menos detallada sobre la interacción enzima-ligando, y por ello de este software solo se usaron los valores de la energía libre de afinidad para la comparación de resultados.

Para el análisis de las interacciones enzima-ligando se emplearon los softwares PyMOL 3.0.3 (Schrödinger & DeLano, 2020) y Discovery Studio 2021 (BIOVIA, 2021). En el Software PyMOL 3.0.3 se analizaron las interacciones entre el fármaco y el sitio activo de la COX-2 en formato 3D. Mientras que en el programa Discovery Studio 2021 se analizaron dichas interacciones en formato 2D, este software brinda información más detallada y más visual sobre cada una de las interacciones.

### Análisis Estadístico

Para el análisis estadístico se realizó una Prueba T (T test) para evaluar la existencia de diferencias significativas entre la energía de unión entre los valores de los AINES selectivos y no selectivos obtenidos en AutoDock 4. Además, también se comparó mediante este mismo método los

valores obtenidos de los AINES selectivos y no selectivos a través de AutoDock 4 y AutoDock Vina.

Para la ejecución de la Prueba T se empleó un nivel de significancia ( $\alpha$ ) de 0.05 para la posterior comparación con el valor p. Así mismo, el valor del intervalo de confianza empleado fue del 95%. El cálculo de dichos valores estadísticos se realizó mediante el software RStudio versión 1.4.1106 (RStudio Team, 2020).

## RESULTADOS

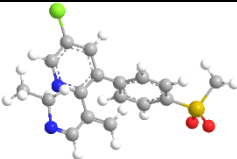
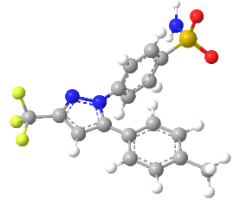
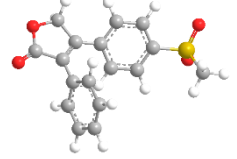
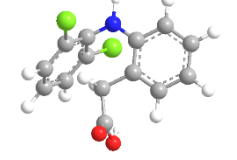
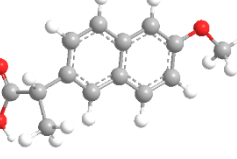
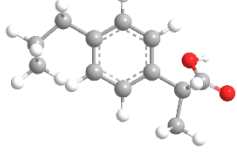
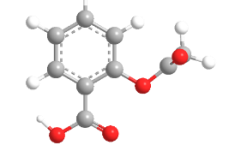
### Resultados de Valores de Afinidad

En esta sección se presentan los valores de la afinidad entre diferentes AINES y la enzima COX-2 obtenidos mediante análisis computacional. Utilizando el software AutoDock4, se evaluaron tanto AINES selectivos como no selectivos, con el fin de determinar las diferencias en sus energías de unión y otras métricas relevantes. A continuación, se detallan los valores de afinidad de unión, los promedios y las desviaciones estándar, así como un análisis comparativo entre los distintos tipos de AINES.

En la **Tabla 1** se reportan los valores de la energía libre de unión y la constante de inhibición ( $K_i$ ) para AINES tanto selectivos como no selectivos en orden descendiente obtenidos mediante AutoDock4. En la misma, se puede observar claramente que los fármacos selectivos de la COX-2 se encuentran encabezando la tabla, lo que indica que los AINES selectivos se unen de forma más favorable a la enzima y, además, la pueden inhibir más eficientemente. Recordemos que, energía libre de unión indica la estabilidad del complejo ligando-receptor; valores negativos sugieren una interacción favorable y espontánea. La constante de inhibición, por su parte, refleja la eficacia de un inhibidor en bloquear una enzima o receptor, con valores menores indicando mayor eficacia.

Los valores de energía de unión son menores para los AINES selectivos que para los no selectivos; lo que representa una interacción más favorable para el primer tipo de AINE. Así mismo, en la tabla se observan que los valores de la constante de inhibición ( $K_i$ ) es mucho menor para los AINES selectivos, factor que indica mayor potencia para inhibir la enzima. Algo que puede llamar mucho la atención es el valor muy alto de la  $K_i$  para el AAS en comparación con los demás fármacos de su grupo. Este evento se puede deber a que el AAS tiene un mecanismo diferente en relación al resto de AINES no selectivos. El AAS en lugar de inhibir competitivamente a la COX, la misma que la acetila de forma permanente.

*Tabla 1. Valores de la Energía Libre de Unión y la Constante de Inhibición para AINES Selectivos y No Selectivos de la COX-2.*

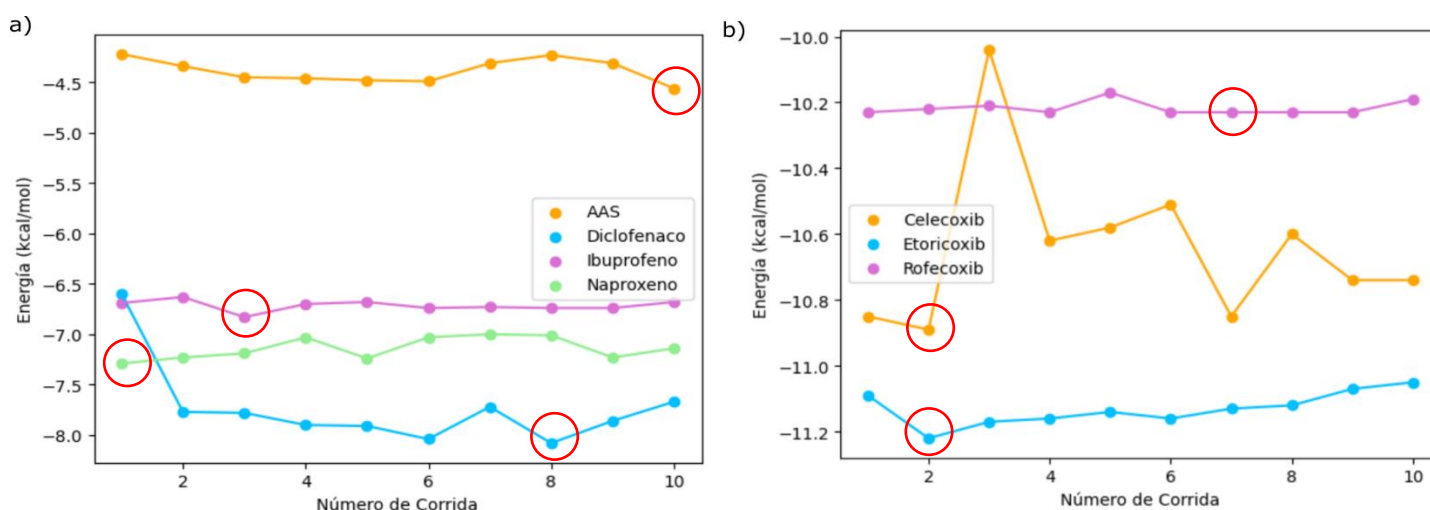
Fármaco	Estructura	Energía Libre de Unión (kcal/mol)	Constante de inhibición $K_i$ ( $\mu$ M)
Etoricoxib		-11.22	0.006
Celecoxib		-10.89	0.0105
Rofecoxib		-10.23	0.0314
Diclofenaco		-8.08	1.19
Naproxeno		-7.29	4.50
Ibuprofeno		-6.83	9.87
AAS		-4.56	452.07

Además, se realizaron gráficas de dispersión en la que se puede observar como varían las energías en cada conformación posicional que realizó AutoDock 4. Para cada fármaco se analizaron 10 conformaciones diferentes, en las que se evaluó la energía de unión en cada una



y de esta forma se determinó cuál fue la posición en la que interacción entre el ligando y la enzima resultó más favorable.

En la **Figura 18** se realizó una comparación entre las gráficas de dispersión obtenidas de los valores de energía de unión en cada una de las diez corridas posicionales de los AINES selectivos y de los AINES no selectivos. El gráfico representa las diferentes conformaciones que adopta el fármaco *in silico* hasta encontrar el posicionamiento con el valor energético más favorable. Los círculos rojos en la figura representan el valor de energía libre de unión menor para cada molécula. En el gráfico (a) se puede observar como la variación de energía de los AINES no selectivos presenta una menor fluctuación energética, a excepción del diclofenaco, que fue el AINE no selectivo con mejor resultado de energía de unión. El mismo muestra una mayor fluctuación en los valores de energía de unión. En la gráfica (b) se representa los valores de energía de unión de los AINES selectivos de la COX-2. Aquí también se observa poca fluctuación de energía para cada fármaco, con excepción del celecoxib que si muestra picos energéticos en los diferentes estados conformacionales respecto a la enzima.



**Figura 18. Comparación de los Diagramas de Dispersión de la Variación de Energía de Unión.**

*a) Variación de la Energía en AINES No Selectivos. b) Variación de Energía en AINES Selectivos.*

Se realizó también un promedio de los valores de energía libre de unión y de la constante de inhibición para cada grupo de fármacos. Para la constante de inhibición de los AINES no selectivos, se excluyó al AAS debido al elevado valor que se obtuvo, causado probablemente por el diferente mecanismo de acción que posee. Los promedios obtenidos se encuentran

representados en la **Tabla 2**, en la que se puede analizar de forma más resumida que la energía libre de unión y la constante de inhibición representan una interacción más favorable y potente para los AINES selectivos que para los AINES no selectivos.

*Tabla 2. Comparación de los valores medios de la energía libre de unión para AINES selectivos y no selectivos de la COX-2.*

	Energía Libre de Unión	Constante de inhibición
	Media (kcal/mol)	(Ki) Media
AINES Selectivos	-10.78 ± 0.50	0.016 ± 0.014
AINES No Selectivos	-6.69 ± 1.51	5.18 ± 4.3

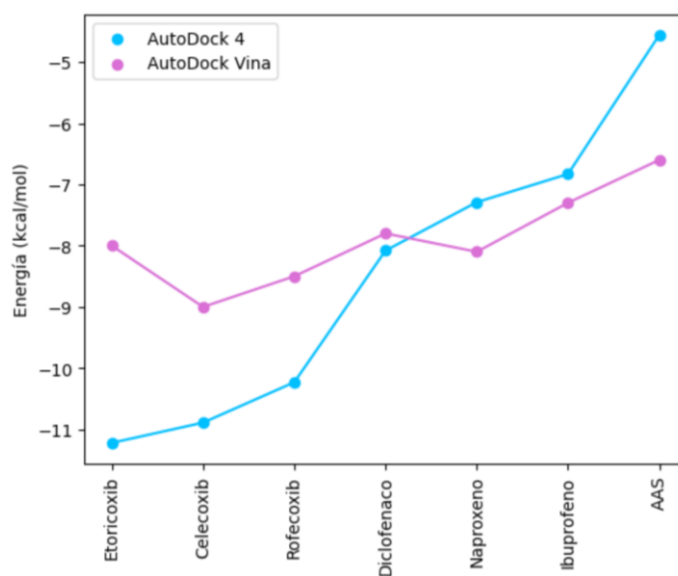
Para afianzar dicha afirmación, se ejecutó un Prueba T en RStudio en la que mediante un valor p de 0.008 se determinó que existe una diferencia significativa entre los valores de energía de unión de los AINES selectivos y no selectivos. Esta diferencia se refleja en cómo actúan estos fármacos en el organismo. Los AINES selectivos, al mostrar una mayor afinidad hacia la COX-2, se unen de manera más eficiente a esta enzima en los sitios inflamados, lo que se traduce en una inhibición más específica de la síntesis de prostaglandinas responsables del dolor y la inflamación, mientras preservan las funciones protectoras de la COX-1 en los tejidos gástricos y renales. Por el contrario, los AINES no selectivos, al unirse tanto a COX-1 como a COX-2, inhiben indiscriminadamente ambas isoenzimas, lo que resulta en efectos adversos como daño gastrointestinal o renal, sobre todo en tratamientos prolongados. Esta diferencia en la energía de unión, por tanto, subraya la importancia de seleccionar el tipo de AINE según el perfil del paciente y la duración del tratamiento para minimizar riesgos y maximizar la eficacia terapéutica.

Por otra parte, se realizó también una comparación entre los mejores valores de energía de unión para cada fármaco analizado según los resultados obtenidos en AutoDock 4 y en AutoDock Vina. En la **Tabla 3** se ilustra en orden descendente los valores de la mejor energía de unión para cada fármaco según los resultados de cada software. En la misma se puede observar que no se obtuvieron resultados idénticos, sin embargo, siguen siendo los AINES selectivos los que encabezan la tabla; con excepción del naproxeno que en los resultados de AutoDock Vina muestra una energía menor que el etoricoxib.

*Tabla 3. Comparación de los Valores de la Energía Libre de Unión para AINES Selectivos y No Selectivos de la COX-2 Según AutoDock 4 y AutoDock Vina.*

AutoDock 4		AutoDock Vina	
Fármaco	Energía Libre de Unión (kcal/mol)	Fármaco	Energía Libre de Unión (kcal/mol)
Etoricoxib	-11.22	Celecoxib	-9.00
Celecoxib	-10.89	Rofecoxib	-8.50
Rofecoxib	-10.23	Naproxeno	-8.10
Diclofenaco	-8.08	Etoricoxib	-8.00
Naproxeno	-7.29	Diclofenaco	-7.80
Ibuprofeno	-6.83	Ibuprofeno	-7.30
AAS	-4.56	AAS	-6.60

Para una mejor comprensión visual de como varían las energías de cada fármaco en los diferentes softwares, se realizó un gráfico de dispersión como se puede viusalizar en la **Figura 19**.



*Figura 19. Diagrama de Dispersión de los Valores de Energía de Unión en AutoDock 4 vs AutoDock Vina.*

Finalmente, en la **Tabla 4** se realizó una comparación de los valores de las medias de la energía libre de unión para cada grupo de fármaco según los dos diferentes softwares. Para comprobar si existían diferencias significativas entre cada software, se realizó otra prueba T en RStudio. Para los AINES selectivos se determinó con un valor p de 0.005 que sí existen valores significativos entre los valores de energía libre de unión para el mismo grupo. Esta situación puede deberse a que los AINES selectivos son moléculas mucho difíciles de analizar debido a

su tamaño y complejidad, es por ello que los resultados pueden variar entre el algoritmo de cada software. Mientras que, en el análisis estadístico de los AINES no selectivos, se obtuvo a partir de un valor p de 0.9815 que no existen diferencias significativas en cuanto a los valores de energía obtenidos por cada uno de los softwares.

Los resultados de la comparación de los valores de energía libre de unión para AINES selectivos y no selectivos tienen importantes implicaciones fisiológicas y terapéuticas. Las diferencias significativas en los AINES selectivos indican que estos fármacos pueden interactuar con la COX-2 de manera más específica, lo que permite una reducción más eficiente de la inflamación y el dolor sin afectar la COX-1, la cual protege la mucosa gástrica y regula el flujo sanguíneo renal. Esta selectividad se traduce en una acción terapéutica más centrada en la inflamación, mejorando la eficacia del tratamiento. En contraste, los AINES no selectivos, al inhibir tanto COX-1 como COX-2, muestran una acción más generalizada que resulta en una reducción más amplia de los síntomas, pero con un perfil de acción más predecible. Estos hallazgos resaltan cómo las interacciones específicas a nivel molecular influyen en la eficacia del tratamiento y subrayan la necesidad de diseñar fármacos que optimicen la acción terapéutica al mismo tiempo que se ajusta la selectividad en la inhibición enzimática para mejorar los resultados clínicos.

*Tabla 4. Promedios de la Energía Libre de Unión de los AINES Selectivos y No selectivos según AutoDock4 y AutoDock Vina.*

AutoDock 4		AutoDock Vina	
Grupo	Energía Libre de Unión (kcal/mol)	Grupo	Energía Libre de Unión (kcal/mol)
AINES Selectivos	-10.78 ± 0.50	AINES Selectivos	-8.5 ± 0.50
AINES No Selectivos	-6.69 ± 1.51	AINES No Selectivos	-7.45 ± 0.66

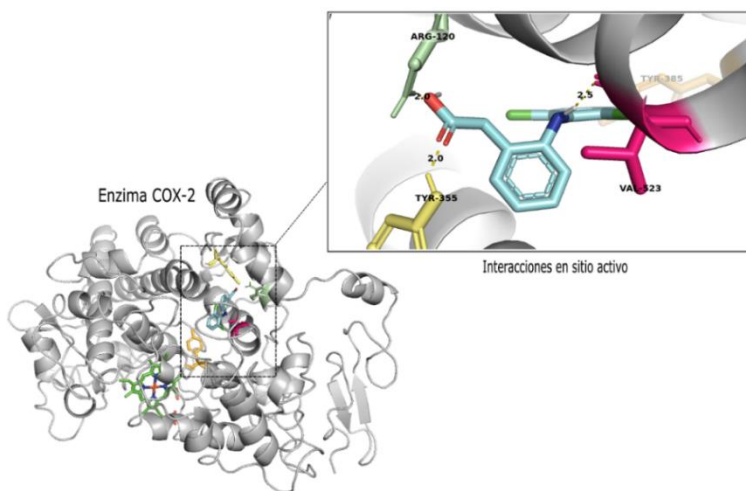
Los valores obtenidos de la energía libre de unión y de la constante  $K_i$  son resultado de las diferentes interacciones en el sitio activo entre cada fármaco y la enzima COX-2. Para una mejor visualización y compresión de dichas interacciones, se elaboraron gráficos en 2D y 3D de las interacciones de cada fármaco al momento de inhibir la enzima. Cada una de las interacciones se detallan a profundidad en la siguiente sección.

## Interacciones AINES No Selectivos

### **Diclofenaco**

El diclofenaco es el AINE convencional que presenta menor energía de unión, lo que significa que es el fármaco con la interacción más estable de los AINES no convencionales evaluados. En la **Figura 20** se ilustra un panorama general de cómo se acopla el ligando en la enzima, además se hace un acercamiento en el que se pueden observar tres puentes de hidrógeno con sus respectivas distancias. El primero es un puente de hidrógeno no convencional entre la cadena lateral del residuo Arg120 y el oxígeno de grupo hidroxilo del diclofenaco a una distancia de 2.0 Å. Otra interacción se observa entre el hidrógeno del grupo anilino y el oxígeno de grupo carboxilo de la Val523 a una distancia de 2.5 Å. Un último puente se forma el hidrógeno de la Tyr355 perteneciente a su grupo hidroxilo, y el oxígeno carbonílico del ligando a una distancia de 2.0 Å.

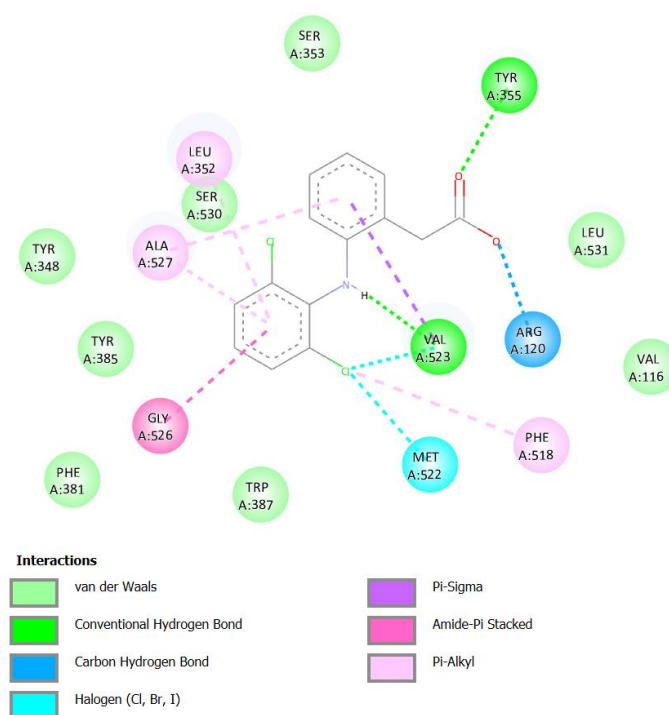
En la **Figura 21** se puede observar con más detalle los diferentes tipos de interacciones según los colores especificados en la leyenda de la imagen. Se ilustra que el complejo en cuestión muestra interacciones tanto de tipo covalente como no covalente. En los puentes de hidrógeno, las más trascendentales para los valores de la energía libre, se visualizan los enlaces que se mencionaron en la estructura 3D.



*Figura 20. Visualización en 3D de los Puentes de Hidrógeno entre el Diclofenaco y la COX-2 en el Sitio Activo.*

Además, en la misma figura también se pueden observar interacciones tipo  $\pi$ . Se forma una interacción  $\pi$ - $\sigma$  entre el anillo bencénico del diclofenaco y la cadena lateral  $-\text{CH}_3$  de la Val523 que se encuentra orientada hacia el ligando. Otra interacción de tipo amida-  $\pi$  stacked se da en

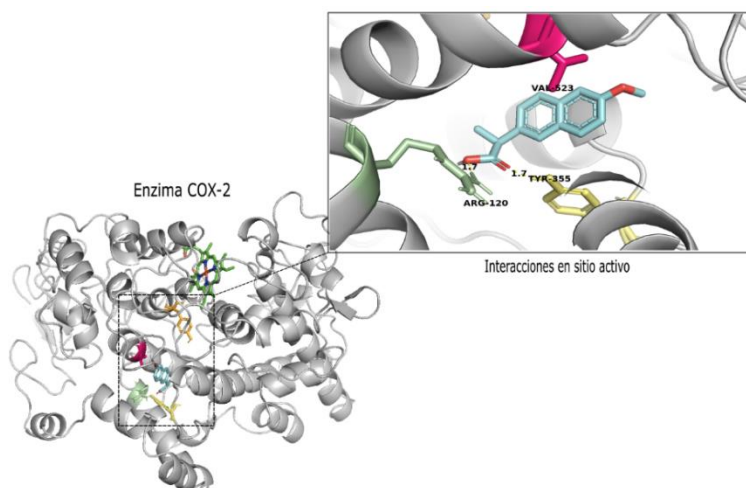
entre el grupo amida de la glicina 526 (Gly) y el segundo anillo aromático del diclofenaco. Finalmente, existen también interacciones de tipo alquilo, tanto de tipo alquilo-  $\pi$  como también interacciones débiles de tipo alquilo- alquilo. El primer tipo se da en los residuos fenilalanina 518 (Phe), leucina 352 (Leu) y alanina 527 (Ala). La interacción con el residuo Phe518 se da entre el anillo bencénico del aminoácido y el radical alquilo del fármaco; por otra parte, la interacción con los otros dos residuos de presenta entre el anillo de benceno del diclofenaco y las cadenas laterales  $-\text{CH}_3$  de los aminoácidos. La interacción de tipo alquilo- alquilo de los residuos Val349 y metionina 522 (Met) se da entre los radicales alquilo de los aminoácidos y del AINE en cuestión. Por último, también se visualizan interacciones mediante fuerzas de Van der Waals entre el ligando y los residuos Val116, Tyr348, serina 353 (Ser), Phe381, Tyr385, triptófano 387 (Trp), Ser530 y Leu531.



*Figura 21. Visualización en 2D del Total de Interacciones entre Diclofenaco y la COX-2 en el Sitio Activo.*

### **Naproxeno**

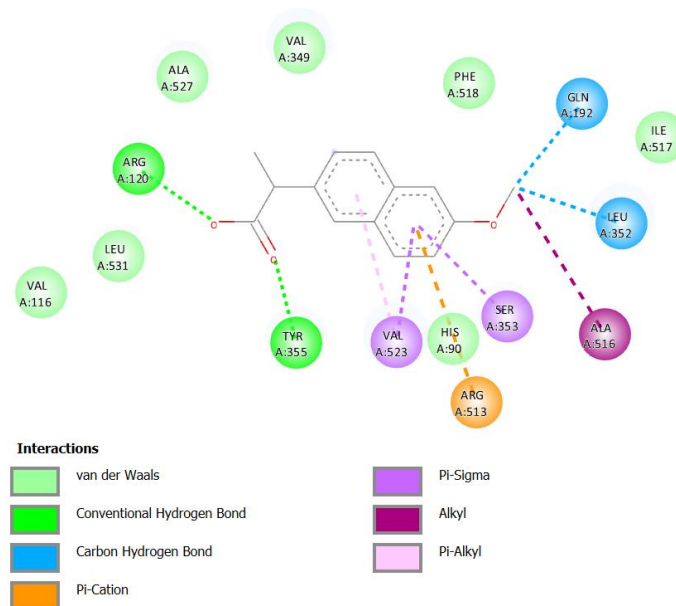
El siguiente AINE convencional con la energía más baja es el naproxeno. Se puede observar que aumenta el valor de energía libre de unión calculado por AutoDock 4, probablemente porque disminuye el número de interacciones enzima-ligando. En las siguientes imágenes se detallan las interacciones que intervienen en la inhibición de la COX-2 mediada por el naproxeno.



*Figura 22. Visualización en 3D de los Puentes de Hidrógeno entre el Naproxeno y la COX-2 en el Sitio Activo.*

En la **Figura 22** se observan dos puentes de hidrógeno. El primero se forma entre el hidrógeno del grupo imínico del residuo Arg120 y el oxígeno del grupo hidroxilo del naproxeno. El segundo puente de hidrógeno se da entre el hidrógeno del hidroxilo de la Tyr355 y el oxígeno del grupo carbonilo del fármaco. Ambas interacciones tienen una distancia de 1.7 Å y los oxígenos que participan en dichas interacciones pertenecen al grupo carboxilo del AINE analizado.

En la **Figura 23** se observan más tipos de interacciones en el complejo naproxeno- COX-2. Además de los puentes de hidrógeno ya mencionados en la imagen previa, se visualizan puentes de hidrógeno no convencionales. Representados por el color azul, se puede visualizar esta interacción entre el oxígeno del grupo amida de la glutamina 192 (Gln) y un hidrógeno del radical alquilo del grupo éter del AINE. Además, también se da otra interacción de esta clase entre el hidrógeno del radical -CH<sub>3</sub> del grupo éter del naproxeno y el oxígeno del carbonilo perteneciente al grupo carboxilo del residuo Leu352.



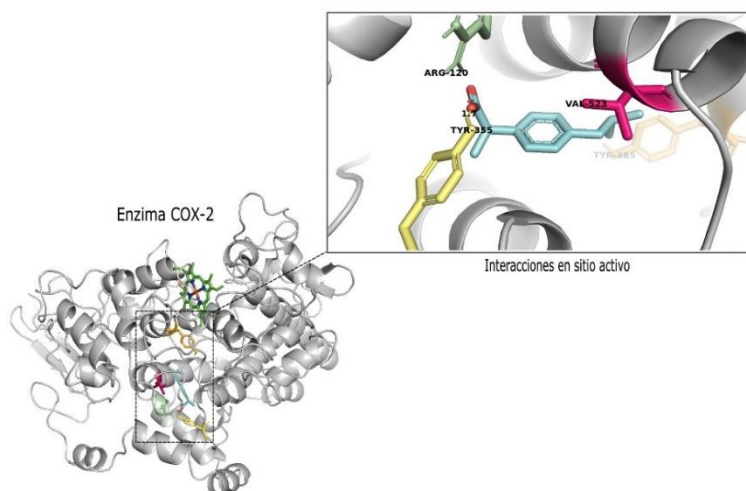
*Figura 23. Visualización en 2D del Total de Interacciones entre Naproxeno y la COX-2 en el Sitio Activo*

Se puede también analizar varias interacciones de tipo  $\pi$ . En primer lugar, se analiza un enlace tipo  $\pi$ - catión que se forma por atracción mediada por la carga positiva de la Arg513 otorgada con el grupo guanidino de su cadena lateral y la nube de electrones  $\pi$  del anillo de benceno. Posteriormente, también se observan interacciones de tipo  $\pi$ -  $\sigma$  entre los enlaces tipo  $\sigma$  de la Val523 y el anillo aromático, y también entre los enlaces  $\sigma$  de Ser353 y el mismo anillo aromático del naproxeno. La última interacción tipo  $\pi$  se da entre el segundo anillo bencénico del naproxeno y el radical isopropilo de la Val523. La siguiente reacción ilustrada en esta imagen indica una interacción no covalente tipo alquilo, entre el radical alquilo de la Ala516 y el radical alquilo del grupo éter del fármaco. Finalmente, las últimas interacciones y las más abundantes son las fuerzas de Van der Waals entre el naproxeno y los residuos histamina 90 (His), Val116, Val349, Ile517, Phe518, Ala527 y Leu531.

### ***Ibuprofeno***

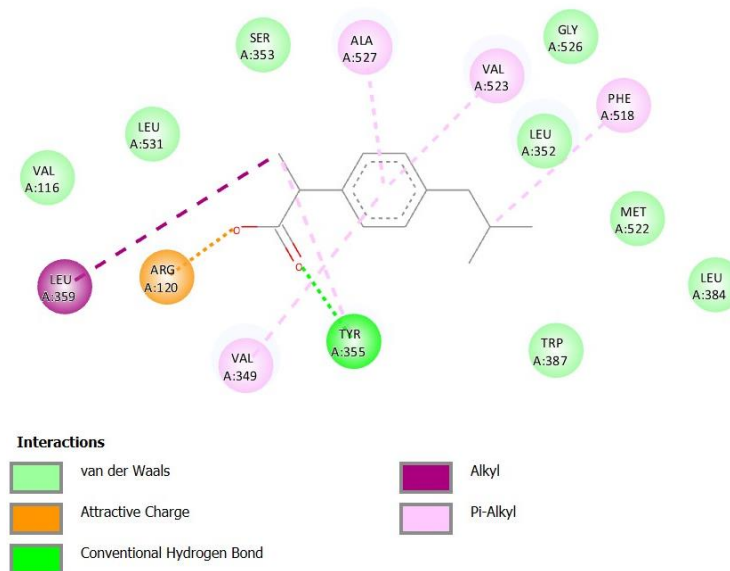
En la **Figura 24** se visualiza como el ibuprofeno, representado en color azul se une a la enzima en su sitio activo, además se realizó un acercamiento del sitio de unión en el que se observa que se forma un puente de hidrógeno entre el oxígeno del grupo carbonilo y el residuo Tyr355 a una distancia de 1.7 Å.





*Figura 24. Visualización en 3D de los Puentes de Hidrógeno entre el Ibuprofeno y la COX-2 en el sitio activo.*

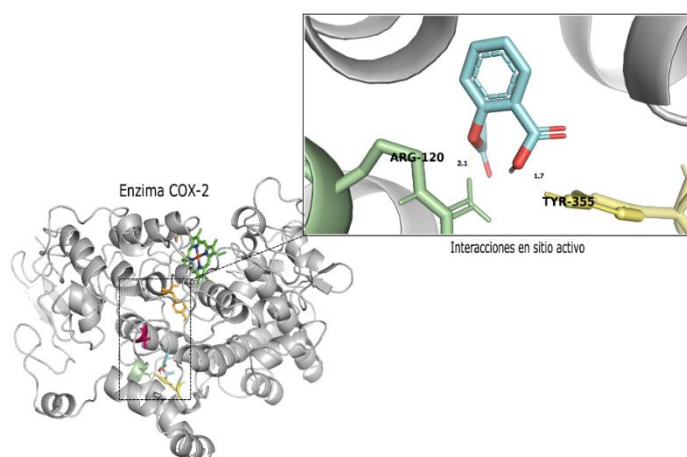
Así mismo, en la **Figura 25** además del puente de hidrógeno ya mencionado, se pueden observar fuerzas de Van der Waals entre el fármaco y los residuos Val116, Leu352, Ser353, Leu383, Trp387, Met522, Gly526 y Leu531. Además, también se observa una atracción de cargas entre el oxígeno desprotonado del grupo carboxilo del ibuprofeno y la carga positiva del residuo Arg120. También se muestra una interacción tipo alquilo entre el radical isobutilo del residuo Leu359 y un radical  $-CH_3$  del ibuprofeno. Finalmente, se da una interacción  $\pi$ -alquilo entre las cadenas laterales de los residuos Val349, Val523 y Ala 527 con el único anillo bencénico del ibuprofeno; a diferencia de la interacción del Phe518 que se da entre el anillo aromático del residuo y el grupo alquilo del fármaco.



*Figura 25. Visualización en 2D del Total de Interacciones entre el Ibuprofeno y la COX-2 en el Sitio Activo.*

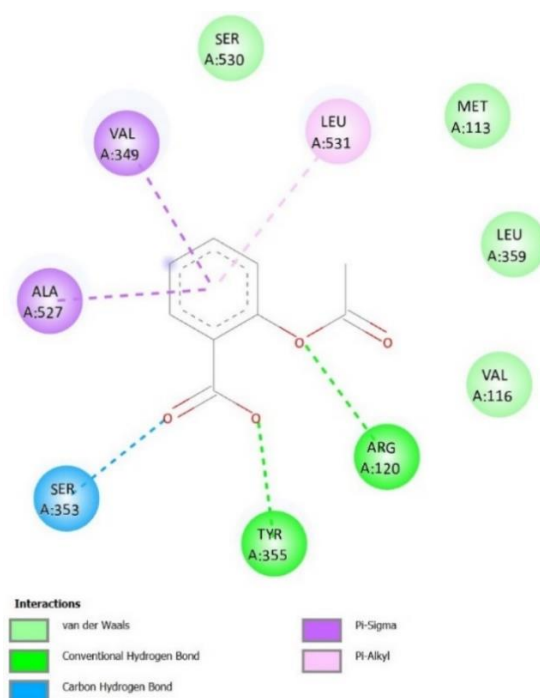
### Ácido Acetilsalicílico

En el acercamiento del sitio activo del complejo AAS- COX-2 en 3D ilustrado en la **Figura 26**, se muestra la formación de dos puentes de hidrógeno. El primer puente de hidrógeno se forma con el hidrógeno de la amina primaria de la cadena lateral del residuo Arg120 y el oxígeno del grupo éter del AAS, a una distancia de 2.1 Å. El siguiente puente de hidrógeno se da entre el hidrógeno del grupo hidroxilo de la Tyr255 y el oxígeno del grupo hidroxilo, que a su vez pertenece al grupo carboxilo del fármaco; a una distancia de 1.7 Å.



*Figura 26. Visualización en 3D de los Puentes de Hidrógeno entre el AAS y la COX-2 en el Sitio Activo.*

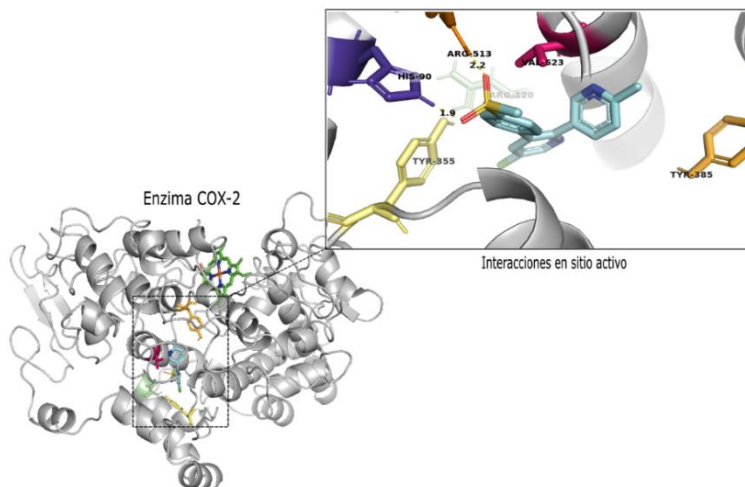
En la siguiente imagen, **Figura 27**, se observan puentes de hidrógeno no convencionales, esta es la interacción carbono- hidrógeno representada de color azul. Esta interacción se da entre el hidrógeno del carbono secundario del residuo Ser353 y el oxígeno del grupo carbonilo que a su vez pertenece al grupo carboxilo del AAS. La Val349 y la Ala527 forman una interacción  $\pi$ -  $\sigma$  entre dicho anillo y los enlaces  $\sigma$  de las cadenas laterales de cada residuo. Así mismo, se da una interacción  $\pi$ - alquilo entre el radical isobutilo de la Leu531 y el anillo bencénico. Por último, se visualizan también interacciones mediante fuerzas de Van der Waals entre el AAS y los residuos Met113, Val116, Leu359 y Ser530.



*Figura 27. Visualización en 2D del total de interacciones del AAS y la COX-2 en el sitio activo*

### Interacciones AINES Selectivos

#### **Etoricoxib**



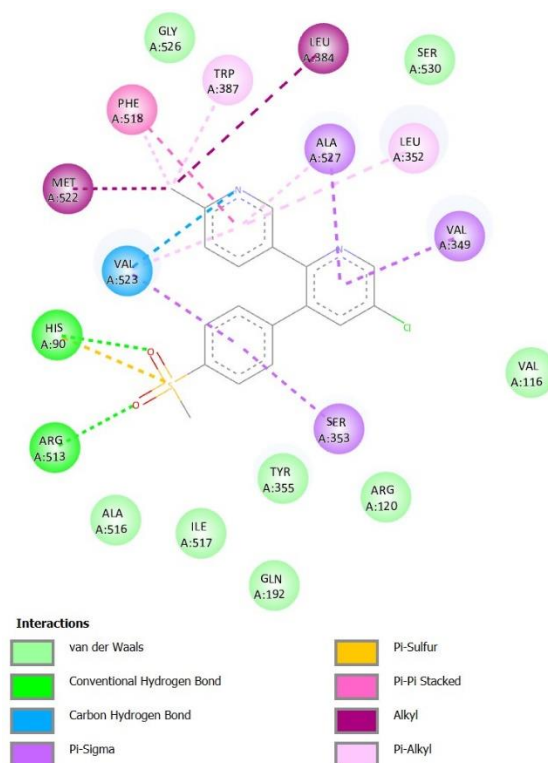
*Figura 28. Visualización en 3D de los Puentes de Hidrógeno entre el Etoricoxib y la COX-2 en el Sitio Activo.*

En la **Figura 28** se observan dos puentes de hidrógeno formados entre el ligando y la COX-2. El primer puente de hidrógeno se forma entre un hidrógeno unido al nitrógeno del anillo imidazólico la His90 y un oxígeno del grupo metilsulfonilo a una distancia de 1.9 Å. El segundo puente de hidrógeno se da entre el hidrógeno de la imina del residuo Arg513 y el segundo oxígeno del grupo metilsulfonilo, a una distancia de 2.2 Å.

En la **Figura 29** se observan formato 2D diversos tipos de interacciones. En primer lugar, se puede mencionar las interacciones más numerosas, fuerzas de Van der Waals. Este tipo de interacción se forma entre el etoricoxib y los residuos Val116, Arg120, Gln192, Tyr355, Ala516, Gly525 y Ser530.

Posteriormente, se pueden observar interacciones tipo  $\pi$  de diversas clases. En primer lugar, se encuentran las interacciones  $\pi$ - $\sigma$ . En este complejo, este tipo de enlace no covalente se forma entre los enlaces  $\sigma$  de la Ser353 y la Val523 y el anillo bencénico; además también se puede observar este enlace  $\pi$ - $\sigma$  entre los residuos Ala527 y Val349 y un anillo piridina de la molécula. Seguidamente, se puede visualizar también una interacción  $\pi$ -sulfur entre el residuo His90 y el grupo metilsulfonilo; la interacción se produce entre el anillo imidazol del aminoácido y el átomo de azufre del fármaco. A su vez, puede observarse una interacción  $\pi$ - $\pi$  stacked entre los anillos aromáticos del residuo Phe518 y un segundo anillo piridina del etoricoxib. La última interacción

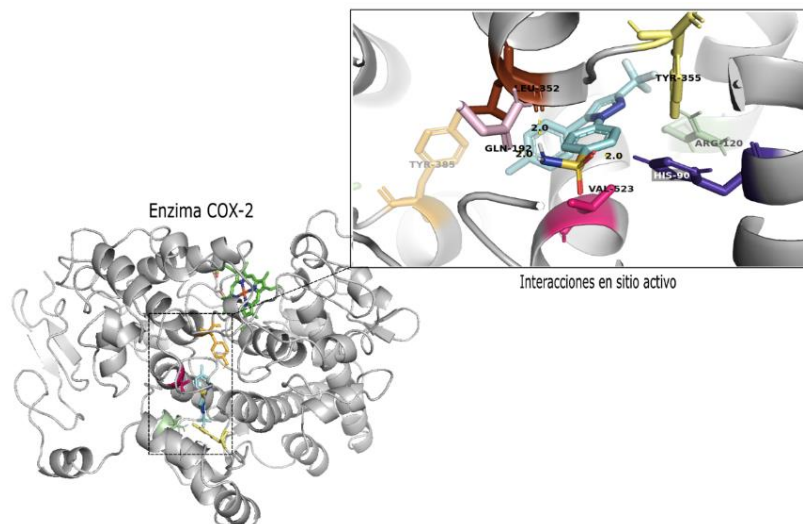
tipo  $\pi$ , se da en una primera instancia entre los anillos aromáticos de los residuos Phe518 y Trp387 y el radical alquilo del anillo piridina de ligando, posteriormente se da también entre los grupos alquilo de los residuos Leu352 (isobutilo), Val523 (isopropilo) y Ala527 (metilo) y el radical  $-\text{CH}_3$  del anillo piridina no clorado. Finalmente, se forman enlaces tipo alquilo no covalentes entre el radical metilo de la Met522 y el radical  $-\text{CH}_3$  del fármaco.



*Figura 29. Visualización en 2D del Total de Interacciones del Etoricoxib y la COX-2 en el Sitio Activo*

### **Celecoxib**

En la **Figura 30** se puede observar que entre el celecoxib y la COX-2 se forman tres puentes de hidrógeno. El primer puente de hidrógeno se da entre un átomo de hidrógeno unido a un átomo de nitrógeno del anillo imidazol de la His90 y un oxígeno del grupo sulfonamida a una distancia de 2.0 Å. El siguiente puente se da entre el hidrógeno unido al átomo de nitrógeno del grupo sulfonamida del celecoxib y el oxígeno del grupo carboxilo de la Leu352 a una distancia de 2.0 Å. El último puente de hidrógeno representado en esta figura se da entre un hidrógeno unido al átomo de nitrógeno de la sulfonamida y el oxígeno del grupo amida de la Gln192 a una distancia de 2.0 Å.



*Figura 30. Visualización en 3D de los Puentes de Hidrógeno entre el Celecoxib y la COX-2 en el Sitio Activo.*

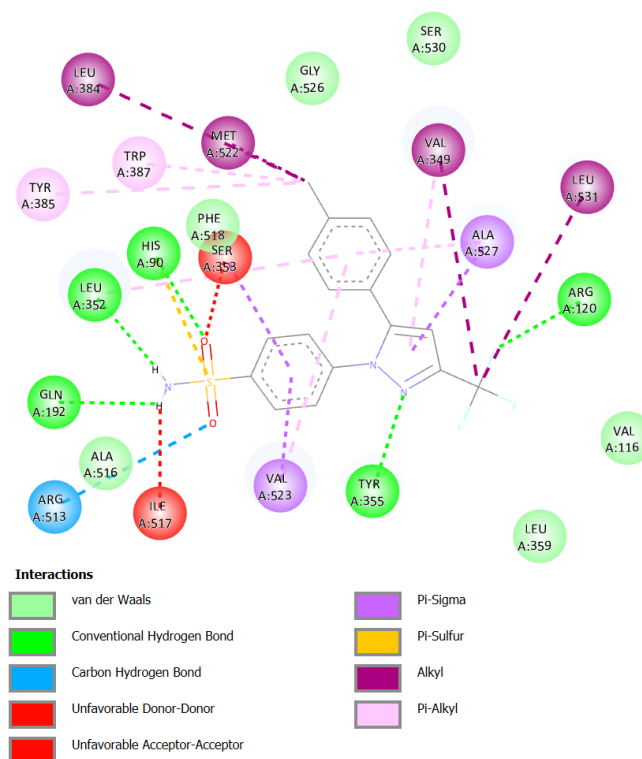
Sin embargo, a pesar de que en la ilustración en 3D se observaron tres puentes de hidrógeno. En el **Figura 31**, en 2D, se pueden visualizar dos puentes de hidrógenos convencionales adicionales, más un puente de hidrógeno de convencional. El siguiente puente de hidrógeno que se forma se da entre la el hidrógeno del grupo imínico de la Arg120 y un átomo de flúor del grupo trifluormetilo del celecoxib. El quinto puente de hidrógeno de este complejo se muestra entre un nitrógeno del anillo pirazol del fármaco y el hidrógeno del grupo hidroxilo de la Try355. El puente de hidrógeno no convencional, representado por el color azul denominado como enlace carbono-hidrógeno, se forma entre un hidrógeno unido a alguno de los carbonos secundarios de la cadena lateral guanidina del la Arg513.

Otro tipo de interacciones que se pueden observar en este complejo son las interacciones tipo  $\pi$ . El primer tipo es la interacción  $\pi$ - $\sigma$  que se observa entre los enlaces  $\sigma$  de las cadenas lateral de los residuos Ser353 y Val523 y el anillo de benceno que se encuentra unido a la sulfonamida. Otro enlace  $\pi$ - $\sigma$  se da entre los enlaces  $\sigma$  de la Ala527 y el anillo pirazol. Otra interacción de esta naturaleza, se da entre el átomo de azufre del grupo sulfonamida y el anillo imidazol de la His90, formando un enlace  $\pi$  – sulfur. El último enlace débil tipo  $\pi$  se forma entre los anillos aromáticos de la Tyr385 y del Trp387 con el sustituyente  $-\text{CH}_3$  en el benceno.

Así mismo, también se pueden observar cuatro interacciones tipo alquilo. Las dos primeras se pueden analizar entre las cadenas de los residuos Leu382 y Met522 y el sustituyente metilo del benceno. Las dos siguientes interacciones alquilo se forma entre las cadenas laterales de la Val349 y de la Leu531 y el carbono del grupo trifluorometilo. Además de las interacciones

mediante fuerzas de Van der Waals entre el celecoxib y los residuos Val116, Leu359 Ala516, Phe518, Gly526 y Ser 530.

Finalmente, se pueden observar dos interacciones no favorables representadas por el color rojo. Se da una primera interacción no favorable de tipo donante- donante entre la Ile517 y el hidrógeno que se encuentra unido al átomo de nitrógeno del grupo sulfonamida. Esta situación se debe a que la naturaleza no polar de la cadena lateral de la isoleucina le impide actuar como aceptor de electrones debido a la ausencia de átomos electronegativos; es así que la isoleucina podría actuar como un donante; esto sumado a que hidrógeno del grupo sulfonamida actúa también como un donante de hidrógeno, provocando dicha interacción no favorable. La segunda interacción no favorable es de tipo aceptor- aceptor que se da por la proximidad entre el residuo Ser353 y en grupo sulfonamida, en la que el grupo hidroxilo de la serina y el oxígeno de la sulfonamida actúan como aceptores de electrones, siendo así que, por falta de un buen donador presente provoca una repulsión de densidades de electrones.

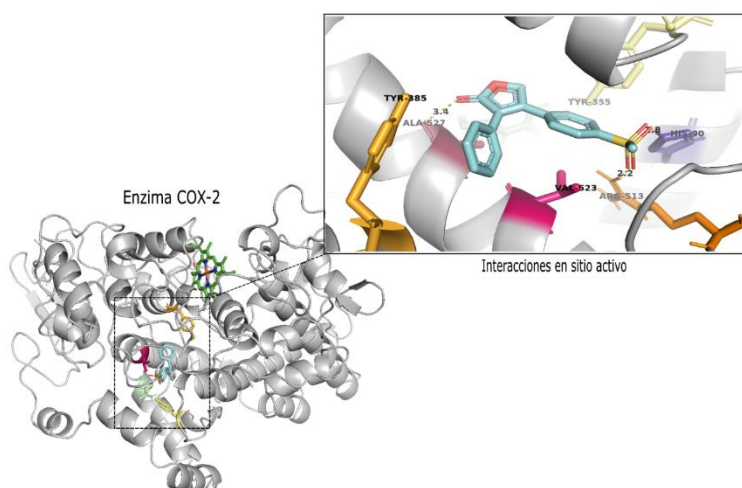


*Figura 31. Visualización en 2D del Total de Interacciones entre Celecoxib y la COX-2 en el Sitio Activo.*



### **Rofecoxib**

En la **Figura 32** se pueden observar en 3D, tres de los cuatro puentes de hidrógeno que se forman entre el rofecoxib y la COX-2. El primer puente de hidrógeno que se puede observar se forma entre el hidrógeno unido al átomo de nitrógeno del anillo imidazol de la His90 y un oxígeno del grupo metilsulfonilo del fármaco a una distancia de 1.8 Å. Seguidamente, también se observa otro puente de hidrógeno entre del grupo imínico de la Arg513 y el segundo oxígeno del grupo metilsulfonilo a una distancia de 2.2 Å. El tercer puente de hidrógeno que se puede analizar en esta ilustración, es un puente de hidrógeno no convencional, que se forma entre el hidrógeno de la cadena lateral de Ala527 y el oxígeno del grupo cetónico unido al anillo furánico a una distancia de 3.4 Å.



*Figura 32. Visualización en 3D de los Puentes de Hidrógeno entre el Rofecoxib y la COX-2 en el Sitio Activo*

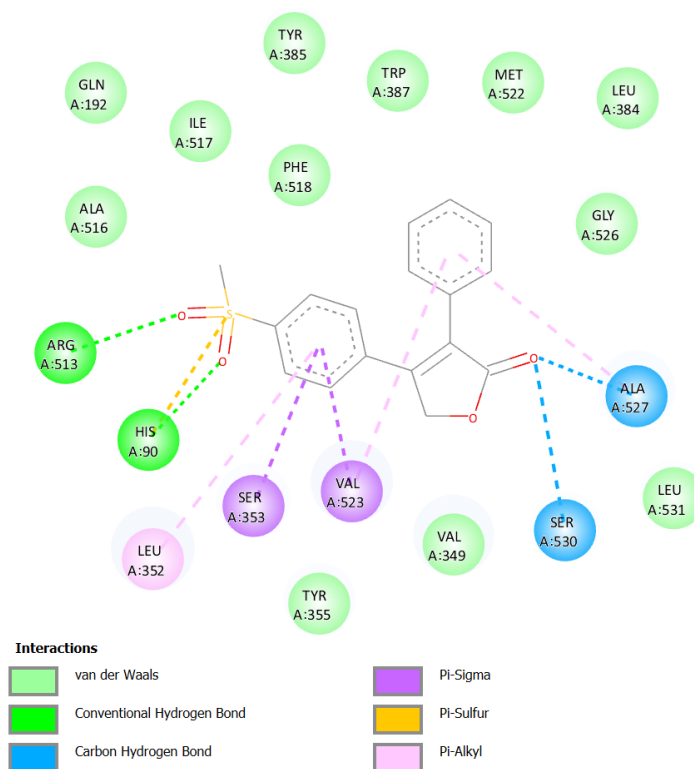
En la **Figura 33**, se puede observar un puente de hidrógeno no convencional adicional. Este se forma con el hidrógeno del carbono secundario de la cadena lateral de la Ser530 y el grupo cetónico unido al anillo de furano.

Así mismo, se dan interacciones tipo  $\pi$ - $\sigma$  con los enlaces sigma de las cadenas laterales de los residuos Ser353 y Val523 y el anillo bencénico que se encuentra unido al radical metilsulfonilo. Se encuentra también un enlace tipo  $\pi$ -sulfur entre el átomo de azufre del grupo metilsulfonilo y el anillo imidazólico de la His90. El ultimo enlace de este tipo es  $\pi$ -alquilo y se da entre el radical isobutilo y el anillo bencénico ilustrado.



Para finalizar el análisis de esta interacción, importante mencionar también las interacciones mediante fuerzas de Van der Waals entre el rofecoxib y los residuos Gln192, Val, 349, Tyr355, Leu384, Tyr385, Trp387, Ala516, Ile517, Phe518, Met522, Gly526, y Leu531.

Se puede claramente comprender que el número de interacciones intervine directamente en los valores obtenidos de la energía libre. Se puede observar en ambos grupos de AINES que, a medida que incrementa el valor de la energía de fijación disminuye en número de interacciones. A excepción del celecoxib, que, si bien presenta el mayor número de interacciones, presenta también dos interacciones no favorables que hacen que la energía de unión incremente su valor. Además, son estas mismas interacciones que nos permiten intuir que los valores obtenidos por AutoDock 4 son confiables.



*Figura 33. Visualización en 2D del Total de Interacciones entre el Rofecoxib y la COX-2 en el Sitio Activo.*

## DISCUSIÓN

En este estudio, se encontraron diferencias importantes en los valores de afinidad de unión entre AINES selectivos y no selectivos hacia la enzima COX-2. Al utilizar los programas de docking molecular AutoDock 4 y AutoDock Vina, se evidenció una discrepancia significativa en los valores de afinidad de los AINES selectivos entre ambos programas. Esto sugiere que los AINES selectivos presentan una variabilidad en su interacción con COX-2 que es interpretada de manera distinta por cada herramienta. Por otro lado, los AINES no selectivos no mostraron diferencias significativas en los valores de afinidad cuando se compararon los resultados obtenidos con AutoDock 4 y AutoDock Vina, indicando una consistencia en la evaluación de sus interacciones con COX-2. Los hallazgos reportados en este estudio fueron comparados con estudios de otros autores, lo que permite direccionar este estudio hacia conclusiones similares.

En un estudio realizado por (Bello-Vargas et al., 2023), se analizaron las formas de unión de inhibidores de la COX-1 y COX-2. Tres fármacos estudiados por los autores son comparables con los fármacos de este estudio: ibuprofeno, celecoxib y diclofenaco. Para el ibuprofeno, se encontraron interacciones muy similares a las halladas en este estudio. De los diecisiete aminoácidos que mencionan los autores, se encontró concordancia exacta con ocho aminoácidos: Val349 y Ala527 ( $\pi$ -alquilo), Arg120 y Tyr355 (puentes de hidrógeno convencionales), Leu359 (alquilo) y Leu352, Trp387 y Met522 (Van der Waals). Aunque el resto de aminoácidos mencionados por los autores también se encuentran en las interacciones reportadas en los resultados, la naturaleza de las interacciones es diferente. De igual manera, para el celecoxib, siete de las trece interacciones reportadas por los autores son exactas: Trp387 y Tyr385 ( $\pi$ -alquilo), Ala527 y Val349 ( $\pi$ - $\sigma$ ), His90 ( $\pi$ -azufre), Ser516 (enlace carbono-hidrógeno) y Gln192 (puente de hidrógeno convencional). Al igual que con el ibuprofeno, muchos otros aminoácidos coinciden con los reportados en los resultados, pero el tipo de interacciones difiere. Finalmente, en el estudio de Bello-Vargas et al. se reporta mayor afinidad del celecoxib y del diclofenaco hacia la COX-2, a diferencia del ibuprofeno, que muestra mayor afinidad por la COX-1. Este hallazgo puede ser comprobado con los valores de afinidad reportados en este estudio, que coinciden con lo reportado por dichos autores.

Otro estudio que permite comparar los resultados obtenidos es el realizado por (Chaudhary & Aparoy, 2017). En este artículo, los autores ejecutaron una simulación de dinámica molecular para evaluar cómo varía la energía de unión de algunos coxibs. El primer hallazgo reportado por los autores fueron los aminoácidos importantes en la interacción enzima-ligando. Estos aminoácidos fueron Leu338, Ser353, Arg513, Ile517, Phe518, Val523 y Ser530 (Leu338, Ser339,

Arg499, Ile503, Phe504, Val509 y Ser516 según la numeración de los autores). En los tres coxibs analizados por la autora, se encontró que todos los aminoácidos reportados por Chaudhary & Aparoy también intervinieron en las interacciones halladas en los gráficos previos. Aunque son los mismos aminoácidos que intervienen en las interacciones de los tres fármacos, la naturaleza de cada interacción es diferente para cada AINE selectivo, de ahí las diferentes energías de unión resultantes. El único fármaco comparable con los analizados en este estudio es el celecoxib. Leu352, Arg513 y Phe518 formaron enlaces de hidrógeno con el grupo. Val509 participó en interacciones  $\pi$ - $\sigma$ , mientras que Ala513 mostró tanto interacciones  $\pi$ - $\sigma$  como  $\pi$ -alquilo. En los resultados previos de este estudio, se reportaron las mismas interacciones con la diferencia de que el residuo Phe518 no forma puentes de hidrógeno, sino que participa en fuerzas de Van der Waals. Además, también se hallaron más interacciones importantes que no mencionan los autores, como los puentes de hidrógeno formados por los residuos Gln192, His90, Arg120 y Tyr355. Un valor complementario para el análisis del celecoxib es el valor de energía libre de unión reportado por (Joshi et al., 2013). El valor que obtuvieron los autores en su estudio in silico fue de -11.00 kcal/mol, muy similar al resultado obtenido en AutoDock 4 de -10.89 kcal/mol.

Por otro lado, el artículo realizado por (Ibrahim et al., 2018) permitió comparar algunas energías de unión obtenidas previamente. Los fármacos comparables con el artículo son el diclofenaco y el rofecoxib. El diclofenaco, por su parte, en el artículo de Ibrahim et al. tiene una energía de unión de -9.549 kcal/mol, valor muy similar al obtenido en este estudio de -8.08 kcal/mol en AutoDock 4 y -7.80 en AutoDock Vina, observándose una diferencia mayor en este último software. De igual manera, para el rofecoxib, los autores obtuvieron un valor de energía libre de unión de -8.241 kcal/mol, lo que discrepa con los resultados obtenidos en este estudio, donde tanto en AutoDock 4 como en AutoDock Vina se observó que la interacción entre el rofecoxib y la COX-2 es más favorable que la del diclofenaco. Los valores obtenidos para este último fármaco fueron de -10.23 kcal/mol en AutoDock4 y -8.50 kcal/mol en AutoDock Vina. Aunque el resultado obtenido por los autores y el resultado obtenido en este estudio muestran valores similares en comparación con los obtenidos por AutoDock Vina, el orden de la afinidad enzimática para cada fármaco difiere en cada uno de los estudios.

Finalmente, un estudio muy útil para la comparación de resultados es el realizado por (Meneses & Cuesta, 2015), en el que se determinó la energía libre de unión y la constante de inhibición para algunos AINES selectivos y no selectivos. Se obtuvieron los siguientes valores en kcal/mol: celecoxib (-10.8), etoricoxib (-9.2), ibuprofeno (-7.7), naproxeno (-8.4) y diclofenaco (-8.1). El orden de las energías fue celecoxib < etoricoxib < naproxeno < diclofenaco < ibuprofeno. Muy

parecido al obtenido en AutoDock 4: etoricoxib (-11.22) < celecoxib (-10.89) < diclofenaco (-8.08) < naproxeno (-7.29) < ibuprofeno (-6.83). Mientras que en AutoDock Vina el orden fue: celecoxib (-9.00) < naproxeno (-8.10) < etoricoxib (-8.00) < diclofenaco (-7.80) < ibuprofeno (-7.30). En realidad, los valores encontrados por Meneses & Cuesta fueron muy similares a los encontrados en ambos programas de AutoDock Tools. Las variaciones que existen se pueden deber a la preparación de los ligandos, que provoca una diferencia en algunas interacciones enzima-ligando y, por lo tanto, cambia los valores finales de energía libre de unión.

En resumen, aunque se han observado algunas diferencias en comparación con ciertos estudios, nuestros hallazgos presentan muchas similitudes con otros trabajos en la literatura. Esto sugiere que los resultados obtenidos en esta tesis son consistentes y comparables con la bibliografía existente. Por lo tanto, las conclusiones de este estudio aportan validez y relevancia en el contexto de la investigación sobre la afinidad de unión de AINES selectivos y no selectivos hacia la COX-2 mediante técnicas de docking molecular.

En este estudio, las diferencias en los valores de afinidad de unión entre los AINES selectivos y no selectivos hacia la COX-2 tienen implicaciones significativas para la farmacología y la terapia. La variabilidad observada en los valores de energía libre de unión para los AINES selectivos sugiere que estas moléculas pueden formar interacciones más específicas y estables con la COX-2, en comparación con los AINES no selectivos. Esta mayor especificidad en las interacciones enzima-ligando puede influir en la duración del efecto terapéutico del fármaco.

Un fármaco que presenta una alta afinidad y especificidad para su objetivo enzimático, como la COX-2, tiene el potencial de inhibir la enzima de manera más duradera y eficaz. Esto podría resultar en una prolongación del efecto terapéutico, ya que el fármaco se mantiene activo en su sitio de acción por más tiempo. Además, la rapidez con la que un fármaco se une a su objetivo puede afectar el inicio del efecto terapéutico. Los AINES que se unen rápidamente con alta afinidad pueden mostrar un inicio más rápido en la acción terapéutica.

Por otro lado, la variabilidad en las interacciones observadas entre los diferentes softwares de docking puede reflejar diferencias en la estabilidad de los complejos enzima-ligando y, por lo tanto, en la duración del efecto. Los AINES con interacciones más duraderas podrían ofrecer beneficios terapéuticos prolongados, mientras que aquellos con interacciones menos estables podrían requerir una administración más frecuente.

En cuanto a la influencia en el diseño de futuros fármacos, estos hallazgos subrayan la importancia de considerar tanto la afinidad como la especificidad en el desarrollo de AINES. Un diseño racional que optimice estas interacciones puede llevar a la creación de fármacos que no solo sean eficaces en la reducción de la inflamación, sino que también tengan un perfil de acción más prolongado y un inicio de efecto más rápido, mejorando así las estrategias de tratamiento para condiciones inflamatorias y reduciendo la necesidad de administración frecuente y por lo tanto la aparición de efectos adversos asociados a los AINES.

### CONCLUSIONES

- El uso de simulaciones de docking molecular permitió calcular la energía libre de unión de los AINEs selectivos y no selectivos a la COX-2, proporcionando una aproximación confiable de sus afinidades. Este enfoque computacional resultó fundamental para identificar las diferencias en la interacción entre los fármacos y la enzima, ayudando a predecir su comportamiento inhibitorio y eficacia en el sitio activo.
- El análisis de las interacciones moleculares ha revelado que los AINES selectivos tienden a formar interacciones más específicas con los residuos del sitio activo de la COX-2, lo que podría explicar su mayor selectividad y menor incidencia de efectos adversos gastrointestinales en comparación con los no selectivos, que inhiben tanto COX-1 como COX-2 de manera menos diferenciada. Así mismo, se ha observado que los compuestos de mayor tamaño tienden a establecer un mayor número de interacciones con la COX-2, lo que puede traducirse en una interacción más favorable y específica en el sitio activo de la enzima.
- La diferencia en los valores de afinidad de unión entre los AINEs selectivos y no selectivos hacia la COX-2 tiene importantes implicaciones farmacológicas. Los AINEs selectivos, al presentar una mayor afinidad por la COX-2, logran una inhibición más precisa y eficiente de esta enzima, lo que se traduce en una mayor eficacia en la reducción de la inflamación. Esta alta afinidad permite que los AINEs selectivos tengan un inicio de acción más rápido y una prolongación del efecto antiinflamatorio, lo que resulta beneficioso en el tratamiento de condiciones crónicas. Además, su perfil farmacológico diferenciado sugiere que, al enfocarse en la inhibición de la COX-2 y no de la COX-1, mantienen una mejor seguridad y tolerabilidad, permitiendo un tratamiento más prolongado sin comprometer otros sistemas fisiológicos. En contraste, los AINEs no selectivos, con menor afinidad diferencial, pueden ser menos efectivos a largo plazo y presentar un perfil de acción más difuso, comprometiendo tanto la eficacia como la seguridad en terapias prolongadas.

## RECOMENDACIONES

- La incorporación de técnicas de docking computacional representa un avance significativo en la química computacional y la farmacología molecular. Estas metodologías han demostrado ser fundamentales para la identificación y optimización de compuestos con potencial terapéutico. Al proporcionar herramientas para diseñar tratamientos más específicos y personalizados, las técnicas de docking no solo mejoran la eficacia de los fármacos, sino que también reducen los efectos adversos asociados. Este enfoque no solo potencia el desarrollo de nuevos medicamentos, sino que también abre nuevas vías para investigaciones futuras en el campo del diseño farmacéutico.
- Considerar la aplicación de otros métodos computacionales, como la dinámica molecular para complementar y enriquecer los resultados obtenidos mediante docking.
- Profundizar en el análisis de la energía de interacción entre los ligandos y la COX-2 para identificar los factores clave que contribuyen a una unión más eficaz y específica, por medio del empleo de más programas de docking.

## REFERENCIAS

- Ahmadi, M., Bekeschus, S., Weltmann, K. D., von Woedtke, T., & Wende, K. (2022). Non-steroidal anti-inflammatory drugs: recent advances in the use of synthetic COX-2 inhibitors. *RSC Medicinal Chemistry, February*. <https://doi.org/10.1039/d1md00280e>
- Azam, F., Alabdullah, N. H., Ehmedat, H. M., Abulifa, A. R., Taban, I., & Upadhyayula, S. (2018). NSAIDs as potential treatment option for preventing amyloid  $\beta$  toxicity in Alzheimer's disease: an investigation by docking, molecular dynamics, and DFT studies. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, 36(8), 2099–2117. <https://doi.org/10.1080/07391102.2017.1338164>
- Bacchi, S., Palumbo, P., Sponta, A., & Coppolino, M. F. (2012). Clinical Pharmacology of Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs: A Review. En *Allergy Agents in Medicinal Chemistry* (Vol. 11). [https://doi.org/Bacchi,S.,Palumbo,P.,Sponta,A.,&Coppolino,M.F.\(2012\).ClinicalPharmacologyofNon-SteroidalAnti-InflammatoryDrugs:AReview.Anti-Inflammatory&Anti-AllergyAgentsinMedicinalChemistry,11\(1\),52–64.doi:10.2174/187152312803476255](https://doi.org/Bacchi,S.,Palumbo,P.,Sponta,A.,&Coppolino,M.F.(2012).ClinicalPharmacologyofNon-SteroidalAnti-InflammatoryDrugs:AReview.Anti-Inflammatory&Anti-AllergyAgentsinMedicinalChemistry,11(1),52–64.doi:10.2174/187152312803476255)
- Ballester, P. J., & Mitchell, J. B. O. (2010). A machine learning approach to predicting protein-ligand binding affinity with applications to molecular docking. *Bioinformatics*, 26(9), 1169–1175. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btq112.A>
- Batlouni, M. (2010a). Antiinflamatorios No Esteroides: Efectos Cardiovasculares , Cerebrovasculares y Renales. *Sociedad Brasileira de Cardiología. MCMXLIII*, 94(4), 538–546.
- Batlouni, M. (2010b). Antiinflamatorios No Esteroides: Efectos Cardiovasculares , Cerebrovasculares y Renales. *Sociedad Brasileira de Cardiología. MCMXLIII*, 94(4), 538–546.
- Bello-Vargas, E., Leyva-Peralta, M. A., Gómez-Sandoval, Z., Ordóñez, M., & Razo-Hernández, R. S. (2023). A Computational Method for the Binding Mode Prediction of COX-1 and COX-2 Inhibitors: Analyzing the Union of Coxibs, Oxicams, Propionic and Acetic Acids. *Pharmaceuticals*, 16(12). <https://doi.org/10.3390/ph16121688>
- Bindu, S., Mazumder, S., & Bandyopadhyay, U. (2020). Non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) and organ damage: A current perspective. *Biochemical Pharmacology*, 180(April). <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2020.114147>
- BIOVIA, D. S. (2021). *BIOVIA Discovery Studio [Software]*.
- Chaudhary, N., & Aparoy, P. (2017). Deciphering the mechanism behind the varied binding activities of COXIBs through Molecular Dynamic Simulations, MM-PBSA binding energy calculations and per-residue energy decomposition studies. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, 35(4), 868–882. <https://doi.org/10.1080/07391102.2016.1165736>
- Eberhardt, J., Santos-Martins, D., Tillack, A. F., & Forli, S. (2021). *AutoDock Vina 1.2.0: New Docking Methods, Expanded Force Field, and Python Bindings*. *Journal of Chemical Information and Modeling*.



- Encalada, C., Ortega, J., & Carlos Valencia. (2015). Prevalencia Y Factores Asociados a La Automedicación Con Aines En Adultos Mayores En Las Parroquias Urbanas De Cuenca [Universidad de Cuenca]. En *Universidad de Cuenca*. <http://dspace.ucuenca.edu.ec/bitstream/123456789/22494/1/tesis.pdf>
- Fitzpatrick, F. (2005). Cyclooxygenase Enzymes: Regulation and Function. *Current Pharmaceutical Design*, 10(6), 577–588. <https://doi.org/10.2174/1381612043453144>
- Hanwell, M., Curtis, D., Lonie, D., Vandermeersh, T., Zurek, E., & Hutchison, G. (2012). Avogadro: An advanced semantic chemical editor, visualization, and analysis platform. *Journal of Cheminformatics*.
- Ibrahim, M. M., Elsaman, T., & Al-Nour, M. Y. (2018). Synthesis, Anti-Inflammatory Activity, and In Silico Study of Novel Diclofenac and Isatin Conjugates. *International Journal of Medicinal Chemistry*, 2018, 1–11. <https://doi.org/10.1155/2018/9139786>
- Jara, M., Jaramillo, L., & Matamoros, J. M. (2011). Frecuencia de automedicación de AINES y analgésicos - antipiréticos y características que los rodean, en hogares de la parroquia San Blas de la ciudad de Cuenca en el año 2011 [Universidad De Cuenca]. En *Universidad De Cuenca Facultad De Ciencias Médicas Escuela De Medicina*. <http://dspace.ucuenca.edu.ec/bitstream/123456789/3466/1/MED95.pdf>
- Jones, S. F., & Power, I. (2005). Postoperative NSAIDs and COX-2 inhibitors: Cardiovascular risks and benefits. *British Journal of Anaesthesia*, 95(3), 281–284. <https://doi.org/10.1093/bja/aei204>
- Joshi, J., K. Barik, T., Shrivastava, N., Dimri, M., Ghosh, S., S. Mandal, R., Ramachandran, S., & P. Kumar, I. (2013). Cyclooxygenase-2 (COX-2) - A Potential Target for Screening of Small Molecules as Radiation Countermeasure Agents: An In Silico Study. *Current Computer Aided-Drug Design*, 9(1), 35–45. <https://doi.org/10.2174/1573409911309010004>
- Lehninger. (2008). *Principios de bioquímica*.
- Martín-Vázquez, E., Cobo-Vuilleumier, N., López-Noriega, L., Lorenzo, P. I., & Gauthier, B. R. (2023). The PTGS2/COX2-PGE2 signaling cascade in inflammation: Pro or anti? A case study with type 1 diabetes mellitus. *International Journal of Biological Sciences*, 19(13), 4157–4165. <https://doi.org/10.7150/ijbs.86492>
- Meneses, L., & Cuesta, S. (2015). Determinación Computacional de la Afinidad y Eficiencia de Enlace de Antinflamatorios No Esteroides Inhibidores de la Ciclooxygenasa-2. *Revista Ecuatoriana de Medicina y Ciencias Biológicas*, 36(1–2), 17–25. <https://doi.org/10.26807/remcb.v36i1-2.62>
- Molcanov, K., & Kojić-Prodić, B. (2019). Towards understanding  $\pi$ -stacking interactions between non-Aromatic rings. *IUCrJ*, 6(Pe 2015), 156–166. <https://doi.org/10.1107/S2052252519000186>
- Morris, G., Huey, R., Lindstrom, W., Sanner, M., Belew, R., Goodsell, D., & Olson, A. (2009). *Autodock4 and AutoDockTools4: automated docking with selective receptor flexibility*. (16; pp. 2785–2791). Computational Chemistry 2009.

- Moussa, N., Hassan, A., & Gharaghani, S. (2021). Pharmacophore model, docking, QSAR, and molecular dynamics simulation studies of substituted cyclic imides and herbal medicines as COX-2 inhibitors. *Heliyon*, 7(4), e06605. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2021.e06605>
- Muhammed, M. T., & Aki-Yalcin, E. (2022). Molecular Docking: Principles, Advances, and its Applications in Drug Discovery. *Letters in Drug Design & Discovery*, 19, 1–16. <https://doi.org/10.2174/1570180819666220922103109>
- National Center for Biotechnology Information. (2024a). *PubChem Compound Summary for CID 2244, Aspirin*. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Aspirin>
- National Center for Biotechnology Information. (2024b). *PubChem Compound Summary for CID 2662, Celecoxib*. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Celecoxib>
- National Center for Biotechnology Information. (2024c). *PubChem Compound Summary for CID 3033, Diclofenac*. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Diclofenac>.
- National Center for Biotechnology Information. (2024d). *PubChem Compound Summary for CID 3672, Ibuprofen*.
- National Center for Biotechnology Information. (2024e). *PubChem Compound Summary for CID 5090, Rofecoxib*. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Rofecoxib>.
- National Center for Biotechnology Information. (2024f). *PubChem Compound Summary for CID 123619, Etoricoxib*. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Etoricoxib>.
- National Center for Biotechnology Information. (2024g). *PubChem Compound Summary for CID 156391, Naproxen*.
- Novikov, F. N., & Chilov, G. G. (2009). Molecular docking: theoretical background, practical applications and perspectives. *Mendeleev Communications*, 19(5), 237–242. <https://doi.org/10.1016/j.mencom.2009.09.001>
- Peura, D. A., & Goldkind, L. (2005). Balancing the gastrointestinal benefits and risks of nonselective NSAIDs. *Arthritis Research and Therapy*, 7(SUPPL. 4), 7–13. <https://doi.org/10.1186/ar1793>
- Rao, P. N. P., & Knaus, E. E. (2008). Evolution of Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs (NSAIDs): Cyclooxygenase (COX) Inhibition and Beyond. *Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences*, 11(2), 81–110s.
- Raval, K., & Ganatra, T. (2022a). Basics, types and applications of molecular docking: A review. *IP International Journal of Comprehensive and Advanced Pharmacology*, 7(1), 12–16. <https://doi.org/10.18231/j.ijcaap.2022.003>
- Raval, K., & Ganatra, T. (2022b). Basics, types and applications of molecular docking: A review. *IP International Journal of Comprehensive and Advanced Pharmacology*, 7(1), 12–16. <https://doi.org/10.18231/j.ijcaap.2022.003>
- Richard, M. J., Driban, J. B., & McAlindon, T. E. (2023). Pharmaceutical treatment of osteoarthritis. *Osteoarthritis and Cartilage*, 31(4), 458–466. <https://doi.org/10.1016/j.joca.2022.11.005>

- RStudio Team. (2020). *RStudio: Integrated Development for R*. RStudio, PBC.
- Salido, M., Abásalo, L., & Bañares, A. (2001). Revisión de los antiinflamatorios inhibidores selectivos de la ciclooxigenasa-2. *Información Terapéutica del Sistema Nacional de Salud*, 25(2), 46–52.
- Schjerning, A. M., McGettigan, P., & Gislason, G. (2020). Cardiovascular effects and safety of (non-aspirin) NSAIDs. *Nature Reviews Cardiology*, 17(9), 574–584. <https://doi.org/10.1038/s41569-020-0366-z>
- Schrödinger, L., & DeLano, W. (2020). PyMOL.
- Stryer, L., Brerger, J. M., & Tymoczko, J. L. (2007). *Bioquímica*. 1152.
- Świątek, P., Glomb, T., Dobosz, A., Gębarowski, T., Wojtkowiak, K., Jezierska, A., Panek, J. J., Świątek, M., & Strzelecka, M. (2022). Biological Evaluation and Molecular Docking Studies of Novel 1,3,4-Oxadiazole Derivatives of 4,6-Dimethyl-2-sulfanylpiperidine-3-carboxamide. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(1). <https://doi.org/10.3390/ijms23010549>
- Świątek, P., Strzelecka, M., Urniaz, R., Gębczak, K., Gębarowski, T., Gąsiorowski, K., & Malinka, W. (2017). Synthesis, COX-1/2 inhibition activities and molecular docking study of isothiazolopyridine derivatives. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 25(1), 316–326. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2016.10.036>
- Timmer, B. J. J., & Mooibroek, T. J. (2021). Intermolecular  $\pi$ - $\pi$  Stacking Interactions Made Visible. *Journal of Chemical Education*, 98(2), 540–545. <https://doi.org/10.1021/acs.jchemed.0c01252>
- Tomić, M., Micov, A., Pecikoza, U., & Stepanović-Petrović, R. (2017a). Clinical Uses of Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs (NSAIDs) and Potential Benefits of NSAIDs Modified-Release Preparations. *Microsized and Nanosized Carriers for Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs: Formulation Challenges and Potential Benefits*, 1–29. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-804017-1.00001-7>
- Tomić, M., Micov, A., Pecikoza, U., & Stepanović-Petrović, R. (2017b). Clinical Uses of Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs (NSAIDs) and Potential Benefits of NSAIDs Modified-Release Preparations. *Microsized and Nanosized Carriers for Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs: Formulation Challenges and Potential Benefits*, 1–29. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-804017-1.00001-7>
- Torrez, G., & Enrique, R. (2019). Acomplamiento molecular: criterios prácticos para la selección de ligandos biológicamente activos e identificación de nuevos blancos terapéuticos. *Revista Con-Ciencia*, 2, 1–18.