

V SEMANA UNIVERSITÁRIA DA URCA

XXIII Semana de Iniciação Científica

07 a 11 de Dezembro de 2020

Tema: "Os impactos e desafios da pandemia COVID no ensino, pesquisa e extensão"



ESTRUTURA DE LIGANTES ENVIESADOS E DOCAGEM MOLECULAR NO RECEPTOR μ -OPIÓIDE

Guilherme Mota dos Santos¹, Rubem Francisco Silva Bezerra², Diniz Maciel de Sena Junior³

Resumo: O receptor μ -opióide (MOR) faz parte do grupo de proteínas receptoras existentes nas membranas celulares dos mamíferos, e tem como função principal a percepção da dor. O mesmo é conhecido por estar relacionado à ativação de duas vias de sinalização, sendo a via da proteína G associada à analgesia (regulação normal da sensação de dor), e a da β -arrestina associada a efeitos indesejáveis (depressão respiratória, constipação, dependência, sedação, etc.). Estudos com substâncias derivadas da N-benzil piperidina 4-benzimidazolona e da salvinorina A identificaram compostos com alta tendência à ativação de uma dessas vias de sinalização. A avaliação da interação ligante-receptor por meio da docagem molecular é um caminho importante para a compreensão dos mecanismos que levam à ativação do receptor.

Palavras-chave: GPCR. Ligantes enviesados. N-benzil piperidina 4-benzimidazolona. Salvinorina A.

1. Introdução

O receptor μ -opióide (MOR) é uma proteína pertencente à classe A de receptores acoplados à proteína G (GPCRs) presente na membrana celular dos mamíferos. (SCHONEBERG et al., 2004; CHANG et al., 2015) Os GPCRs mesmo apresentando diferentes classes, apresentam uma estrutura em comum de sete hélices transmembranares (TM1-7), conectadas por três alças intra- (IL1-3) e extracelulares (EL1-3). (PALCZEWSKI et al., 2000) O MOR tem como função principal a percepção da dor, e é o principal alvo da morfina e de fármacos derivados do ópio. (SPETEA et al., 2013)

Ao ser ativado, desencadeia uma cascata de sinais que envolve duas vias de sinalização: a da proteína G (responsável pelo processo de analgesia), e a via da β -arrestina (relacionada com os efeitos adversos.). (BOHN, 1999; ZHOU; BOHN, 2014) A elucidação estrutural do MOR na sua forma ativa (código PDB: 5C1M) e inativa (código PDB: 4DKL) possibilitou vários estudos computacionais realizados na tentativa de elucidar, a nível molecular, os mecanismos que levam à ativação deste receptor. (HUANG et al., 2015; MANGLIK et al., 2012; CONG et al., 2015; SCHNEIDER; PROVASI; FILIZOLA, 2016; SENA JR et al., 2017; SHANG; FILIZOLA, 2015).Dentre os novos fármacos, são desejados aqueles que são responsáveis preferencialmente pela ativação da via de sinalização da proteína G. Kennedy e colaboradores estudaram uma série de 51 moléculas derivadas da N-benzil piperidina 4-benzimidazolona, com alta tendência à via da proteína G. (KENNEDY et al., 2018) Outras substâncias, derivadas da salvinorina A, foram avaliadas por Crowley e colaboradores, sendo encontradas moléculas com indicação de tendência tanto para a proteína G quanto para β -

¹ Universidade Regional do Cariri, email: guilherme.mota@urca.br

² Universidade Regional do Cariri, email: rubem.bezerra @urca.br

³ Universidade Regional do Cariri, email: dnz@urca.br

V SEMANA UNIVERSITÁRIA DA URCA

XXIII Semana de Iniciação Científica

07 a 11 de Dezembro de 2020

Tema: "Os impactos e desafios da pandemia COVID no ensino, pesquisa e extensão"



arrestina. (CROWLEY et al., 2020; CROWLEY et al., 2016) A realização de simulações com ligantes assim identificados são úteis para contribuir na compreensão do fenômeno de tendência de ligantes.

Um dos métodos da química computacional que é amplamente utilizado para o estudo das interações no complexo ligante-receptor é a docagem molecular. REF Esse método de alta performance é vastamente utilizado no design de drogas assistido por computador, e visa investigar, dentro de um conjunto de vários compostos, um ligante que apresente uma interação significativa com uma macromolécula, seja através da antecipação do modo de ligação entre o ligante e o receptor até o cálculo da afinidade de ligação. (FERREIRA et al., 2015).

As simulações podem ser executadas considerando o receptor na sua forma rígida ou flexível. Na abordagem rígida a estrutura macromolecular permanece estática enquanto os ligantes são flexíveis e buscam se adequar da melhor forma ao sítio de ligação. Já na abordagem flexível, os ligantes e as estruturas pertencentes ao sítio ativo do receptor, como suas cadeias ramificadas e os aminoácidos que participam do processo de ligação, são consideradas dinâmicas, sendo livres para se ajustarem um ao outro. As poses obtidas no processo de docagem podem ser utilizadas em simulações de dinâmica molecular subsequentes, a fim de refinar a estrutura e observar sua evolução. (GODÓI et al., 2017).

2. Objetivo

Com este projeto serão obtidos os modelos computacionais de ligantes com reconhecida ação enviesada no receptor μ -opióide, bem como suas possíveis poses de ligação, a fim de serem utilizados em simulações de dinâmica molecular.

Especificamente, o projeto propõe:

- A otimização da geometria molecular dos ligantes, em sua forma neutra e/ou protonada (a depender do caso), utilizando métodos de química quântica;
- A realização da docagem molecular das estruturas otimizadas no sítio de ligação do receptor μ -opióide em suas formas inativa e ativa (disponíveis no banco de estruturas de proteínas PDB);
- A parametrização dos ligantes para permitir sua utilização com o software de dinâmica molecular GROMACS;
- O desenvolvimento de recursos humanos para a área de química computacional/biofísica molecular;
- A promoção de simulações computacionais no ambiente da graduação e pós-graduação do Departamento de Química Biológica.

3. Metodologia

As moléculas que compõem este estudo serão selecionadas a partir de artigos da literatura que relatam comportamentos enviesados das mesmas frente ao receptor μ -opióide. Inicialmente estão pré-selecionadas as substâncias mostradas abaixo, descritas por Kennedy e Crowley. (CROWLEY et al., 2020; KENNEDY et al., 2018) Foram selecionados seis ligantes, sendo três descritos

V SEMANA UNIVERSITÁRIA DA URCA

XXIII Semana de Iniciação Científica

07 a 11 de Dezembro de 2020

Tema: “Os impactos e desafios da pandemia COVID no ensino, pesquisa e extensão”

ISSN 1983-8174



por Kennedy e os outros três por Crowley. O critério para seleção dos mesmos levou em consideração o fator de enviesamento, que se trata da tendência que essas substâncias tem em ativar uma das vias de sinalização do receptor μ -opioide (via da proteína G e via da β -arrestina). Os ligantes C25, K44 e K46 tem viés para a via da proteína G enquanto K01, C07 e C18 para a via da β -arrestina; suas estruturas podem ser vistas na Figura 1. O acompanhamento da literatura poderá levar à inclusão de outras substâncias no estudo.

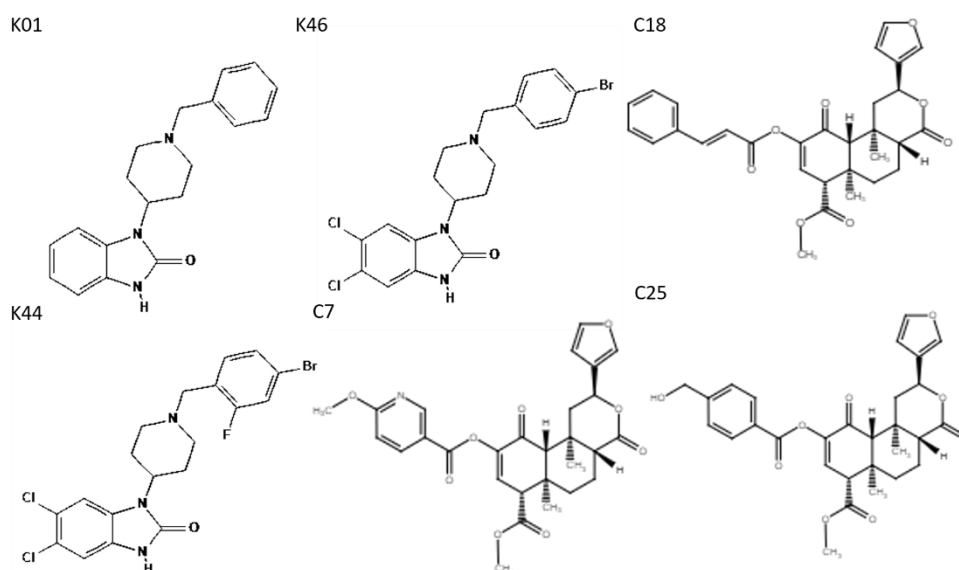


Figura 1: Fórmulas estruturais dos ligantes selecionados para o estudo. Os códigos representam o autor (C – Crowley, K – Kennedy) e o número do composto descrito.

Os ligantes pré-selecionados passarão por um processo de otimização de suas geometrias, utilizando o programa *G.A.M.E.S.S. (General Atomic and Molecular Structure System)*. (Barca, G. M. J. *et al.* 2020). Neste processo também serão calculadas as cargas atômicas parciais, necessárias em etapas futuras.

As estruturas otimizadas serão docadas nas estruturas do receptor μ -opioide em suas formas inativa (código PDB: 4DKL) e ativa (códigos PDB: 5C1M e 6DDF), utilizando o software AutoDock4. (MORRIS *et al.*, 2009) Os parâmetros de docagem serão ajustados para busca por algoritmo genético, 100 corridas com 1.000.000 de avaliações de energia cada. As poses de menor energia serão selecionadas para parametrização e utilização em simulações de dinâmica molecular. Barca, G. M. J. *et al*

As estruturas selecionadas (ligante/receptor) serão parametrizadas com o campo de força Amber, utilizando os programas: RESP, Antechamber, e ACPYPE. (WANG *et al.* 2000; SOUSA, VRANKEN 2012)

V SEMANA UNIVERSITÁRIA DA URCA

XXIII Semana de Iniciação Científica

07 a 11 de Dezembro de 2020

Tema: "Os impactos e desafios da pandemia COVID no ensino, pesquisa e extensão"



4. Resultados

A obtenção de estruturas moleculares otimizadas é o primeiro passo para viabilizar a construção de modelos para simulações. Com a execução do projeto, várias estruturas de ligantes prontas para serem utilizadas em estudos posteriores estarão disponíveis.

Com a docagem molecular serão obtidas poses iniciais para serem utilizadas em simulações de dinâmica molecular. Também é possível, a partir destas realizar algumas inferências a respeito da interação ligante-receptor. A parametrização dos ligantes em suas poses selecionadas compõe uma etapa fundamental para a execução da dinâmica molecular.

5. Conclusão

O estudo de novos ligantes em interação com o receptor μ -opióide, a ser desenvolvido nesse projeto, possibilitará um melhor entendimento em relação a proteína, no que diz respeito principalmente aos mecanismos que levam à sua ativação. As características de ação dos ligantes selecionados, com ativação preferencial de uma das vias de sinalização, possibilitam uma investigação mais ampla do efeito de viés. As estruturas aqui obtidas, ao serem investigadas através de simulações de dinâmica molecular, contribuirão para uma maior compreensão dos fatores determinantes para o desenvolvimento de fármacos com melhor efeito terapêutico, e efeitos colaterais reduzidos.

6. Agradecimentos

GM Santos e RFS Bezerra agradecem ao apoio financeiro da FUNCAP/FECOP/URCA; DM Sena Jr agradece a bolsa de produtividade do CNPq (Processo: 313407/2017-7).

7. Referências

BARCA, G. M. J. *et al.* "Recent developments in the general atomic and molecular electronic structure system". **J Chem Phys**. 2020 Apr 21.

BOHN, L. M. Enhanced Morphine Analgesia in Mice Lacking μ -Arrestin 2. **Science**, v. 286, n. 5449, p. 2495-2498, 1999.

CHANG, S. D. *et al.* Quantitative Signaling and Structure-Activity Analyses Demonstrate Functional Selectivity at the Nociceptin/Orphanin FQ Opioid Receptor. **Molecular Pharmacology**, v. 88, n. 3, p. 502-511, Sep 2015.

CONG, X. *et al.* Structural Determinants for the Binding of Morphinan Agonists to the μ -Opioid Receptor. **PLoS ONE**, v. 10, n. 8, p. e0135998, 2015.

CROWLEY, R. S. *et al.* Synthetic Studies of Neoclerodane Diterpenes from *Salvia divinorum*: Design, Synthesis, and Evaluation of Analogues with Improved Potency and G-protein Activation Bias at the μ -Opioid Receptor. **ACS Chem Neurosci**, v. 11, n. 12, p. 1781-1790, Jun 17 2020.

CROWLEY, R. S. *et al.* Synthetic Studies of Neoclerodane Diterpenes from *Salvia divinorum*: Identification of a Potent and Centrally Acting μ Opioid Analgesic with Reduced Abuse Liability. **J Med Chem**, v. 59, n. 24, p. 11027-11038, Dec 22 2016.

V SEMANA UNIVERSITÁRIA DA URCA

XXIII Semana de Iniciação Científica

07 a 11 de Dezembro de 2020

Tema: "Os impactos e desafios da pandemia COVID no ensino, pesquisa e extensão"



FERREIRA, L. G. et al. Molecular docking and structure-based drug design strategies. *Molecules*, v. 20, n. 7, p. 13384-13421, 2015.

GODÓI, I. P. et al. Docking and QM/MM studies of NS2B-NS3pro inhibitors: a molecular target against the dengue virus. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, v. 28, n. 5, p. 895-906, 2017.

HUANG, W. J. et al. Structural insights into mu-opioid receptor activation. *Nature*, v. 524, n. 7565, p. 315-+, Aug 2015.

KENNEDY, N. M. et al. Optimization of a Series of Mu Opioid Receptor (MOR) Agonists with High G Protein Signaling Bias. *J Med Chem*, v. 61, n. 19, p. 8895-8907, Oct 11 2018.

MANGLIK, A. et al. Crystal structure of the micro-opioid receptor bound to a morphinan antagonist. *Nature*, v. 485, n. 7398, p. 321-6, May 17 2012.

PALCZEWSKI, K. et al. Crystal Structure of Rhodopsin: A G Protein-Coupled Receptor. *Science*, v. 289, n. 5480, p. 739-745, 2000-08-04 00:00:00 2000.

SCHNEIDER, S.; PROVASI, D.; FILIZOLA, M. How Oliceridine (TRV-130) Binds and Stabilizes a mu-Opioid Receptor Conformational State That Selectively Triggers G Protein Signaling Pathways. *Biochemistry*, v. 55, n. 46, p. 6456-6466, Nov 22 2016.

SCHONEBERG, T. et al. Mutant G-protein-coupled receptors as a cause of human diseases. *Pharmacology & Therapeutics*, v. 104, n. 3, p. 173-206, Dec 2004.

SENA JR, D. M. et al. Structural heterogeneity of the mu-opioid receptor's conformational ensemble in the apo state. *Sci Rep*, v. 8, p. 45761, Apr 03 2017.

SHANG, Y.; FILIZOLA, M. Opioid receptors: Structural and mechanistic insights into pharmacology and signaling. *European Journal of Pharmacology*, v. 763, Part B, p. 206-213, 9/15/ 2015.

SOUSA DA SILVA AW, VRANKEN WF. **ACPYPE - AnteChamber PYthon Parser interface**. *BMC Res Notes* 5. 2012 Jul 23;367.

SPETEA, M. et al. The mu Opioid Receptor and Ligands Acting at the mu Opioid Receptor, as Therapeutics and Potential Therapeutics. *Current Pharmaceutical Design*, v. 19, n. 42, p. 7415-7434, Dec 2013.

WANG, J. M., Cieplak, P. & Kollman, P. A. How well does a restrained electrostatic potential (RESP) model perform in calculating conformational energies of organic and biological molecules? *Journal of Computational Chemistry* v.21, p. 1049-1074, Jul 2000.

ZHOU, L.; BOHN, L. M. Functional selectivity of GPCR signaling in animals. *Current Opinion in Cell Biology*, v. 27, p. 102-108, Apr 2014.