

# 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"



### DOCAGEM MOLECULAR EM MÚLTIPLAS CONFORMAÇÕES DO RECEPTOR $\mu$ -OPIÓIDE

Rubem Francisco Silva Bezerra<sup>1</sup>, Guilherme Mota dos Santos<sup>2</sup>, Josué Dantas de Sousa<sup>3</sup>, Mira Raya Paula de Lima<sup>4</sup>, Diniz Maciel de Sena Junior<sup>5</sup>

**Resumo:** O receptor  $\mu$ -opioides ( $\mu$ OR) é um GPCR de classe "A" que está relacionado à regulação de processos fisiológicos. A sua ativação acontece mediante estímulos exógenos ou endógenos que levam a modificações estruturais no  $\mu$ OR, desencadeando um processo de sinalização através da proteína  $G_i$ , resultando em analgesia e sedação. O  $\mu$ OR também pode sinalizar por meio da  $\beta$ -arrestina e essa via é associada aos efeitos indesejáveis dos analgésicos opioides incluindo tolerância, supressão respiratória e constipação. Este trabalho tem como finalidade analisar as conformações estruturais que levam a ativação do  $\mu$ OR através de técnicas computacionais de docagem molecular.

**Palavras-chave:** analgésicos, GPCRs, docking, simulação.

#### 1. Introdução

Os receptores acoplados à proteína G (GPCRs) constituem a maior família de receptores de superfície celular no corpo humano e desempenham um papel fundamental na sinalização celular. Estes se ligam a neurotransmissores, pequenas moléculas, hormônios e outras diversas substâncias, a fim de intermediar respostas entre uma variedade de sinais externos (SIUDA et al., 2017; WU et al., 2017). Cerca de 800 GPCRs são codificados dentro do genoma humano e são distribuídos em quatro classes distintas: A, B, C e F (JAKOWIECKI, 2020).

Estes apresentam uma estrutura em comum de sete  $\alpha$ -hélices transmembranares (TM1-TM7), ligados por três alças intracelulares (ICL1-ICL3) e três extracelulares (ECL1-ECL3) (MANGLIK, 2012). O conhecimento de suas estruturas em vários estágios de ativação, com base no número crescente de estruturas cristalinas resolvidas, é fundamental para a compreensão da farmacologia do receptor.

O receptor  $\mu$ -opioides ( $\mu$ OR) é um GPCR de classe A que está relacionado à regulação de processos fisiológicos. A sua ativação resulta na sinalização através da proteína G inibitória ( $G_i$ ), promovendo analgesia e sedação (JAKOWIECKI, 2020). O  $\mu$ OR pode sinalizar também por meio da via da  $\beta$ -arrestina, sendo esta responsável pelos efeitos indesejáveis dos analgésicos opioides, como a tolerância, à supressão respiratória e à constipação. O  $\mu$ OR

<sup>1</sup> Universidade Regional do Cariri, email: rubem.bezerra@urca.br

<sup>2</sup> Universidade Regional do Cariri, email: guilherme.mota@urca.br

<sup>3</sup> Universidade Regional do Cariri, email: josue.dantas.jds@hotmail.com

<sup>4</sup> Universidade Regional do Cariri, email: mira.lima@urca.br

<sup>5</sup> 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"



tem sido objeto de intenso foco nos esforços de descoberta de novas drogas com a identificação de vários ligantes com eficácia variável. Essas drogas ocupam um amplo espectro químico, desde pequenas moléculas a uma variedade de peptídeos endógenos e sintéticos (HUANG, 2015-; PASTERNAK et al., 2013). Além disso, o  $\mu$ OR é responsável por quase 40 medicamentos aprovados pelo FDA (HAUSER et al., 2018).

Uma proposta para redução dos altos custos inerentes à descobertas de novos fármacos é a utilização de métodos computacionais. Dentre estes métodos pode-se destacar a docagem molecular que busca a predição do modo de ligação de um molécula ligante na região do sítio de ligação do seu receptor, e a técnica de simulação de dinâmica molecular (MD), bastante utilizada para investigar a estrutura e função de biomoléculas e seus respectivos complexos. Esta técnica propicia a flexibilidade de ambos, ligante e receptor, explorando suas interações de maneira mais eficaz e reforçando a complementaridade entre eles. Além disso, há a possibilidade de se trabalhar com sistemas solvatados bem como de implementação de membranas celulares. (NAMBA et al., 2018)

## 2. Objetivos

Predizer a afinidade entre o  $\mu$ OR e fármacos opióides através da docagem molecular, avaliando-se o sítio de ligação em diferentes conformações do receptor, e classificar as estruturas intermediárias com seu respectivo índice de ativação.

## 3. Metodologia

Foram selecionadas estruturas cristalinas do  $\mu$ OR, tanto em sua forma ativa (código PDB: 5C1M) (HUANG, 2015) quanto inativa (código PDB: 4DKL) (MANGLIK, 2012), bem como estruturas representativas, intermediárias, obtidas de trajetórias de MD.

Os ligantes utilizados foram os agonistas Fentanil, PZM21, Sufentanil, Oxycodona; o agonista parcial Naloxona Benzoil-hidrazona e o antagonista Naloxona. Suas estruturas tridimensionais foram obtidas a partir do repositório PubChem. A preparação dos ligantes seguiu o seguinte procedimento: primeiro as estruturas tiveram a sua geometria otimizada utilizando o software G.A.M.E.S.S. (*General Atomic and Molecular Structure System*). (BARCA et al., 2020). Para isso o nível de teoria Hartree-Fock (HF) e a função de base 6-31G(d,p) foram empregados.

## 4. Resultados

Os parâmetros utilizados na docagem molecular foram definidos pelo processo de redocagem a partir de estruturas disponíveis na base de dados PDB. Em seguida todas as estruturas foram processadas utilizando o programa *AutoDockTools4.2* (MORRIS et al., 2009). Apenas para os ligantes foram

# 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



adicionadas cargas parciais de Gasteiger e selecionadas suas ligações rotacionáveis. Para o receptor foram selecionados resíduos considerados flexíveis (D147<sup>3,32</sup>, Y148<sup>3,33</sup>, W293<sup>6,48</sup>, I296<sup>6,51</sup>, V300<sup>6,55</sup>, I322<sup>7,39</sup>, Y326<sup>7,43</sup>, K233<sup>5,39</sup>, H297<sup>6,52</sup>) que apresentam um potencial de interação com o agonista BU72 (HUANG, 2015). O algoritmo Genético Lamarckiano foi utilizado para o processo de docagem molecular. Os parâmetros avaliados na análise de dados são a energia de ligação e os resíduos próximos.

A redocagem do BU72 na estrutura 5C1M reproduziu muito bem a pose original (RMSD= 0,069Å). Os valores obtidos de energia obtidos nas docagens dos outros ligantes nas diversas estruturas, utilizando os mesmos parâmetros, podem ser observados na Tabela 01.

Estrutura		I.A	Energia de ligação / kcal/mol					
Cluster			P21	FEN	SUF	OXY	NBH	NLX
B72	1	38.69	-21,23	-20.57	-21.08	-20.53	-22.51	-21.61
	2	25,08	-23,43	-23.41	-24.02	-24.18	-26.98	-24.43
	3	36.09	-23,88	-24.75	-25.67	-22.5	-25.16	-24.05
MOP	1	-53.78	-24,51	-23.44	-23.8	-24.87	-24.11	-23.96
	2	-47.06	-21,29	-21.22	-22.04	-23.01	-25.01	-24.22
	3	-45.01	-22,42	-22.97	-21.48	-23.13	-24.94	-22.95
NBH	1	-53.96	-21,94	-23.84	-23.23	-21.4	-23.17	-23.25
	2	-68.85	-21,39	-20.54	-19.8	-24.43	-23.5	-23.28
	3	-63.03	-22,51	-20.81	-21.62	-22.13	-22.72	-23.47
	4	-66.5	-22,38	-22.98	-23.28	-23.43	-25.18	-23.98
	5	-45.94	-25,52	-22.6	-24.11	-23.78	-25.02	-24.5
NLX	1	-63.76	-23,73	-22.92	-23.91	-22.59	-24.76	-24.14
	2	-60.26	-25,71	-23.68	-24.22	-24.91	-26.4	-25.72

**Tabela 01** - I.A (índice de ativação); Os ligantes estão representado com 3 letras, os valores de energia estão em kcal/mol. De acordo com o índice de ativação universal somente os Cluster B72 estão com maior proximidade do estado ativado.

Na Figura 2 apresentam-se os ligantes no sítio de ligação em sua conformação de menor energia, é possível observar uma forte tendência de interação com os resíduos D147<sup>3,32</sup>, Y326<sup>7,43</sup> e Y148<sup>3,33</sup>. Esse tipo de contato é análogo ao descrito na literatura (HUANG et al., 2015).

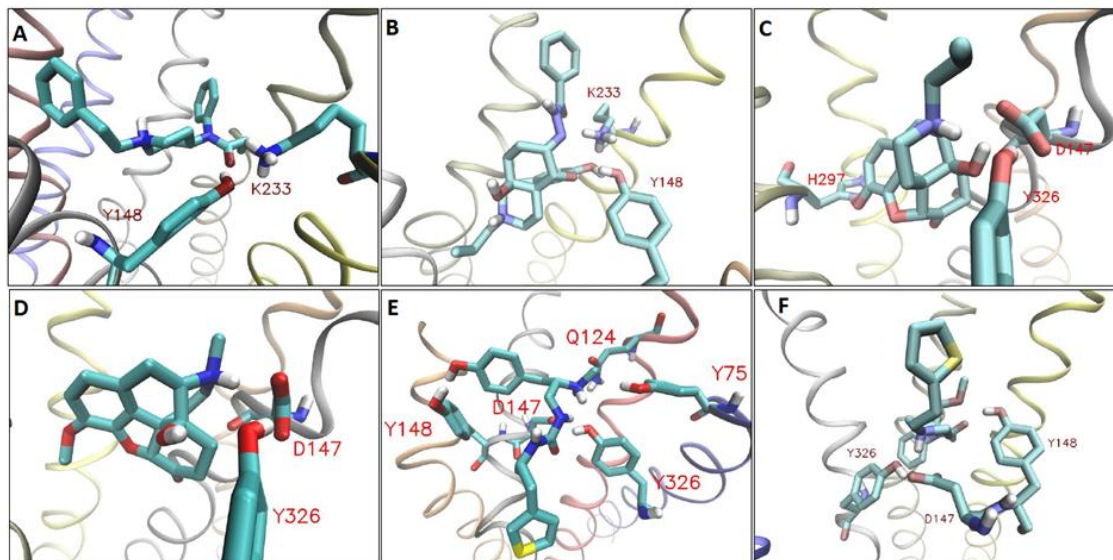
# V SEMANA UNIVERSITÁRIA DA URCA

## 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



**Figura 02** - (A) Fentanil com receptor (B72 - Cluster 03); (B) Naloxona Benzoil-hidrazona com receptor (B72 - Cluster 02); (C) Naloxona com receptor (NLX - Cluster 02); (D) Oxycodona com receptor (NLX - Cluster 02); (E) PZM21 com receptor (NLX - Cluster 02) ; (F) Sufentanil com receptor (B72 - Cluster 03).

A Figura 03D ilustra interação de curta distância D147<sup>3,32</sup> com o grupamento amina protonado, isso se deve ao fato de que esse resíduo é conservado em outros GPCRs e apresenta uma forte tendência a formar pontes salinas com os ligantes. Na Figura 03A e 03B são apresentadas interações com o resíduo K233<sup>5,39</sup> e também Y148<sup>3,33</sup> nos sistemas Fentanil com receptor (B72 - Cluster 03) e Naloxona Benzoil-hidrazona com receptor (B72 - Cluster 02) onde a estrutura do receptor está mais próxima do estado ativo se comparado aos outros sistemas.

## 5 Conclusão

Pôde-se observar que as afinidades dos ligantes variam de acordo com a conformação do receptor. Conformações em um estado de ativação mais alto tendem a favorecer interações com os resíduos K233<sup>5,39</sup>, Y148<sup>3,33</sup>, enquanto aquelas com menor índice de ativação preferem D147<sup>3,32</sup> e Y326<sup>7,43</sup>. A docagem molecular permitiu obter poses que estão sendo preparadas para simulação de dinâmica molecular, nas quais serão feitas análises mais elaboradas para correlacionar as energias de ligação calculadas com os índices de ativação de cada conformação.

## 6 Agradecimentos

# 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"



RFS Bezerra agradece ao apoio financeiro da FUNCAP/URCA/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. *The Journal of Chemical Physics*, v. 152, n. 15, p. 154102, 2020.

HAUSER, A. S. et al. Pharmacogenomics of GPCR drug targets. *Cell*, v. 172, n. 1-2, p. 41-54. e19, 2018.

HUANG, W. et al. Structural insights into  $\mu$ -opioid receptor activation. *Nature*, v. 524, n. 7565, p. 315-321, 2015.

IBRAHIM, P.; WIFLING, D.; CLARK, T. Universal Activation Index for Class A GPCRs. *Journal of chemical information and modeling*, v. 59, n. 9, p. 3938-3945, 2019.

JAKOWIECKI, J. et al. Structural diversity in ligand recognition by GPCRs. In: *GPCRs*. Academic Press, p. 43-63, 2020.

KOEHL, A. et al. Structure of the  $\mu$ -opioid receptor-G $\beta$  i protein complex. *Nature*, v. 558, n. 7711, p. 547-552, 2018.

MANGLIK, A. et al. Crystal structure of the  $\mu$ -opioid receptor bound to a morphinan antagonist. *Nature*, v. 485, n. 7398, p. 321-326, 2012.

MORRIS, G. M. et al. AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility. *J Comput Chem*, v. 30, n. 16, p. 2785-2791, 2009.

NAMBA, A. M.; DA SILVA, V. B.; DA SILVA, C. H. T. P. Dinâmica molecular: teoria e aplicações em planejamento de fármacos. *Eclética Química*, v. 33, n. 4, p. 13-24, 2008.

PASTERNAK, G. W.; PAN, Y. Mu opioids and their receptors: evolution of a concept. *Pharmacological reviews*, v. 65, n. 4, p. 1257-1317, 2013.

SIUDA, E. R. et al. Biased mu-opioid receptor ligands: a promising new generation of pain therapeutics. *Curr Opin Pharmacol*, v. 32, p. 77-84, 2017.

WU, F. et al. Structure and Function of Peptide-Binding G Protein-Coupled Receptors. *Journal of Molecular Biology*, v. 429, n. 17, p. 2726-2745, 2017.