

VI SEMANA UNIVERSITÁRIA DA URCA XXIV SEMANA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA URCA

13 a 17 de Dezembro de 2021

Tema: "Centenário de Paulo Freire: contribuição da divulgação científica e tecnológica em defesa da vida, da cidadania e da educação"

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

Rubem Francisco Silva Bezerra¹, Guilherme Mota dos Santos², Josué Dantas de Sousa³, Mira Raya Paula de Lima⁴, Mariana Alves de Castro⁵, Diniz Maciel de Sena Junior⁶

Resumo: O receptor μ -opióide (μ OR) é um GPCR pertencente à classe "A" que está relacionado à regulação de processos fisiológicos. A ativação do μ OR acontece por intermédio da ligação com pequenas moléculas ou peptídeos, desencadeando um processo de sinalização através da proteína Gi, promovendo efeitos de analgesia e sedação. O μ OR possui outra via de sinalização por meio da β -arrestina que está associada aos efeitos adversos dos analgésicos opioides. Alguns ligantes são capazes de ativar preferencialmente uma das vias em detrimento da outra, abrindo oportunidades de desenvolvimento de fármacos mais potentes e com menos efeitos colaterais. O objetivo deste trabalho foi analisar as conformações estruturais de ligantes reconhecidamente enviesados em complexo com o μ OR através de técnicas computacionais de docagem molecular.

Palavras-chave: analgésicos, docagem molecular, GPCRs, simulação.

1. Introdução

Os receptores acoplados à proteína G (GPCRs) constituem a maior família de receptores de superfície celular no organismo humano e exercem um papel fundamental na sinalização celular. Estes se ligam a neurotransmissores, hormônios e outras diversas substâncias, para intermediar respostas entre uma variedade de sinais externos (SIUDA et al., 2017; WU et al., 2017).

Os GPCRs apresentam similaridades estruturais, são elas: sete α -hélices transmembranares (TM1-TM7), ligadas por três alças intracelulares (ICL1-ICL3) e três extracelulares (ECL1-ECL3) (MANGLIK, 2012). A compreensão de suas estruturas em vários estágios de ativação, com base no número crescente de estruturas elucidadas, é fundamental para a compreensão da farmacologia do receptor.

¹ Universidade Regional do Cariri, email: rubem.bezerra@urca.br

² Universidade Regional do Cariri, email: guilherme.mota@urca.br

³ Universidade Regional do Cariri, email: josue.dantas.jds@hotmail.com

⁴ Universidade Regional do Cariri, email: mira.lima@urca.br

⁵ Universidade Regional do Cariri, email: mariana.castro@urca.br

⁶ Universidade Regional do Cariri, email: dnz@urca.br

VI SEMANA UNIVERSITÁRIA DA URCA XXIV SEMANA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA URCA

13 a 17 de Dezembro de 2021

Tema: "Centenário de Paulo Freire: contribuição da divulgação científica e tecnológica em defesa da vida, da cidadania e da educação"

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

Durante o estudo de desenvolvimento de novos fármacos, é desejável obter moléculas que agem sobre o μ OR e que preferencialmente promovem a ativação da via de sinalização da proteína G. Kennedy e colaboradores (2018) estudaram um conjunto de 51 ligantes derivados da N-benzil piperidina 4-benzimidazolona, com alta tendência à via da proteína G. Outras moléculas, derivadas da salvinorina A, foram avaliadas por Crowley e colaboradores, sendo encontradas com viés tanto para a via da proteína G quanto da β -arrestina, contribuindo para a compreensão do fenômeno de viés.

Uma proposta para redução dos altos custos inerentes às descobertas de novos fármacos é a utilização de métodos computacionais. Métodos como a docagem molecular, que busca a predição do modo de ligação de uma molécula na região do sítio de ligação do seu receptor, e a dinâmica molecular (MD), que investiga a evolução temporal da conformação de biomoléculas e seus respectivos complexos, são amplamente utilizadas. Estas técnicas propiciam a flexibilidade de ambos, ligante e receptor, explorando suas interações de maneira mais eficaz e reforçando a complementaridade entre eles. Além disso, há possibilidade de se trabalhar com sistemas solvatados bem como de implementação de membranas celulares. (NAMBA et al., 2018)

2. Objetivo

Predizer a afinidade entre o μ OR e ligantes com reconhecida ação enviesada no receptor μ -opióide através da docagem molecular, bem como obter poses de ligação iniciais, a fim de serem utilizadas em simulações de dinâmica molecular.

3. Metodologia

Foram selecionadas estruturas cristalinas do μ OR, tanto em sua forma ativa (código PDB: 5C1M) (HUANG, 2015) e (código PDB: 6DDF) quanto inativa (código PDB: 4DKL) (MANGLIK, 2012), obtidas no repositório *Protein Data Bank*.

VI SEMANA UNIVERSITÁRIA DA URCA XXIV SEMANA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA URCA

13 a 17 de Dezembro de 2021

Tema: "Centenário de Paulo Freire: contribuição da divulgação científica e tecnológica em defesa da vida, da cidadania e da educação"

Os ligantes utilizados foram selecionados a partir de artigos da literatura que relatam comportamentos enviesados dos mesmos frente ao receptor μ -opióide. Inicialmente estão pré-selecionadas as substâncias ilustradas na figura_xx, descritas por Kennedy e Crowley. (CROWLEY et al., 2020; KENNEDY et al., 2018). As estruturas tridimensionais foram obtidas utilizando a biblioteca chembl_webresource_client e as ferramentas da coleção RDKit e pubchempy.

Posteriormente, suas geometrias foram otimizadas utilizando o software G.A.M.E.S.S (General Atomic and Molecular Electronic Structure System) com o nível de teoria Hartree-Fock (HF) e com a função de base 6-31g(d,p).

Em seguida, todas as estruturas foram processadas utilizando o programa AutoDockTools4.2 (MORRIS et al., 2009). Para os ligantes foram adicionadas cargas parciais de Gasteiger. Para o receptor foram selecionados os resíduos D147^{3,32}, Y148^{3,33}, W293^{6,48}, I296^{6,51}, V300^{6,55}, I322^{7,39}, Y326^{7,43}, K233^{5,39}, e H297^{6,52} como flexíveis, por apresentarem interação com o agonista BU72 na estrutura ativa de código PDB 5C1M (HUANG, 2015).

O complexo foi orientado ao eixo Z com base na referência do banco de dados OPM (Orientation of Proteins in Membranes). A hidratação do sítio de ligação foi realizada utilizando o software Dowser++. O campo de força Amber99SB-ildn foi utilizado para o receptor, enquanto o campo de força Amber geral (GAFF) foi utilizado para os ligantes e convertido para o padrão GROMACS. O complexo foi então incorporado em uma bicamada de (POPC), e cercado por moléculas de água (TIP3P) utilizando a aplicação g_membed, empregando solução 0,1M de NaCl para neutralizar o sistema. Os complexos foram minimizados utilizando o algoritmo de descida íngreme seguido por minimização de gradiente conjugado. Posteriormente foi feita a equilibração por 100ps a 300K usando o conjunto NVT, seguido de 500ps a 300K e 1bar usando o conjunto NPT. A temperatura e pressão foram mantidas durante o equilíbrio usando o termostato Berendsen e barostato Parrinello-Rahman. Átomos pesados do complexo receptor-ligante e átomos de fósforo (POPC) foram restritos em ambas as simulações de equilíbrio com uma constante de força de 1000kJ/mol nm².

4. Resultados

Name	PubChem CID	tpsa	rotatable_bond	molecular_formula	MW	LogP	NumHD	NumHA
C18	140816317	109.0	7	C30H30O8	518.5	4.8188	0.0	8.0
C25	155375739	129.0	7	C29H30O9	522.5	3.9115	1.0	9.0
C07	132058125	131.0	7	C28H29NO9	523.5	3.8228	0.0	10.0
K01	416359	35.6	3	C19H21N3O	307.3	3.1667	1.0	3.0

VI SEMANA UNIVERSITÁRIA DA URCA XXIV SEMANA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA URCA

13 a 17 de Dezembro de 2021

Tema: "Centenário de Paulo Freire: contribuição da divulgação científica e tecnológica em defesa da vida, da cidadania e da educação"

K46	145978757	35.6	3	C18H16BrCl2N3O	441.1	4.8459	1.0	3.0
K44	130431379	35.6	3	C19H17BrCl2FN3O	473.1	5.3751	1.0	3.0

Tabela 1 - Informações dos ligantes coletadas a partir da biblioteca python pubchempy, no repositório PubChem.

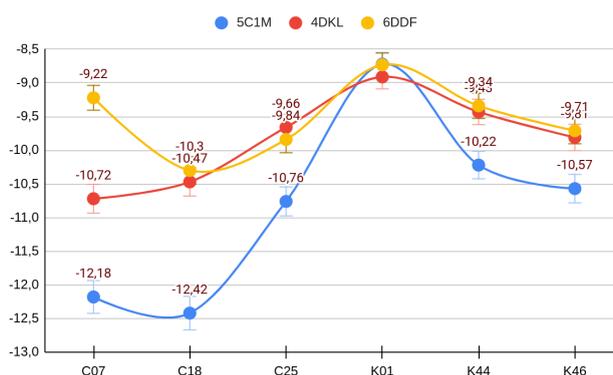


Gráfico 1 - O gráfico apresenta as energias de ligação (em kcal/mol) das poses de menor energia obtidas através da docagem molecular.

Pode-se inferir a partir do (Gráfico 1) que a estrutura ativa do receptor (5C1M) resultou nos menores valores de energia para os ligantes estudado por Crowley. A Figura 1 apresenta os modos de ligação dos ligantes C18, C07 e C25, respectivamente, onde é possível observar que o ligante C18 apresenta apenas majoritariamente interações do tipo hidrofóbico, e do tipo ponte salina com o resíduo HIS54.

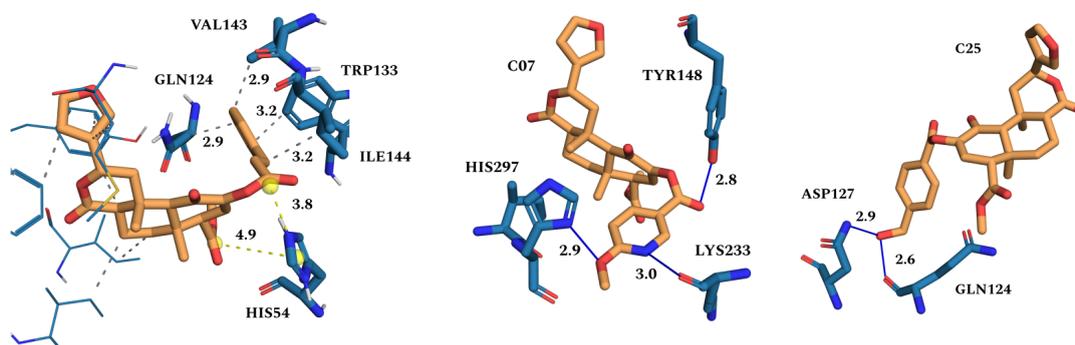


Figura 1 - Poses de menor energia (ligante-5C1M) ordenadas da esquerda para a direita de acordo com os ligantes C18, C07, e C25. O ligante C18 não apresenta ligações de hidrogênio apenas interações hidrofóbicas. As linhas tracejadas representam interações hidrofóbicas e as linhas em azul ligações de hidrogênio.

Os ligantes K44 e K46 apresentados por Kennedy e colaboradores têm grande similaridade no resultado da docagem (Figura 2), ambos apresentando forte interação com os resíduos ASP147, SER329 e ILE 322. Já o ligante K01

VI SEMANA UNIVERSITÁRIA DA URCA XXIV SEMANA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA URCA

13 a 17 de Dezembro de 2021

Tema: "Centenário de Paulo Freire: contribuição da divulgação científica e tecnológica em defesa da vida, da cidadania e da educação"

mostrou pouca variação na energia de ligação para as docagens nas diferentes estruturas do receptor (Gráfico 01).

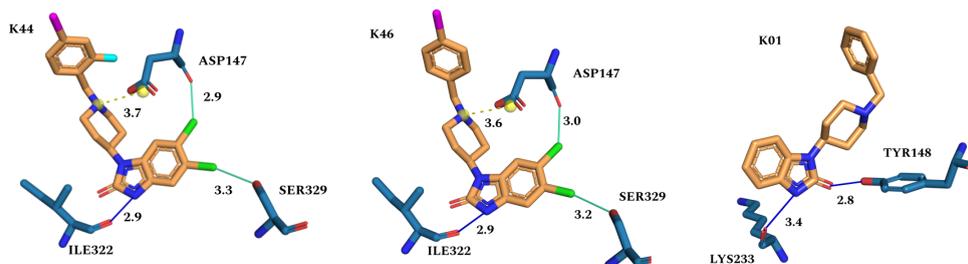


Figura 02 - Poses de menor energia obtidas na docagem dos ligantes K44, K46, e K01, respectivamente, com a estrutura 5C1M.

5. Conclusão

Os resultados obtidos a partir da docagem revelam que os ligantes apresentados por Crowley e colaboradores apresentam maior afinidade com os resíduos ASP147, SER329 e ILE322, já aqueles apresentados por Kennedy e colaboradores mostram semelhanças no modo de ligação, apresentando forte interação dos halogênios. A docagem molecular permitiu obter poses que serão utilizadas com em simulações de dinâmica molecular, com as quais serão feitas análises mais elaboradas para correlacionar as energias de ligação calculadas com os índices de ativação de cada conformação.

6. Agradecimentos

RFS Bezerra agradece ao apoio financeiro da FUNCAP/URCA/FECOP/URCA;

7. Referências

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.

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

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

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

KENNEDY, N. M. et al. Optimization of a Series of Mu Opioid Receptor (MOR) Agonists with

**VI SEMANA UNIVERSITÁRIA DA URCA
XXIV SEMANA DE INICIAÇÃO
CIENTÍFICA DA URCA**

13 a 17 de Dezembro de 2021

Tema: "Centenário de Paulo Freire: contribuição da divulgação científica e tecnológica em defesa da vida, da cidadania e da educação"

High G Protein Signaling Bias. *J Med Chem*, v. 61, n. 19, p. 8895-8907, Oct 11 2018.

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 mu-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 mu Opioid Analgesic with Reduced Abuse Liability. *J Med Chem*, v. 59, n. 24, p. 11027-11038, Dec 22 2016.

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