

**VII SEMANA UNIVERSITÁRIA DA URCA – XXV**  
**Semana**  
**de Iniciação Científica da URCA**  
**e VIII Semana de Extensão da URCA**

12 a 16 de dezembro de 2022

Tema: “DIVULGAÇÃO CIENTÍFICA, INDEPENDÊNCIA E SOBERANIA NACIONAL”



**ESTRUTURA DE LIGANTES ENVIESADOS E DOCAGEM MOLECULAR NO RECEPTOR  $\mu$ -OPIÓIDE**

**Rubem Francisco Silva Bezerra<sup>1</sup>, Mira Raya Paula de Lima<sup>2</sup>, David Bento Serafim<sup>3</sup>, Francisco Isaac Soares Leite<sup>4</sup>, Diniz Maciel de Sena Junior<sup>5</sup>**

**Resumo:** O receptor  $\mu$ -opióide ( $\mu$ OR) é um GPCR pertencente à classe “A” que está relacionado à regulação de processos fisiológicos. A ativação do  $\mu$ OR acontece por intermédio da ligação com pequenas moléculas ou peptídeos, desencadeando um processo de sinalização através da proteína  $G_i$ , promovendo efeitos de analgesia e sedação. O  $\mu$ OR possui outra via de sinalização por meio da  $\beta$ -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  $\mu$ OR através de técnicas computacionais de docagem molecular e dinâmica molecular.

**Palavras-chave:** analgésicos, GPCRs, modelagem molecular.

## 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 de uma variedade de sinais externos (SIUDA et al., 2017; WU et al., 2017).

Os GPCRs apresentam similaridades estruturais, são elas: sete alfa-hélices transmembranares (TM1-TM7), ligadas por três alças intracelulares (ICL1-ICL3) e três extracelulares (ECL1-ECL3) (MANGLIK, 2012).

O receptor  $\mu$ -opióide ( $\mu$ 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 ( $G_i$ ), 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 tolerância, supressão respiratória e constipação. O  $\mu$ OR tem sido importante objeto de estudo na descoberta de novas drogas com a identificação de vários ligantes com eficácia variável. Essas drogas abrangem um amplo espectro químico, desde pequenas moléculas a uma

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

<sup>2</sup> Universidade Regional do Cariri, email: [mira.lima@urca.br](mailto:mira.lima@urca.br)

<sup>3</sup> Universidade Regional do Cariri, email: david.bento@urca.br

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

<sup>5</sup> Universidade Regional do Cariri, email: diniz.sena@urca.br

# VII SEMANA UNIVERSITÁRIA DA URCA – XXV

## Semana

### de Iniciação Científica da URCA e VIII Semana de Extensão da URCA

12 a 16 de dezembro de 2022

Tema: “DIVULGAÇÃO CIENTÍFICA, INDEPENDÊNCIA E SOBERANIA NACIONAL”



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  $\mu$ 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 beta-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, ligantes 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  $\mu$ OR e ligantes com reconhecida ação enviesada no receptor  $\mu$ -opioides através da docagem molecular. Realização simulação de dinâmica molecular com as poses obtidas na docagem molecular.

## 3. Metodologia

Foram selecionadas estruturas cristalinas do  $\mu$ OR, tanto em sua forma ativa (código PDB: 5C1M) (HUANG, 2015) e (código PDB: 6DDF) quanto inativa (código PDB: 4DKL) (MAGLIK, 2012), obtidas no repositório *Protein Data Bank* (<http://rcsb.org>).

Os ligantes que compõe este estudo foram selecionados a partir de artigos da literatura que relatam comportamento enviesados frente ao receptor – opióide. Inicialmente estão pré-selecionadas as substâncias mostradas abaixo, descrita por Kennedy e Crowley. (CROWLEY et al., 2020; KENNEDY et al., 2018).

Os ligantes selecionados foram submetidos ao cálculo de otimização de geometria 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

# VII SEMANA UNIVERSITÁRIA DA URCA – XXV

## Semana de Iniciação Científica da URCA e VIII Semana de Extensão da URCA

12 a 16 de dezembro de 2022

Tema: “DIVULGAÇÃO CIENTÍFICA, INDEPENDÊNCIA E SOBERANIA NACIONAL”



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>, e H297<sup>6.52</sup> 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 convertidos para o padrão GROMACS. O complexo foi então incorporado em uma bicamada de (POPC), e cercado por moléculas de água (TIP3P) utilizando a aplicação membed, empregando solução 0,1 M de NaCl e íons suficientes para neutralizar a carga do sistema. Os complexos foram minimizados utilizando o algoritmo de descida íngreme seguido por minimização de gradiente conjugado. Posteriormente foi feita a equilibração por 100 ps a 300 K usando o conjunto NVT, seguido de 500 ps a 300 K e 1 bar 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 nm<sup>2</sup>.

As simulações de produção foram então realizadas por um tempo de 500ps sem restrição. A temperatura e pressão foram mantidas constante usando o barostato Parrinello-Rahman, submetido no servidor LOVELACE do Centro Nacional de Processamento de Alto Desempenho CENAPAD-SP. E A CORRIDA DE PRODUÇÃO?

## 4. Resultados

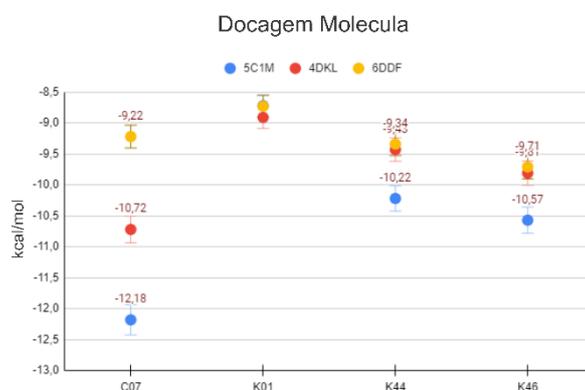


Gráfico 1 –energias de ligação (em kcal/mol) das poses de menor energia obtidas através da docagem molecular.

# VII SEMANA UNIVERSITÁRIA DA URCA – XXV

## Semana de Iniciação Científica da URCA e VIII Semana de Extensão da URCA

12 a 16 de dezembro de 2022

Tema: “DIVULGAÇÃO CIENTÍFICA, INDEPENDÊNCIA E SOBERANIA NACIONAL”

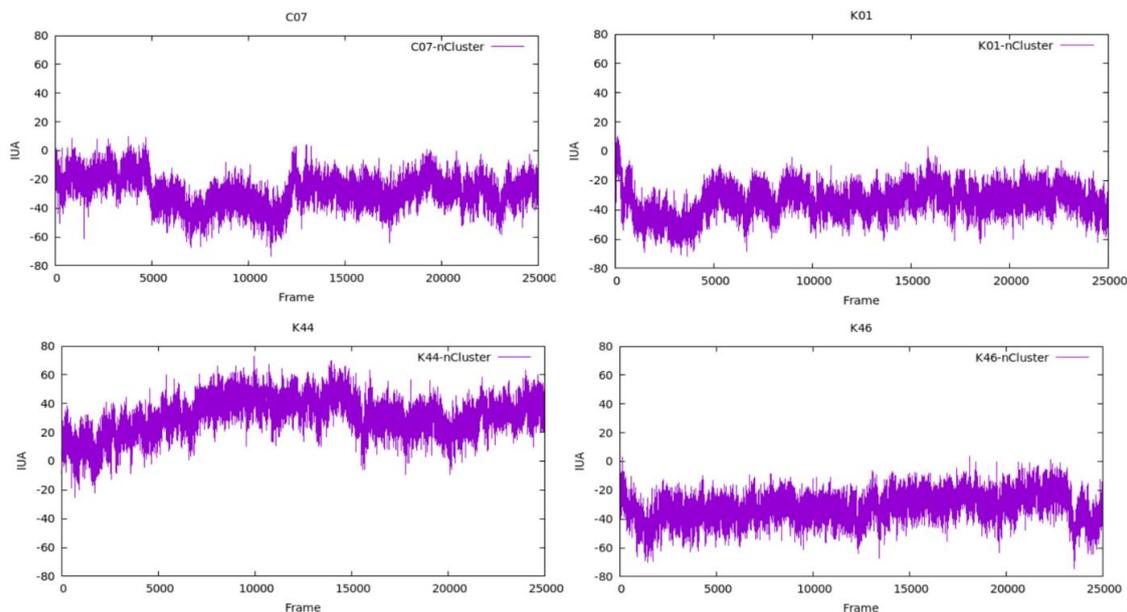


Figura 1 - Índice de ativação x frames, o sistema K44\_5C1M é o único que se apresenta na forma ativa pela análise do Índice universal de ativação.

## 5. Conclusão

Os resultados da docagem (Gráfico 1) mostraram que os sistemas com o receptor 5C1M obteve menor valor de energia para todos os sistemas, já os receptores 4DKL e 6DDF apresentaram uma pequena diferença nos valores de energia para os ligantes apresentados por Kennedy e colaboradores. O sistema C07\_5C1M foi o que apresentou menor valor de energia (-12,18kcal/mol).

A análise da dinâmica molecular pelo índice universal de ativação (Figura 1) mostrou que o sistema K44\_5C1M foi o único que manteve o receptor no estado ativo, apesar do sistema C07\_5C1M apresentar menor valor de energia na docagem molecular, o resultado da dinâmica mostra que o ligante C07 conduz o receptor para o estado inativo. Concluiu-se que as combinações de técnicas computacionais fortalecem a descrição dos sistemas descritos, este trabalho segue em andamento para descrever os sistemas a nível de clusterização e persistência de interação dos resíduos do sítio de ligação. O presente estudo corrobora para o entendimento das nuances do receptor  $\mu$ -opioide.

## 6. Agradecimentos

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

## 7. Referências

**VII SEMANA UNIVERSITÁRIA DA URCA – XXV**  
**Semana**  
**de Iniciação Científica da URCA**  
**e VIII Semana de Extensão da URCA**

12 a 16 de dezembro de 2022

Tema: “DIVULGAÇÃO CIENTÍFICA, INDEPENDÊNCIA E SOBERANIA NACIONAL”



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  $\mu$ -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 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.