



**UNIVERSIDADE REGIONAL DO CARIRI - URCA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE - CCBS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA BIOLÓGICA - PPQB**

JOSUÉ DANTAS DE SOUSA

**AVALIAÇÃO DO SÍTIO DE LIGAÇÃO EM DIFERENTES CONFORMAÇÕES
DO RECEPTOR μ -OPIÓIDE**

**CRATO
2020**

JOSUÉ DANTAS DE SOUSA

**AVALIAÇÃO DO SÍTIO DE LIGAÇÃO EM DIFERENTES
CONFORMAÇÕES DO RECEPTOR μ -OPIÓIDE**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química Biológica, da Universidade Regional do Cariri, como requisito para obtenção do Título de Mestre em Química Biológica.

Orientador: Prof. Dr. Diniz Maciel de Sena Junior

JOSUÉ DANTAS DE SOUSA

**AVALIAÇÃO DO SÍTIO DE LIGAÇÃO EM DIFERENTES CONFORMAÇÕES DO
RECEPTOR μ -OPIÓIDE**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química Biológica, da Universidade Regional do Cariri, como requisito para obtenção do Título de Mestre em Química Biológica.

Dissertação defendida e aprovada em: 27 de janeiro de 2020.

Banca examinadora:

Prof. Dr. Diniz Maciel de Sena Junior
Orientador
(URCA)

Prof. Dr. Carlos Emidio Sampaio Nogueira
Membro avaliador
(URCA)

Prof. Dr. Rogério de Aquino Saraiva
Membro avaliador
(UFRPE)

Prof. Dr. Alexandre Magno Rodrigues Teixeira
Membro avaliador
(URCA)

Prof. Dr. Marinonio Lopes Cornélio
Membro avaliador
(UNESP)

AGRADECIMENTOS

A **Deus**, o autor da minha fé, o Senhor da minha vida, sem Ele nada teria sido possível, a Deus toda a gloria por mais essa vitória;

Aos meus **Pais** pelo amor, dedicação e empenho, sou grato a Deus por tê-los ao meu lado me fortalecendo em meio as dificuldades, me sustentando em meio as tribulações, esse trabalho nada mais é do que fruto da educação e trabalho deles, meus eternos agradecimentos;

Aos meus irmãos **Jesualdo e jeane** que estão comigo em todos os momentos, me encorajando para enfrentar todas as dificuldades;

Ao meu orientador **Prof. Dr. Diniz Maciel de Sena Junior** pela sua paciência e dedicação perante a construção desse trabalho. Agradeço pela oportunidade de ter realizado este trabalho, pela suas orientações e ensinamentos, que possibilitaram o meu crescimento como profissional;

Aos membros do Laboratório de simulações e espectroscopia molecular (**LASEMOL**), que contribuíram de maneira direta e indiretamente para construção deste trabalho;

Aos membros **Banca Examinadora** constituída pelos Professores Dr. Carlos Emidio Sampaio Nogueira, Dr. Rogério de Aquino Saraiva, Dr. Alexandre Magno Rodrigues Teixeira e Dr. Marinonio Lopes Cornélio pelas valiosas contribuições para o aprimoramento deste trabalho;

A Universidade Regional do Cariri (**URCA**) e ao programa de Pós-Graduação em Química Biológica (**PPQB**) pela oportunidade concedida, que contribuiu para minha formação profissional e pessoal.

Dedico este trabalho a Deus que está acima de tudo, aos meus pais Francisca Helena e José Gonçalves que com simplicidade me mostraram o grande valor da vida e me ensinou a correr atrás dos meus sonhos e aos meus irmãos que estiveram sempre comigo. A Deus toda gloria!

“Portanto, quer comais quer bebais, ou façais outra qualquer coisa, fazei tudo para glória de Deus”.

1 Coríntios 10:31

“Porque dele e por ele, e para ele, são todas as coisas; glória, pois, a ele eternamente. Amém”.

Romanos 11: 36

RESUMO

O receptor μ -opióide pertence a uma grande família de receptores acoplados à proteína G e, quando associado a uma pequena molécula, normalmente tem sua estrutura estabilizada em um determinado estado conformacional. Os diferentes estados conformacionais apresentam sutis alterações nos sítios de ligação que promovem distintos perfis de interação ligante-receptor, gerando modos diferentes de sinalização. A utilização de métodos de química computacional se configura em uma estratégia de pesquisa para melhor compreender esta dinâmica de ativação do receptor μ -opióide. Neste sentido, este estudo se propôs a avaliar o sítio de ligação do receptor μ -opióide em diferentes conformações, através da docagem molecular. Para isso, foram selecionados 9 ligantes e associados a 15 estados conformacionais distintos. Os parâmetros de docagem foram definidos através do processo de redocagem e os cálculos realizados utilizando o *software* AutoDock 4.2.6. Estes estados conformacionais foram classificados com base em seu índice universal de ativação. Já os ligantes foram ordenados de acordo com sua afinidade de ligação. Foram estabelecidas relações entre os dados de energia de ligação de um ligante associado a diferentes estados conformacionais, e entre a energia de ligação dos ligantes, classificados em ordem decrescente de afinidade de ligação, associados a um mesmo estado conformacional. Em geral, as conformações do receptor μ -opióide com índice universal de ativação maiores mostraram um padrão entre os valores de energia de ligação.

No entanto, a relação entre os valores calculados de energia de ligação e os valores de K_i ajustados não mostraram uma tendência clara.

Palavras-chave: Receptores acoplados à proteína-G. Opióides. Química computacional. Docagem molecular.

ABSTRACT

The μ -opioid receptor belongs to a large family of receptors coupled to protein G and, when associated with a small molecule, usually has its structure stabilized in a determined conformational state. The different conformational states present subtle changes in the binding sites that promote distinct profiles of ligand-receptor interaction, generating distinct modes of signaling. The use of computational chemistry methods configured as a research strategy to understand better activation dynamics of the μ -opioid receptor. In this sense, this study proposed to evaluate the binding site of the μ -opioid receptor in different conformations, through molecular docking. For this, nine ligands were selected and associated with 15 different conformational states. The parameters docking were defined through the redocking process and the calculations were performed by the software AutoDock 4.2.6. These conformational states were classified based on their universal activation index. The ligands were ordered according to their binding affinity. Relationships were established between the binding energy data of a ligand associated to different conformational states, and between the binding energy of the ligands, classified in descending order of binding affinity, associated with the same conformational state. In general, μ -opioid receptor conformations with higher universal activation index showed a pattern among the binding energy values. However, the relation of calculated binding energies with adjusted K_i values did not show a clear tendency.

Keywords: G protein-coupled receptors. Opioid. Computational chemistry. Molecular docking.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - (a) Representação esquemática simplificada de um GPCR. (b) Estrutura tridimensional de um GPGR (receptor μ -opióide no estado inativo).	16
Figura 2 - (a) Fórmula estrutural e (b) estrutura 3D da morfina.	19
Figura 3 - (a) Fórmula estrutural e (b) estrutura 3D do cebranopadol.	20
Figura 4 - (a) Fórmula estrutural e (b) estrutura 3D do PZM21.	21
Figura 5 - (a) Fórmula estrutural e (b) estrutura 3D da naloxona benzoil-hidrazona.	22
Figura 6 - (a) Fórmula estrutural e (b) estrutura 3D da oliceridina.	23
Figura 7 - (a) Fórmula estrutural e (b) estrutura 3D da buprenorfina.	24
Figura 8 - (a) Fórmula estrutural e (b) estrutura 3D da naloxona.	25
Figura 9 - (a) Fórmula estrutural e (b) estrutura 3D da naldemedina.	26
Figura 10 - Ilustração dos pontos de grade utilizados pelo software AutoDock.	29
Figura 11 - Ligações rotacionáveis da morfina.	30
Figura 12 - Gráficos de correlação entre os valores de energia de ligação e o UAI.	46
Figura 13 - Energia de ligação, por ligante, para as diferentes conformações do MOR.	51

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Estruturas selecionadas para os cálculos de redocagem.....	32
Tabela 2 - Estruturas representativas (obtidas de trajetórias de dinâmica molecular) utilizadas nos cálculos de docagem molecular.	33
Tabela 3 - Ligantes selecionados para os cálculos de docagem molecular.	33
Tabela 4 - Parâmetros ajustados no processo de redocagem.....	35
Tabela 7 - Média dos valores de RMSD entre as poses com a menor energia de ligação obtidas no processo de redocagem das estruturas MOR, KOR, DOR, NOP, A2AR, β 1AR e β 1AR e a poses dos seus respectivos ligantes co-cristalizados.	41
Tabela 8 - Valores de RMSD obtidos das poses resultantes do processo de redocagem.	42
Tabela 9 - Valores de energias de ligação dos complexos cristalizados e dos complexos formados no processo de redocagem.....	43
Tabela 10 - Melhores valores de RMSD entre os clusters analisados de cada estrutura representativa.....	44
Tabela 11 - Valores de índice de ativação universal de estados conformacionais do MOR...	45
Tabela 12 - Dados dos ensaios de afinidade de ligação utilizados na construção do 1º fator de conversão e razões entre os valores de K_i do MOR humano e murino.....	47
Tabela 13 - Dados dos ensaios de afinidade de ligação utilizados na construção do 2º fator de conversão e razões entre os valores de K_i do MOR humano e murino.....	48
Tabela 14 - K_i experimental e ajustado de opióides.	49

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

GPCR	Receptor acoplado à proteína G (<i>G protein coupled receptor</i>)
MOR	Receptor μ -opióide (<i>μ-opioid receptor</i>)
SNC	Sistema nervoso central
TGI	Trato gastrointestinal
KOR	Receptor k-opióide (<i>k-opioid receptor</i>)
DOR	Receptor δ -opióide (<i>δ-opioid receptor</i>)
NOP	Receptor opióide nociceptina/ orfanina FQ (<i>Nociceptin/ orphanin FQ opioid receptor</i>)
MOP	Morfina
CAS	<i>Chemical abstracts service</i>
CBP	Cebranopadol
P21	PZM21
OLI	Oliceridina
BUP	Buprenorfina
NLX	Naloxona
NDM	Naldemedina
DDBE	Design de drogas baseado em estrutura
DDBL	Design de drogas baseado em ligantes
AGL	Algoritmo genético Lamarckiano
PDB	Banco de dados de proteínas (<i>Protein data bank</i>)
A2AR	Receptor adenosina A _{2A} (<i>A_{2A} adenosine receptor</i>)
B1AR	Receptor β ₁ -adrenérgico (<i>β₁-Adrenergic receptor</i>)
B2AR	Receptor β ₂ -adrenérgico (<i>β₂-Adrenergic receptor</i>)
RMSD	Desvio quadrático médio (<i>Root-mean-square deviation</i>)
G.A.M.E.S.S.	<i>General atomic and molecular structure system</i>
UAI	Índice universal de ativação (<i>Universal activation index</i>)

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	13
2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	16
2.1 RECEPTORES ACOPLADOS À PROTEÍNA G (GPCR)	16
2.2 RECEPTOR μ -OPIÓIDE	17
2.3 FÁRMACOS OPIÓIDES UTILIZADOS NO ESTUDO.....	18
2.3.1 MORFINA	18
2.3.2 CEBRANOPADOL	19
2.3.3 PZM21.....	20
2.3.4 NALOXONA BENZOIL-HIDRAZONA.....	21
2.3.5 OLICERIDINA	22
2.3.6 BUPRENORFINA	23
2.3.7 NALOXONA	24
2.3.8 NALDEMEDINA	25
2.4 QUÍMICA COMPUTACIONAL PARA O DESENVOLVIMENTO RACIONAL DE FÁRMACOS	26
2.5 DOCAGEM MOLECULAR	27
3 OBJETIVOS.....	31
3.1 GERAL.....	31
3.2 ESPECÍFICOS	31
4 METODOLOGIA.....	32
4.1 ESCOLHA DAS ESTRUTURAS DE RECEPTORES E LIGANTES	32
4.2 PREPARAÇÃO PARA DOCAGEM.....	34
4.3 DOCAGEM MOLECULAR	34
4.3.1 DETERMINAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE DOCAGEM MOLECULAR	34
4.3.2 DOCAGEM DOS SISTEMAS DE INTERESSE.....	38
4.4 ÍNDICE UNIVERSAL DE ATIVAÇÃO (UAI).....	40
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	41
4.1 PROCESSO DE REDOCAGEM	41

4.2 UAIDAS ESTRUTURAS DO MOR E ASSOCIAÇÃO COM A ENERGIA DE LIGAÇÃO OBTIDAS NOS CÁLCULOS DE DOCAGEM	44
4.3 ENERGIA DE LIGAÇÃO VERSUS AFINIDADE DE LIGAÇÃO	46
5 CONCLUSÃO	52
REFERÊNCIAS	53
APÊNDICE	61

1 INTRODUÇÃO

Os receptores acoplados à proteína G (GPCRs) são componentes cruciais em diversos processos de sinalização celular. Com cerca de 900 genes humanos os GPCRs compõem a maior família de receptores transmembranares (TAN; LIU, 2018). Tais receptores têm se apresentado como um dos principais alvos farmacológicos em humanos, correspondendo a mais de um terço de todos os medicamentos atualmente comercializados (FANG et al., 2015; SAKKAL et al., 2017).

Dentre esses receptores está o receptor μ -opióide (MOR) que é responsável por mediar a maioria das propriedades analgésicas dos opióides (PELLISSIER et al., 2018). Este pertence à família de GPCRs de classe A, ligado à proteína G inibitória (G_i) (CHENG et al., 2018). Ao ser ativado, inibe a enzima adenilil ciclase e, conseqüentemente, diminui a síntese do monofosfato cíclico de adenosina (cAMP), regulando desta forma os canais iônicos (MEGURO et al., 2018).

O receptor μ -opióide (MOR) está localizado em diversas regiões do corpo humano, como no coração, articulações, no sistema nervoso central (SNC) e imunológico e no trato gastrointestinal (TGI). Esta distribuição facilita o uso dos opióides, pois independentemente do local de origem da dor, estes podem atuar e produzir analgesia (MADHUSOODANAN, 2018). Estes efeitos terapêuticos produzidos pelos analgésicos opióides decorrem da ativação do MOR seguida da via de sinalização mediada pela proteína G inibitória (GILMAN, 1984). Já os efeitos colaterais, como a depressão respiratória, são resultado da via de sinalização da β -arrestina (RAEHAL et al., 2005).

Atualmente, existem três estruturas do MOR obtidas pelo processo de cristalização e disponíveis no repositório Protein Data Bank (PDB, www.rcsb.org), sendo a mais recente complexada com a proteína G_i (código PDB: 6DDE) e associada, em sua forma ativa, ao agonista DAMGO (KOEHL et al., 2018). As demais estruturas foram cristalizadas nos estados ativo (código PDB: 5C1M) e inativo (código PDB: 4DKL), as quais estão associadas na porção intracelular a um fragmento de anticorpo (HUANG et al., 2015) e a uma lisozima T4 (MANGLIK et al., 2012) respectivamente.

As diferenças estruturais observadas na superfície extracelular, contemplando o sítio de ligação, entre os estados inativo e ativo do MOR são relativamente pequenas, com mudanças mais significativas na porção amino-terminal (HUANG et al., 2015). O processo de ativação promove mudanças conformacionais nas estruturas das 7 hélices transmembranares, geralmente com a movimentação das TM6 e TM7 em direção contrária dos seguimentos intracelulares

(SCHWARTZ et al., 2006). Esse deslocamento da TM6 possibilita o surgimento de uma cavidade na porção intracelular destes receptores, permitindo a ligação das proteínas efetoras. Essa cavidade é ampliada também pela movimentação da TM5 que se distânciada do núcleo do receptor (FILIPEK, 2019).

A associação entre o MOR e uma pequena molécula, estabiliza a sua cavidade intracelular, em um equilíbrio conformacional entre estados ativo, inativo e intermediários, onde a população de MOR estabilizada em cada estado conformacional, determinará os níveis de sinalização mediados pela proteína G e pela β -arrestina (OKUDE et al., 2015).

Longas simulações de dinâmica molecular podem ser utilizadas para a observação das transições de estados conformacionais durante o processo de ativação dos GPCRs (MONDAL et al., 2020). O nível de ativação desses estados conformacionais oriundos de DM e também do processo de cristalização da estrutura de um GPCR podem ser indicados através de um modelo de índice de ativação baseado nas interhelix distances, desenvolvido por IBRAHIM et al. (2019).

Geralmente, diferentes estados conformacionais apresentam modificações distintas na estrutura do sítio de ligação (SENA et al., 2021). Este fato possibilita que haja perfis diferentes de interação para um mesmo ligante, gerando mudanças sutis no sítio de ligação que produzem modos diferentes de sinalização. Dessa forma, esclarecer a dinâmica estrutural dos GPCRs é fundamental para entender a fisiologia desses receptores e possibilitar a realização de estudos para o desenvolvimento de medicamentos baseados em estrutura de forma mais eficiente (LATORRACA et al., 2017).

O conhecimento da estrutura desses receptores viabiliza a aplicação de métodos computacionais de desenvolvimento de medicamentos baseados em estrutura, os quais tem recebido maior atenção da indústria farmacêutica e dos centros de pesquisas acadêmicas (LEELANANDA; LINDERT, 2016). Estes são ferramentas poderosas para restringir o número de potenciais candidatos a medicamentos em ensaios experimentais, isso não só possibilita uma redução dos custos relacionados à pesquisa, mas também a diminuição do tempo para que o mesmo esteja disponível no mercado (LEELANANDA; LINDERT, 2016).

Um dos métodos da química computacional que é frequentemente utilizado para o estudo das interações no complexo ligante-receptor é a docagem molecular, que segundo FERREIRA et al. (2015) se configura como uma ferramenta essencial para o início das pesquisas de desenvolvimento de novas drogas, sendo utilizada quando se deseja prever, com um considerado grau de precisão, essas interações. Estes métodos, de acordo com LATORRACA et al. (2017), também fornecem informações importantes que possibilitam a

comparação entre diferentes estados conformacionais quando associados a um mesmo ligante. Essa compreensão da dinâmica de ativação do MOR contribui para direcionar os estudos de desenvolvimento de fármacos que apresentam um perfil de ativação pretendido.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 RECEPTORES ACOPLADOS À PROTEÍNA G (GPCR)

Os GPCRs formam a maior família de proteínas transmembranares codificadas por aproximadamente 900 genes presentes no genoma humano, sendo responsáveis pela sinalização celular em vários processos, e estão relacionados com a percepção de diversos estímulos extracelulares (TAN; LIU, 2018; MIYAGI et al., 2020). Estes receptores também regulam as funções sensoriais como visão, paladar, olfato, e medeiam as funções endócrinas, cardiovasculares, reprodutivas e neurológicas (DE FRANCESCO et al., 2017).

Os GPCRs podem ser classificados de acordo com o sistema AF que é baseado nas semelhanças funcionais e em suas sequências de aminoácidos, onde cada letra entre A e F representa uma classe. A classe A, ou semelhante à rodopsina, possui o maior número de representantes, incluindo os que modulam a ação de neurotransmissores, hormônios e a captação de luz (HU et al., 2017).

Em relação a sua estrutura, todos os GPCRs compartilham uma arquitetura em comum composta de um domínio transmembranar formado por um feixe de sete α -hélices (TM1-7) interligadas por três alças extracelulares (ECL1-3) e por três alças intracelulares (ICL1-3), sendo essencial no processo de transdução de sinal através da membrana plasmática, como mostrado na Figura 1 (MUSIANI et al., 2014).

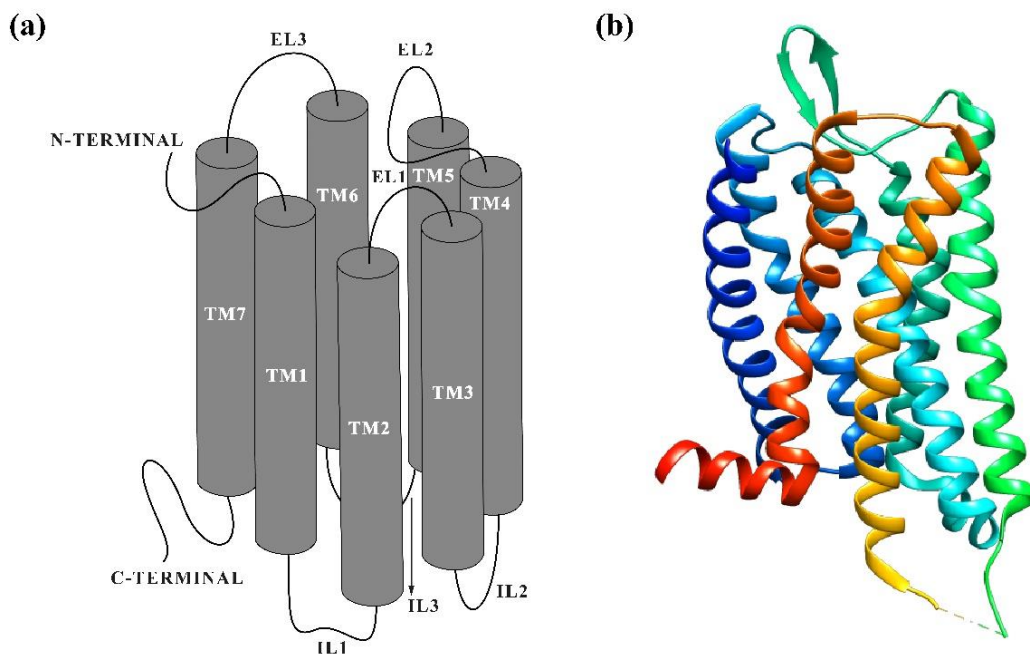


Figura 1 - (a) Representação esquemática simplificada de um GPCR. (b) Estrutura tridimensional de um GPCR (receptor μ -opióide no estado inativo).

Especificamente, os GPCRs que integram com a classe A apresentam apenas um domínio transmembranar com a região amino-terminal localizada no meio extracelular e a região carboxi-terminal no meio intracelular, e seus ligantes nativos se ligam diretamente neste domínio (LATORRACA et al., 2017).

A interação entre um GPCR e ligantes extracelulares promove alterações na estrutura do receptor que o leva a transitar por estados conformacionais que são capazes de ativar transdutores intracelulares como as proteínas G e β -arrestinas (RIBEIRO; FILIZOLA, 2019). A ativação do GPCR ocorre geralmente pela ligação de um agonista ao sítio ortostérico, de forma semelhante aos ligantes endógenos. Quando há a interação com antagonistas ou agonistas inversos ocorre o deslocamento do equilíbrio conformacional em direção às conformações inativas do receptor, no entanto, quando há a ligação com um agonista parcial o resultado esperado é a estabilização das conformações intermediárias entre os estados inativo e ativo do receptor (OKUDE et al., 2015; RIBEIRO; FILIZOLA, 2019).

2.2 RECEPTOR μ -OPIÓIDE

Os receptores opióides são membros da família de GPCRs de classe A e estão distribuídos extensamente pelo cérebro. Também estão presentes na medula espinhal e no TGI e se configuram os principais alvos dos analgésicos opióides. Existem cinco tipos de receptores opióides, sendo estes: o kappa (KOR), delta (DOR), nociceptina / orfanina FQ (NOP), zeta (ζ) e o mu (MOR) (CHAN et al., 2017).

O MOR pode ser ativado por um espectro diversificado de substâncias de origem natural ou sintética, como a endorfina, metadona e a morfina (SOUNIER et al., 2015). Seu mecanismo de sinalização após ativação é através da via da proteína G_i , porém pode levar à ativação da via da β -arrestina, cujo recrutamento está relacionado ao surgimento de efeitos colaterais como a depressão respiratória (KOEHL et al., 2018).

A ativação do MOR por um agonista no mesencéfalo promove a formação de impulsos inibitórios descendentes para a substância cinzenta periaquedutal e para o núcleo reticular paragigantocelular, levando ao estímulo dos neurônios inibidores descendentes, os quais ativam os neurônios que armazenam encefalina e 5-hidroxitriptamina, que quando liberados diminuem a transmissão nociceptiva. (TOUBIA; KHALIFE, 2019).

Esse processo de ativação do MOR ocorre através da interação de um ligante com diversos resíduos em seu sítio de ligação, os quais influenciam na afinidade de ligação deste ligante ao MOR, como por exemplo os resíduos D114 (SURRETT et al., 1994), D147 (LI et al., 1999), e o H297 (BOT et al., 1998). Já os resíduos D128, N150, K303 e W318 demonstram atuar na seletividade do ligante pelo MOR (CHAVKIN et al., 2001).

2.3 FÁRMACOS OPIÓIDES UTILIZADOS NO ESTUDO

Os agonistas dos receptores opióides representam a classe de fármacos analgésicos mais eficaz e clinicamente relevante para o tratamento da dor aguda e crônica (SPAHN et al., 2018). Entretanto, a sua utilização é limitada devido à alta ocorrência de efeitos colaterais graves (NARVÁEZ et al., 2015). Tal fato contribuiu para que houvesse um direcionamento dos esforços para o desenvolvimento de fármacos opióides com menos efeitos adversos (THOMPSON et al., 2015; SPAHN et al., 2018).

Estes efeitos colaterais podem ser revertidos pelo uso de antagonistas opióides (como a naloxona) ou amenizados com o uso agonistas parciais (a buprenorfina, por exemplo), caso sejam administrados em tempo hábil, sendo extremamente importantes nos casos de intoxicação por opióides (STOTTS et al., 2009; FREEMAN et al., 2018). Os agonistas parciais opióides também apresentam grande relevância clínica quando se deseja um efeito analgésico menor do que os agonistas totais e em casos onde é necessário a interrupção da utilização dos opióides (pacientes que desenvolveram dependência, por exemplo) (ALEIXO; TUDURY, 2005).

2.3.1 MORFINA

A morfina (MOP) (número CAS: 57-27-2, Figura 2), protótipo dos opióides, é um alcaloide fenantreno extraído originalmente da espécie *Papaver somniferum*, o qual age como agonista em todos os receptores opióides e se liga preferencialmente ao MOR. Quando associado a este receptor localizado no SNC, pode produzir forte efeito analgésico, com depressão do SNC, depressão respiratória e promover dependência (DEVEREAUX et al., 2018; QUE et al., 2019). Já quando os receptores presentes no TGI são ativados, podem produzir constipação (BHAVE et al., 2017). Estes efeitos podem ser intensificados com o aumento da dose administrada, podendo ser fatais no caso da depressão respiratória ou produzir intenso desconforto como na constipação severa (DEVEREAUX et al., 2018).

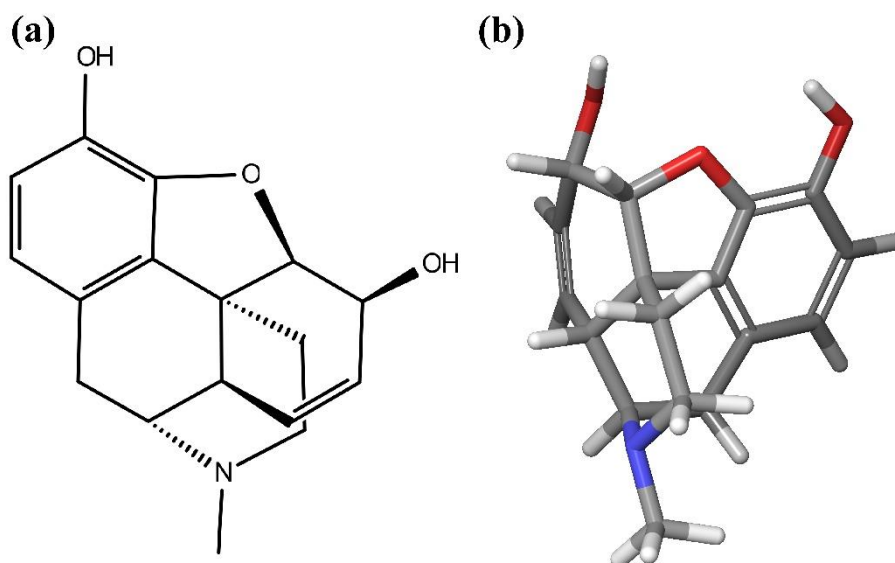


Figura 2 - (a) Fórmula estrutural e (b) estrutura 3D da morfina.

Sendo considerada a primeira linha no tratamento da dor crônica, a MOP é utilizada para o alívio da dor de intensidade moderada a grave, em pacientes com ou sem câncer (KIM et al., 2016). A sua utilização por um período prolongado pode proporcionar o desenvolvimento de tolerância aos seus efeitos analgésicos, podendo ser superado com o aumento da dosagem do fármaco. No entanto, tal conduta aumenta o risco de surgimento de efeitos colaterais graves, o que limita a sua aplicação na prática médica (KIM et al., 2016; ZENG et al., 2020).

2.3.2 CEBRANOPADOL

O cebranopadol (CBP) (número CAS: 863513-91-1, Figura 3) é um potente analgésico opióide de ação central que atua como agonista do NOP e MOR, com afinidade semelhante entre estes receptores, e também como agonista parcial do KOR. Quando comparado aos demais opióides, este apresenta efeitos analgésicos semelhantes, porém com menos efeitos colaterais (NAIR et al., 2020).

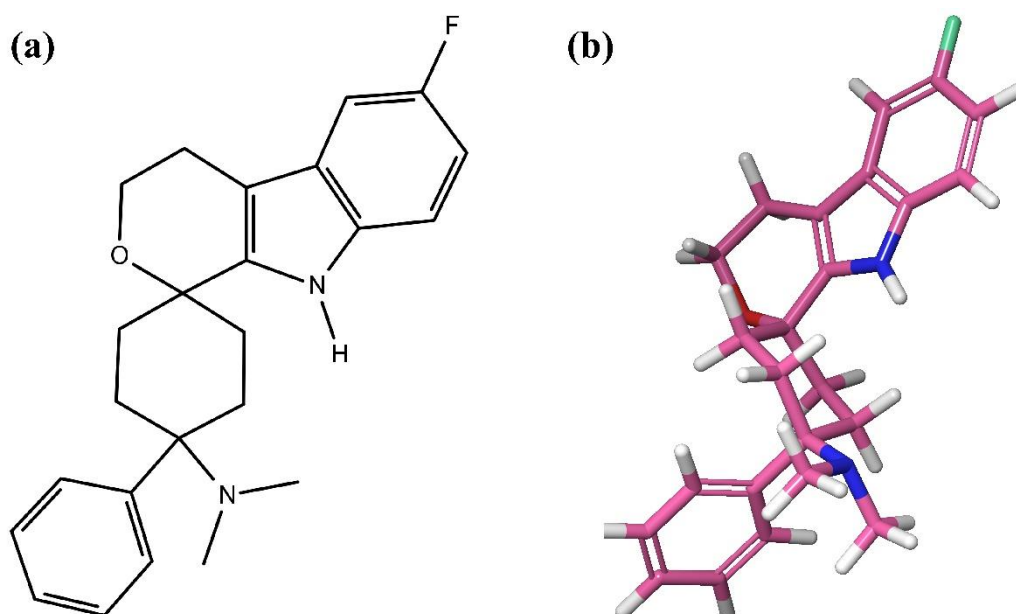


Figura 3 - (a) Fórmula estrutural e (b) estrutura 3D do cebranopadol.

Estas características do CBP já haviam sido anteriormente observadas no estudo realizado por LINZ et al. (2014), onde o CBP apresentou uma potente ação antinociceptiva para o alívio da dor aguda e crônica em ratos, demonstrando maior potência quando comparado com agonistas seletivos do MOR. Nesse estudo o cebranopadol também apresentou ação prolongada e com menor capacidade de desenvolvimento de tolerância analgésica em relação a MOP.

Em ensaios clínicos desenvolvidos com diversos animais, o CBP foi eficiente em reduzir a dor de diferentes intensidades e origens como a dor aguda, dor de origem nociceptiva, inflamatória e cancerosa e, principalmente, a dor neuropática crônica (RAFFA et al., 2017). Este fármaco quando comparado com os opióides típicos como a MOP, mostra maior potência na inibição da dor de intensidade crônica de origem neuropática do que a dor aguda de origem nociceptiva (GOHLER et al., 2019).

2.3.3 PZM21

O PZM21 (P21) (número CAS:1997387-43-5, Figura 4) é um novo e potente agonista enviesado, com ação seletiva para o MOR, e mínima ativação da via da β -arrestina. Ele também apresenta menos efeitos colaterais em comparação com os opióides atuais e não causa depressão respiratória, ao contrário da MOP (MANGLIK et al., 2016). Estudos realizados por KUDLA et al. (2019), mostraram por meio de ensaios experimentais que o P21 possui ação analgésica dose-dependente sem induzir impulsos recompensadores. No entanto, pode desenvolver tolerância e sintomas de abstinência.

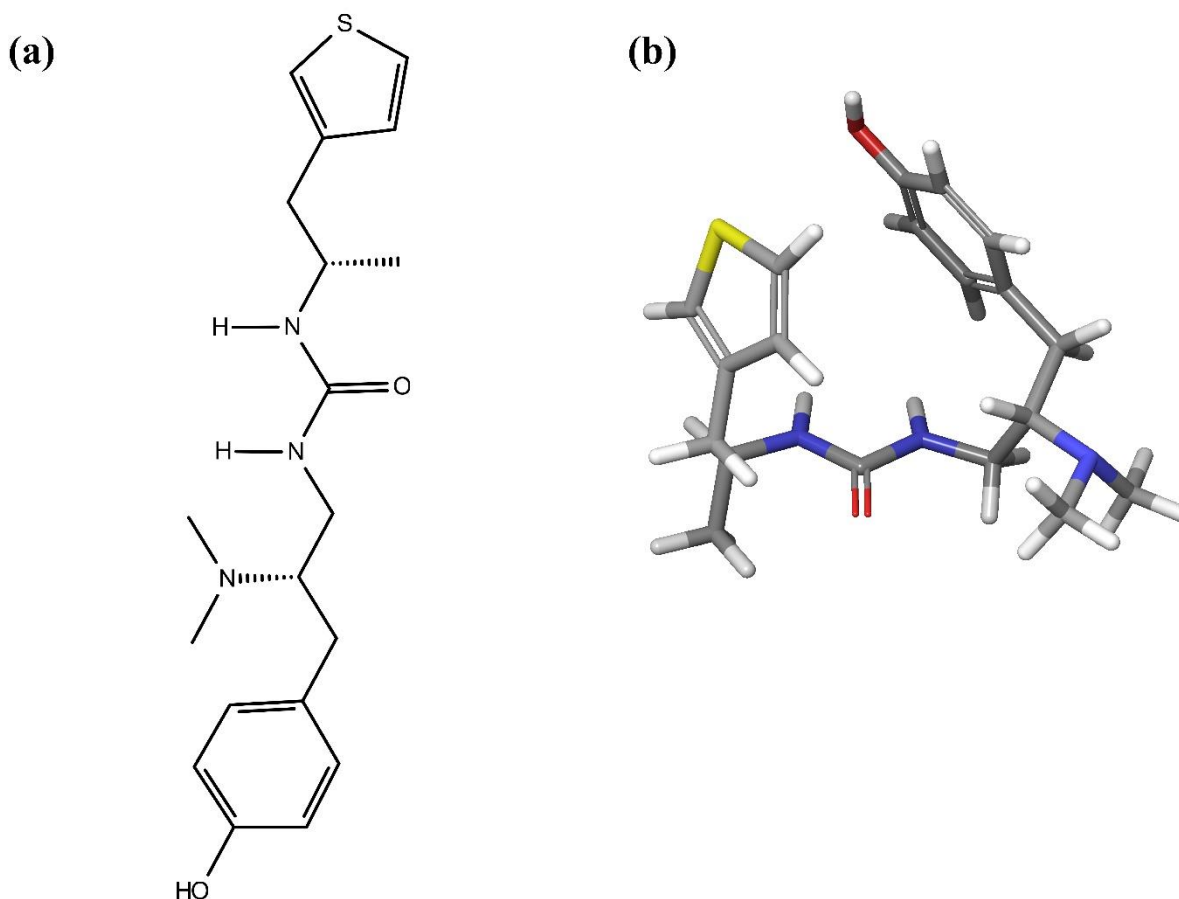


Figura 4 - (a) Fórmula estrutural e (b) estrutura 3D do PZM21.

Outros estudos apresentaram uma análise diferente do perfil de eficácia e sinalização do P21. Em estudos desenvolvidos por HILL et al. (2018), onde o processo de sinalização do P21 e sua incapacidade de produzir depressão respiratória em ensaios *in vitro* com células HEK 293 que expressam o MOR foi reavaliado, concluiu-se que o P21 possui baixa eficácia para ambas as vias de sinalização (proteína G e β -arrestina) e que promove depressão respiratória semelhante a MOP.

Já YUDIN e ROHACS (2019) realizaram ensaios de eletrofisiologia onde foi analisada a dinâmica de sinalização do P21 no processo de dissociação da proteína G associada ao MOR. Eles mostraram que P21 age como agonista parcial do MOR. Já nos estudos desenvolvidos por DING et al. (2020), onde foi avaliada a ação do P21 em primatas não humanos por administração sistêmica e intratecal, observou-se que este apresentou ação antinociceptiva, com efeitos reforçador e pruriginoso com perfil semelhante à oxicodeona e à MOP.

2.3.4 NALOXONA BENZOIL-HIDRAZONA

A naloxona benzoil-hidrazona (NBH) (número CAS: 119630-94-3, Figura 5) se configura como um potente antagonista não competitivo do MOR e competitivo do NOP, e também age como agonista parcial quando associado ao KOR e ao MOR (BERZETEI-GURSKE et al., 1995; CHIOU, 2001; OLIANAS et al., 2006). A NBH pode também ser classificada como agonista parcial de baixa eficácia do NOP, dependendo da localização do receptor, da densidade deste no tecido, e da sua afinidade de ligação (MCDONALD et al., 2003; LAMBERT, 2008).

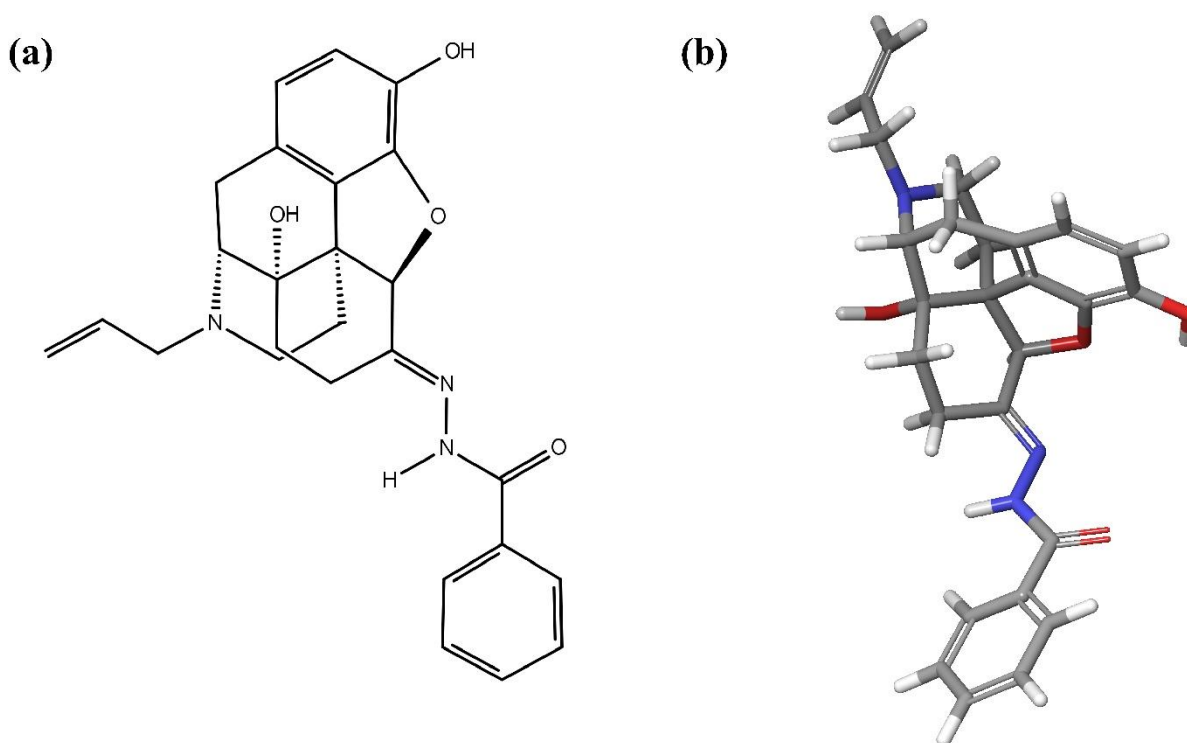


Figura 5 - (a) Fórmula estrutural e (b) estrutura 3D da naloxona benzoil-hidrazona.

A NBH se liga com maior afinidade de ligação ao KOR do que ao MOR, e também apresenta maior afinidade de ligação do que o antagonista naloxona, quando associado a KOR, MOR, DOR e NOP. No entanto, sua afinidade por DOR e NOP é menor quando comparado ao MOR (OZAKI et al., 2000).

2.3.5 OLICERIDINA

A oliceridina (OLI) (número CAS: 1401028-24-7, Figura 6) é um opióide experimental intravenoso, considerado um agonista enviesado do MOR de última geração, atuando seletivamente na ativação da via da proteína G em detrimento da via da β -arrestina, com menor recrutamento desta via comparado aos opióides tradicionais (CHEN, X. T. et al., 2013). Seus

efeitos analgésicos são semelhantes e em alguns casos superiores aos da MOP. Em ensaios clínicos, este apresentou um perfil maior de segurança com relação ao efeito de depressão respiratória comparado à MOP (SINGLA, N. K. et al., 2019; AYAD et al., 2020).

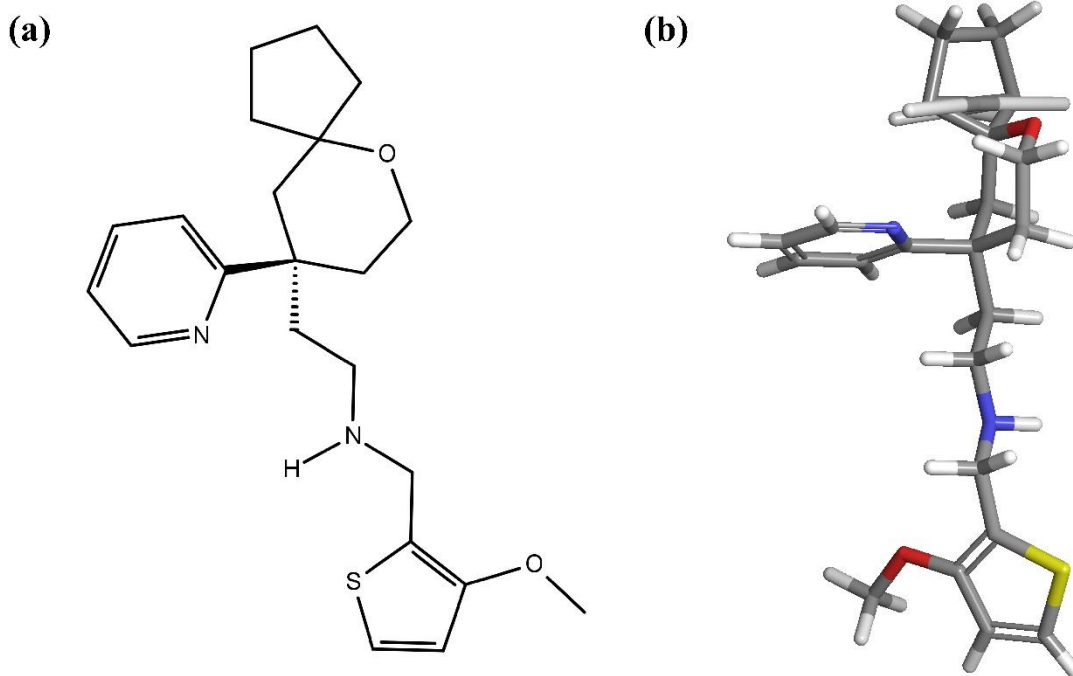


Figura 6 - (a) Fórmula estrutural e (b) estrutura 3D da oliceridina.

Em ensaios clínicos, a OLI foi capaz de produzir, de maneira eficaz, rápida analgesia semelhante à MOP em pacientes submetidos a procedimentos cirúrgicos que sofriam com dor moderada a intensa, apresentando um perfil aceitável de segurança e tolerabilidade, com uma janela terapêutica maior em comparação à MOP (SINGLA, N. et al., 2017). Na fase III de ensaios clínicos com um grupo amostral de 401 pacientes submetidos a abdominoplastia, a OLI foi também considerada um opióide seguro e eficaz para o alívio da dor aguda de intensidade moderada a grave (SINGLA, N. K. et al., 2019).

2.3.6 BUPRENORFINA

A buprenorfina (BUP) (número CAS: 52485-79-7, Figura 7) é um agonista parcial que possui alta afinidade de ligação ao MOR, age também como antagonista do DOR e do KOR, e como antagonista de baixa afinidade de ligação ao NOP. Sua ação como agonista parcial do MOR fornece efeito analgésico com intensidade semelhante à dos seus agonistas totais (GUDIN; FUDIN, 2020). Com base em suas propriedades farmacocinéticas e

farmacodinâmicas, a BUP mostra ser um analgésico eficaz e seguro para o alívio da dor crônica em comparação aos agonistas opióides plenos do MOR (PERGOLIZZI; RAFFA, 2019).

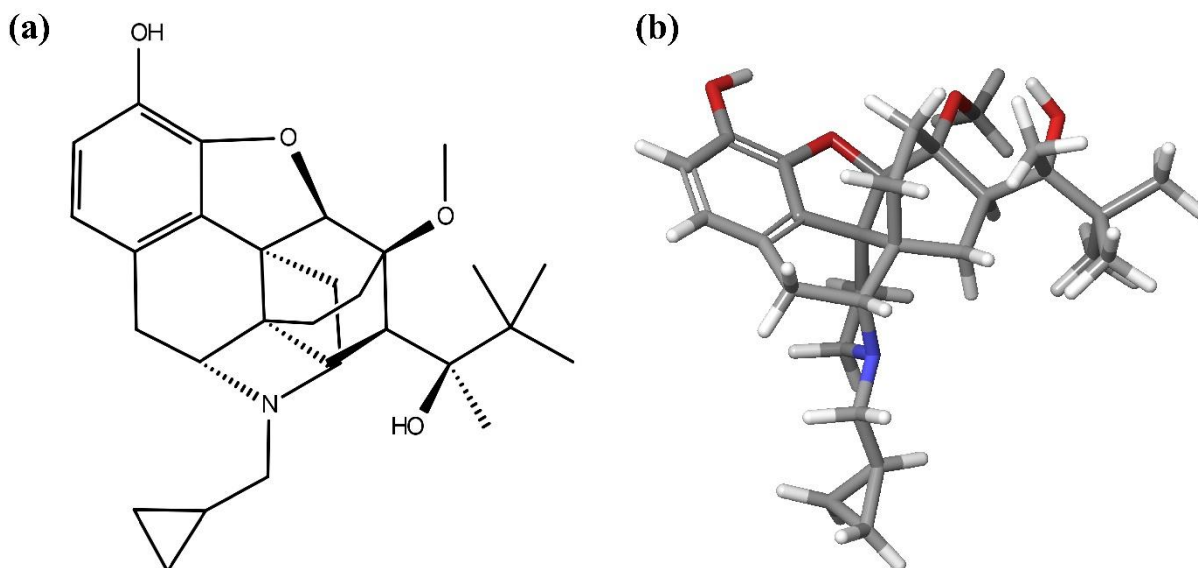


Figura 7 - (a) Fórmula estrutural e (b) estrutura 3D da buprenorfina.

Pela sua longa duração de ação, e devido ao fato de produzir com menor intensidade efeitos de abstinência comparado aos demais opióides, a BUP tem sido prescrita para o tratamento de pacientes com dependência, causada pelo uso abusivo ou por overdose de opióides, se apresentando como um substituto seguro e eficaz do antagonista naloxona (ACAMPORA et al., 2020; ZAMANI et al., 2020).

2.3.7 NALOXONA

A naloxona (NLX) (número CAS: 465-65-6, Figura 8), derivado sintético da oximorfona, é um antagonista competitivo e não seletivo dos receptores opióides. A alta afinidade de ligação ao MOR, permite que a NLX desloque os opióides do sítio de ligação, revertendo temporariamente os seus efeitos colaterais como a depressão respiratória, sendo utilizada nos casos de intoxicação e overdose por opióides (MOSS et al., 2020; YARLAGADDA et al., 2020).

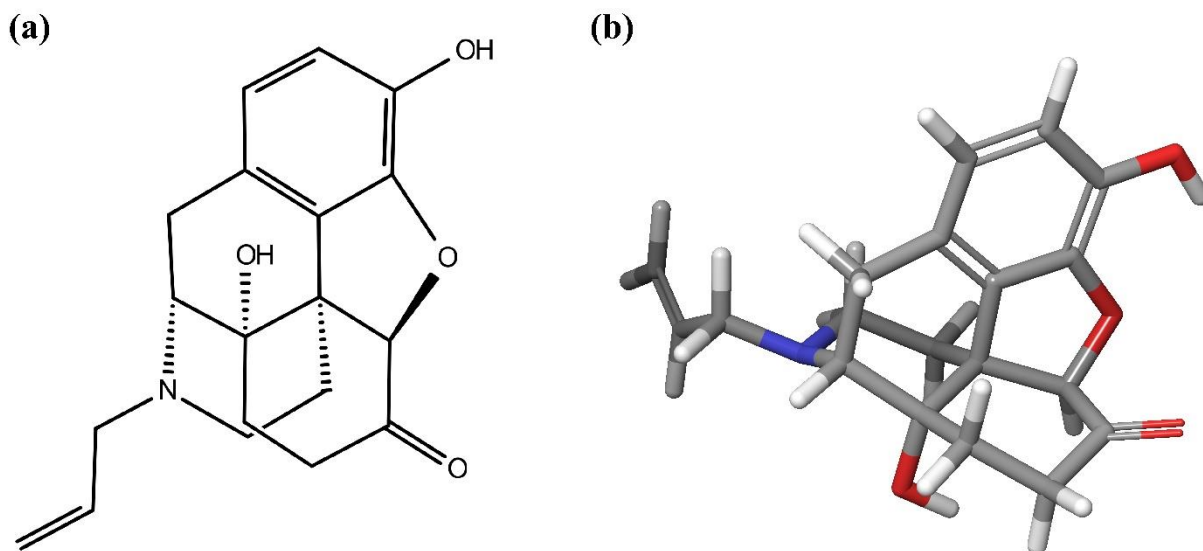


Figura 8 - (a) Fórmula estrutural e (b) estrutura 3D da naloxona.

Apesar dos seus benefícios na reversão dos sintomas nos casos de overdose por opióides, a administração de uma superdosagem de NLX pode também representar risco à saúde. Em um estudo retrospectivo, onde foram observados os dados clínicos de 1831 pacientes que fizeram tratamento com NLX, observou-se que a aplicação de altas doses deste antagonista está associada ao desenvolvimento de complicações pulmonares (FARKAS et al., 2020).

2.3.8 NALDEMEDINA

A naldemedina (NDM) é um antagonista do MOR de ação periférica com administração por via oral. Por não atravessar a barreira hematoencefálica, a NDM não inibe a ação analgésica dos agonistas opióides e não causa efeitos de abstinência. Sua ação farmacológica ocorre no MOR localizado no TGI, revertendo os efeitos adversos periféricos ocasionados pelo uso de opióides, em especial, a constipação intestinal (BLAIR, 2019). É geralmente bem tolerada, até mesmo, em tratamento mais prologados, sendo eficaz no tratamento da constipação intestinal em pacientes que utilizam constantemente analgésicos opióides para o alívio da dor oncológica ou dor crônica não oncológica (BLAIR, 2019; INAGAKI et al., 2019).

Quanto à sua estrutura (número CAS: 916072-89-4, Figura 9), a NDM é uma amina derivada da naltrexona, na qual é adicionada uma cadeia lateral (2-(3-fenil-1,2,4-oxadiazol-5-il)propano-il) acetamida. Esta modificação confere maior peso molecular ao fármaco e também promove o aumento de sua polaridade, dificultando a sua passagem pela barreira hematoencefálica (COLUZZI et al., 2020).

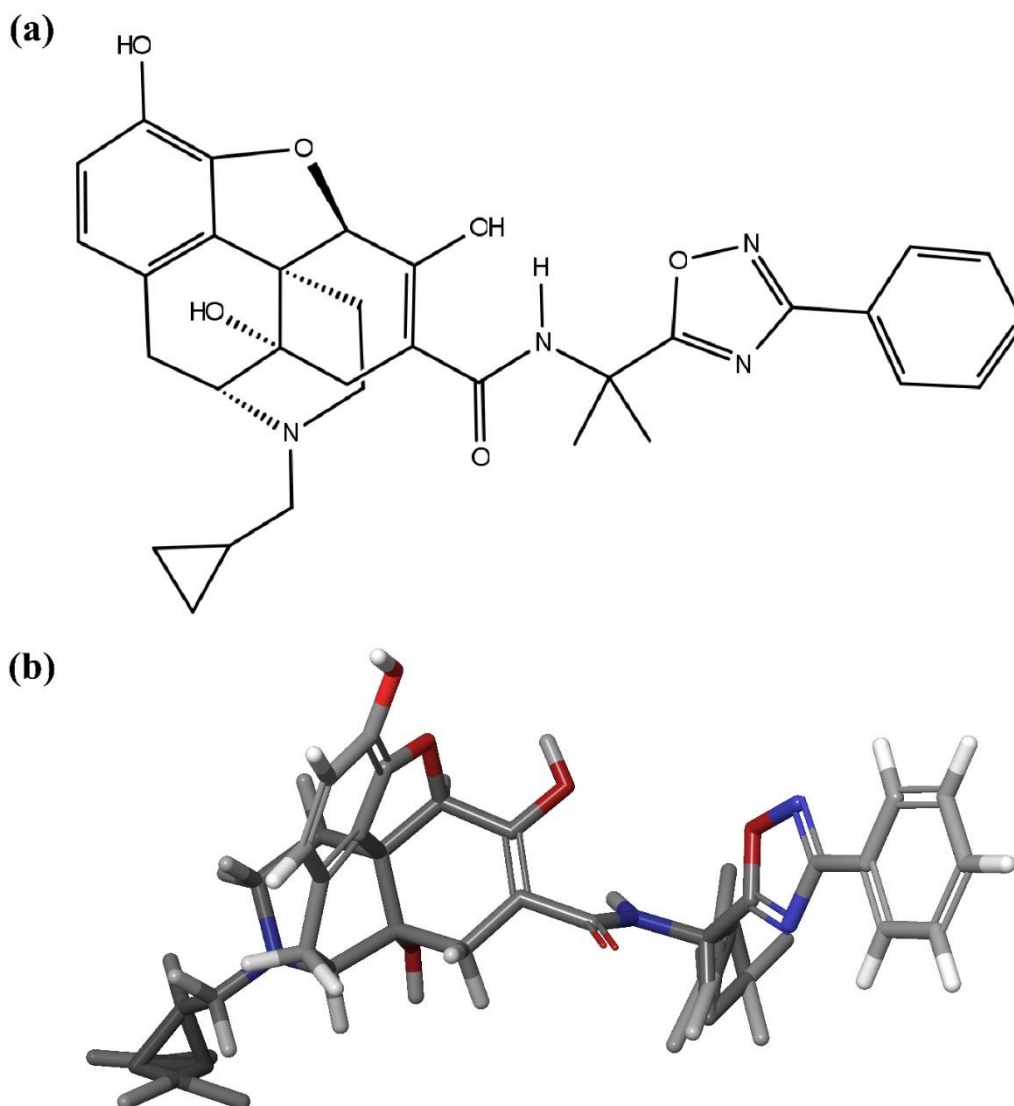


Figura 9 - (a) Fórmula estrutural e (b) estrutura 3D da naldemedina.

2.4 QUÍMICA COMPUTACIONAL PARA O DESENVOLVIMENTO RACIONAL DE FÁRMACOS

O desenvolvimento de um novo fármaco é um processo oneroso e complexo que pode levar de 10 a 15 anos desde as pesquisas iniciais até sua entrada no mercado, com um investimento da ordem de 2,6 bilhões de dólares (PICCIRILLO; AMARAL, 2018). A química computacional é uma estratégia que permite ser mais assertivo no direcionamento de pesquisas para o desenvolvimento de novos fármacos, reduzindo os custos do processo e o tempo de lançamento no mercado. Além do mais, esses métodos favorecem a diminuição do número de cobaias utilizadas em testes pré-clínicos (LEELANANDA; LINDERT, 2016).

Os métodos computacionais podem ser classificados em métodos de *design* de drogas baseado em estrutura (DDBE) ou baseado em ligantes (DDBL). Os métodos DDBE utilizam os dados obtidos da estrutura tridimensional do alvo molecular com o intuito de identificar os

possíveis locais de ligação e as interações mais favoráveis que levam à ativação do receptor, definindo, portanto, as principais características que um ligante deve ter para realizar um acoplamento ideal (YU; MACKERELL, 2017).

Já os métodos de DDBL utilizam do conhecimento disponível sobre as características fundamentais de um fármaco conhecido, as quais proporcionam o seu efeito biológico, para investigar substâncias que apresentam tais propriedades (ACHARYA et al., 2011). Ambas as estratégias (DDBE e DDBL) são utilizadas com o intuito de identificar compostos promissores que possuem funções terapêuticas relevantes, o que otimiza o desenvolvimento de novos fármacos (FERREIRA et al., 2018).

2.5 DOCAGEM MOLECULAR

Um dos principais métodos de DDBE, frequentemente usado na previsão da conformação e orientação de uma pequena molecular dentro de uma estrutura alvo é a docagem molecular (KALYAANAMOORTHY; CHEN, 2011; FERREIRA et al., 2015). Este método pode ser aplicado em diversas etapas no processo de desenvolvimento de um fármaco, como para previsão do modo de ligação entre o ligante e o receptor, na identificação de potenciais ligantes, e até no cálculo da afinidade de ligação (BARTUZI et al., 2017).

Os *softwares* que realizam a docagem molecular são fundamentados em um algoritmo de busca que explora todo o cenário energético de um sistema em busca das melhores conformações que possibilitam uma ligação mais estável (GUEDES et al., 2014). Eles são também baseados em uma função de pontuação que atribui pontuações às conformações obtidas pelo algoritmo de busca e os classifica, orientando qual conformação é mais favorável a uma ligação (GRASEL, 2013).

Os algoritmos de busca podem ser classificados em método determinístico (como a dinâmica molecular), em métodos estocásticos que modificam de forma aleatória os graus de liberdade de um sistema (os algoritmos evolucionários, por exemplo), e em métodos sistemáticos onde todos os graus de liberdade do ligante são explorados durante a pesquisa (por exemplo algoritmos sistemáticos exaustivos) (GUEDES et al., 2014).

Já as funções de pontuação podem ser baseadas em um campo de força que são fundamentados na mecânica molecular; no conhecimento, onde as interações mais favoráveis são aquelas mais exploradas durante o processo de docagem; ou empírica, que representa a soma de diversos termos de energia como a ligação de hidrogênio, interações de van der Waals, entropia e outros, de um sistema (SALMASO; MORO, 2018).

O algoritmo genético lamarckiano (AGL) é um híbrido do algoritmo genético, classificado como método estocástico evolucionista, e considera os conceitos evolutivos de Jean Baptiste de Lamarck (MORRIS et al., 1998). Este acreditava que características fenotípicas que eram adquiridas ao longo da vida poderiam ser transmitidas para as gerações seguintes (PAULINO et al., 2020). No processo de busca, as adaptações do sistema realizadas sobre o indivíduo original serão herdadas por seus descendentes, que substituirão as conformações anteriores, e então serão utilizadas como parâmetro para as próximas gerações (MORRIS et al., 1998).

O *software* AutoDock, escolhido para este estudo, é capaz de realizar a previsão de forma rápida e precisa das conformações estruturais e das energias de ligação entre os ligantes e seus alvos macromoleculares (MORRIS et al., 2009). Este utiliza um método baseado em grades (Figura 10) onde uma macromolécula alvo é incorporada. Em seguida uma sonda é inserida em cada ponto da grade e então é calculada a energia de interação entre os átomos do alvo e a sonda, sendo então armazenada essa informação em mapas de energia. O *software* utiliza estes valores como referência durante as simulações de docagem. Ele também associa uma função de pontuação baseada no campo de força empírico de energia livre com um algoritmo de busca estocástico, o AGL, fornecendo uma previsão rápida e eficaz. Este método foi calibrado por meio de estudos de validação com 188 complexos ligante-receptor com energias de ligação e estruturas conhecidas, e foi observado um erro padrão entre 2 a 3 kcal/mol entre os resultados de energia de ligação (MORRIS et al., 2009).

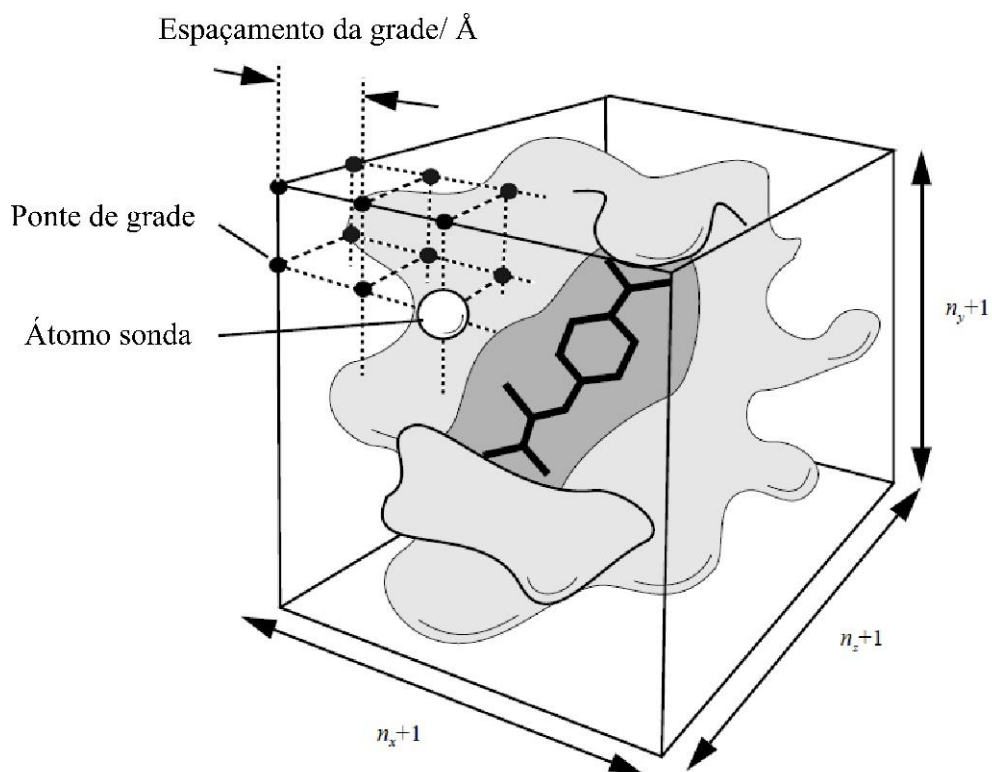


Figura 10 - Ilustração dos pontos de grade utilizados pelo software AutoDock.

Fonte: Manual do usuário do *software* AutoDock, MORRIS et al. (2001). Disponível em: http://autodock.scripps.edu/faqs-help/manual/autodock-3-user-s-guide/AutoDock3.0.5_UserGuide.pdf, manual do usuário.

Métodos de docagem molecular são estratégias de alto desempenho para o desenvolvimento de estudos que visam investigar, dentro de um conjunto de vários compostos, um ligante que interaja corretamente com uma macromolécula. Essas simulações podem ser executadas considerando o receptor rígido ou flexível. Na abordagem rígida a estrutura macromolecular permanece estática enquanto as ligações rotacionáveis do ligante são livres para girar (**Erro! Fonte de referência não encontrada.**Figura 11), e buscam se adequar da melhor forma ao sítio de ligação. Já na abordagem flexível, os ligantes e as estruturas pertencentes ao sítio de ligação 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 (GODÓI et al., 2017).

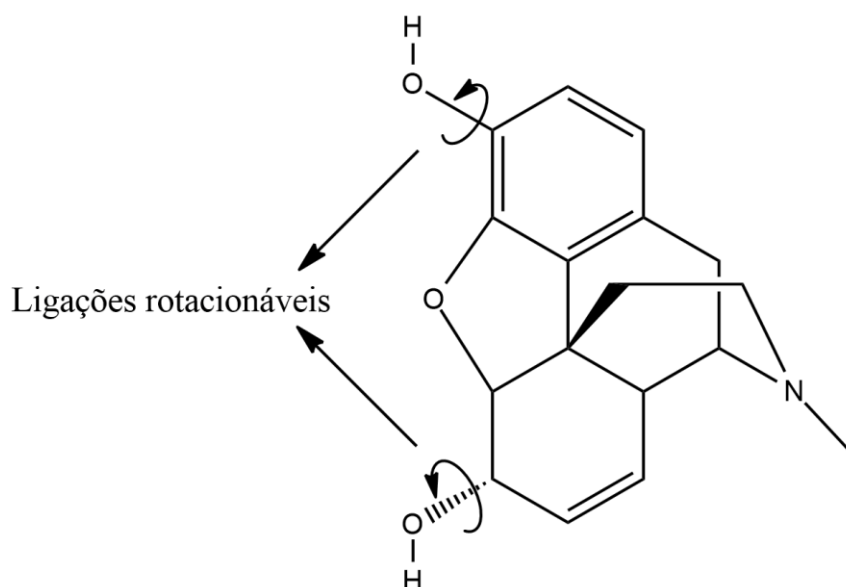


Figura 11 - Ligações rotacionáveis da morfina.

A predição correta da pose de um ligante leva em consideração todos os graus de liberdade conformacionais de uma forma ágil e eficiente. Então a dificuldade de previsão de uma ligação pode aumentar à medida que a flexibilidade do ligante for maior. De forma ampla, a procura do sítio de ligação pode ser feita através de quatro métodos sendo estes: os baseados em um campo de força, os que utilizam algoritmos genéticos (evolutivos), os que se baseiam na construção incremental e os que buscam uma complementaridade de formas entre o ligante e o receptor (PICCIRILLO; AMARAL, 2018).

3 OBJETIVOS

3.1 GERAL

Este estudo se propôs avaliar o sítio de ligação do MOR em diferentes conformações através da docagem molecular.

3.2 ESPECÍFICOS

- Realizar a redocagem dos ligantes cristalizados com os GPCRs previamente selecionados, a fim de melhor ajustar os parâmetros para as docagens subsequentes.
- Realizar a docagem molecular entre antagonistas, agonistas totais e parcial selecionados e o MOR em diferentes estados conformacionais.
- Classificar os estados conformacionais do MOR utilizados quanto ao seu nível de ativação.
- Classificar os ligantes utilizados quanto a sua afinidade de ligação pelo MOR.
- Estabelecer uma relação de afinidade entre os tipos de ligantes (antagonista, agonista total e parcial) e os estados conformacionais.

4 METODOLOGIA

4.1 ESCOLHA DAS ESTRUTURAS DE RECEPTORES E LIGANTES

Para o processo de redocagem foram utilizados vários complexos conhecidos com características semelhantes, os quais foram separados e novamente unidos utilizando o método de docagem escolhido. Para este processo foram selecionados 9 GPCRs de classe A, utilizando como critérios de escolha a disponibilidade no PDB, a maior resolução disponível, e que apresentaram maior integridade em sua sequência de aminoácidos. As macromoléculas selecionadas estão listadas na Tabela 1, com seus respectivos estados de ativação, códigos PDB, ligante co-cristalizado, e resolução.

Tabela 1 - Estruturas selecionadas para os cálculos de redocagem.

Receptor	Estado de ativação	Código PDB	Ligantes co-cristalizado	Resolução (Å)
MOR	Ativo	5C1M	BU72	2,100
KOR	Ativo	6B73	MP1104	3,100
DOR	Inativo	4N6H	Naltrindol	1,800
NOP	Inativo	5DHH	SB-612111	3,004
Adenosina A_{2A} (A_{2A}R)	Ativo	2YDV	NECA	2,600
β₁-adrenérgico (β₁AR)	Ativo	2Y02	Carmoterol	2,600
	Inativo	2YCW	Carazolol	3,000
β₂-adrenérgico (β₂AR)	Ativo	4LDE	BI167107	2,790
	Inativo	2RH1	Carazolol	2,400

Fonte: Autor.

Para a realização dos cálculos de docagem molecular foram selecionadas estruturas cristalinas do MOR, tanto na forma ativa (código PDB: 5C1M) quanto inativa (código PDB: 4DKL), bem como estruturas representativas, intermediárias, obtidas de trajetórias de dinâmica molecular, tendo em vista que entre os estados ativo e inativo dos receptores existe um conjunto de conformações com diferenças estruturais sutis que levam a alterações na afinidade de ligação. Foram utilizadas 13 estruturas representativas de cada cluster encontrado, obtidas de simulações do MOR com os ligantes B72, MOP, NBH e NLX, como listadas na Tabela 2 (SENA et al., 2021).

Tabela 2 - Estruturas representativas (obtidas de trajetórias de dinâmica molecular) utilizadas nos cálculos de docagem molecular.

Sistemas	Estrutura representativa
MOR-B72	B72_1
	B72_2
	B72_3
MOR-MOP	MOP_1
	MOP_2
	MOP_3
MOR-NBH	NBH_1
	NBH_2
	NBH_3
	NBH_4
	NBH_5
MOR-NLX	NLX_1
	NLX_2

Fonte: Autor.

Os ligantes selecionados para os cálculos de docagem molecular (Tabela 3) foram 5 agonistas totais do MOR sendo estes: B72 (ligante co-cristalizado com o MOR no estado ativo), MOP (opióide prototípico), OLI, CBP e P21; os agonistas parciais BUP e NBH; e os antagonistas NLX, e NDM. Com exceção do B72, obtido juntamente à estrutura 5C1M, os demais foram obtidos através do banco de dados PubChem (pubchem.ncbi.nlm.nih.gov).

Tabela 3 - Ligantes selecionados para os cálculos de docagem molecular.

Ligantes	Formula SMILES	Fórmula molecular
B72	<chem>CC12CC34C=CC1(C(C35CCN(C4CC6=C5C=C(C=C6)O)C)NC2C7=CC=CC=C7)OC</chem>	C ₂₈ H ₃₂ N ₂ O ₂
MOP	<chem>CN1CCC23C4C1CC5=C2C(=C(C=C5)O)OC3C(C=C4)O</chem>	C ₁₇ H ₁₉ NO ₃
OLI	<chem>COC1=C(SC=C1)CNCCC2(CCOC3(C2)CCCC3)C4=CC=CC=N4</chem>	C ₂₂ H ₃₀ N ₂ O ₂ S
CBP	<chem>CN(C)C1(CCC2(CC1)C3=C(CCO2)C4=C(N3)C=CC(=C4)F)C5=C=C=CC=C5</chem>	C ₂₄ H ₂₇ FN ₂ O
P21	<chem>CC(CC1=CSC=C1)NC(=O)NCC(CC2=CC=C(C=C2)O)N(C)C</chem>	C ₁₉ H ₂₇ N ₃ O ₂ S
BUP	<chem>CC(C)(C)C(C)(C1CC23CCC1(C4C25CCN(C3CC6=C5C=C(C=C6)O)O4)CC7CC7)OC)O</chem>	C ₂₉ H ₄₁ NO ₄
NLX	<chem>C=CCN1CCC23C4C(=O)CCC2(C1CC5=C3C(=C(C=C5)O)O4)O</chem>	C ₁₉ H ₂₁ NO ₄
NBH	<chem>C=CCN1CCC23C4C(=NNC(=O)C5=CC=CC=C5)CCC2(C1CC6=C3C(=C(C=C6)O)O4)O</chem>	C ₂₆ H ₂₇ N ₃ O ₄
NDM	<chem>CC(C)(C1=NC(=NO1)C2=CC=CC=C2)NC(=O)C3=C(C4C56CCN(C(C5(C3)O)CC7=C6C(=C(C=C7)O)O4)CC8CC8)O</chem>	C ₃₂ H ₃₄ N ₄ O ₆

Fonte: pubchem.ncbi.nlm.nih.gov.

4.2 PREPARAÇÃO PARA DOCAGEM

Os complexos cristalizados obtidos foram inicialmente preparados no *software* UCSF Chimera 1.14 (PETTERSEN et al., 2004). Estes tiveram suas estruturas alinhadas a partir dos seus resíduos conservados de acordo com o sistema de numeração de BALLESTEROS e WEINSTEIN (1995), tendo como estrutura de referência o MOR em seu estado ativo (código PDB: 5C1M), o qual foi previamente orientado ao eixo z. Em seguida foram removidas as moléculas não proteicas, e as macromoléculas foram separadas dos seus respectivos ligantes. Nos receptores foram adicionados os átomos de hidrogênio com a devida protonação dos resíduos de histidina quando necessário.

Os arquivos de saída dos receptores obtidos na preparação anterior foram submetidos a dois servidores online, o NQ-Flipper V2.7 (WEICHENBERGER; SIPPL, 2006) e o molprobit 4.5 (WILLIAMS et al., 2018), para a validação dos estados de protonação e dos rotâmeros gerados dos resíduos de asparagina, glutamina (no NQ-Flipper) e de histidina (no molprobit).

Já as estruturas representativas foram utilizadas sem modificações, tendo em vista que estas foram preparadas anteriormente aos cálculos de dinâmica molecular e que ajustes em sua estrutura desconfiguraria seu estado conformacional. Todas as estruturas representativas foram alinhadas de acordo com o procedimento anteriormente descrito.

Os ligantes selecionados para os cálculos de docagem molecular tiveram suas estruturas protonadas pelo *software* Open Babel 2.3.2 (O'BOYLE et al., 2011), e em seguida otimizadas utilizando o pacote *G.A.M.E.S.S.* (General Atomic and Molecular Structure System) (BARCA et al., 2020), com o método Hartree-Fock e a função de base 6-31G (d, p). O *software* Avogadro 1.2.0 foi utilizado para a geração dos arquivos de entrada para o processo de otimização (HANWELL et al., 2012). Já os ligantes co-cristalizados com as macromoléculas que foram selecionadas para a redocagem, por sua vez, tiveram o nitrogênio mais básico de cada molécula protonado utilizando o *software* Open Babel 2.3.2 (O'BOYLE et al., 2011).

4.3 DOCAGEM MOLECULAR

4.3.1 DETERMINAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE DOCAGEM MOLECULAR

A redocagem de estruturas experimentais foi realizada a fim de determinar os parâmetros a serem utilizados nos cálculos de docagem molecular com as estruturas

representativas obtidas nas simulações de dinâmica molecular. Neste processo, as estruturas dos receptores foram consideradas rígidas e os ligantes foram desalinhados em relação ao sítio de ligação com o intuito de evitar tendências no processo de acoplamento. A caixa de interação para cada macromolécula foi dimensionada de forma a abranger todo o sítio de ligação. Os parâmetros ajustados foram o número de corridas e de avaliações, como indicado na Tabela 4, com uma população fixa de 300 indivíduos, e os demais parâmetros mantidos em seu valor padrão.

Tabela 4 - Parâmetros ajustados no processo de redocagem.

Corridas	Condição	
	Nº de avaliações de energia/10 ⁶	
50	1	
	10	
	20	
100	1	
	10	
	20	
200	1	
	10	
	20	
500	1	
	10	
	20	
700	1	
	10	
	20	
2000	1	
	10	
	20	

Fonte: Autor.

Para cada uma das 9 estruturas selecionadas foram realizados 18 cálculos de docagem em condições diferentes, totalizando 162 cálculos. Foram então extraídas as poses de menor energia de ligação de cada um dos cálculos realizados, sendo estas utilizadas nas análises. Para a análise dos dados de redocagem foi calculado o desvio quadrático médio (*root-mean-square deviation*, RMSD) entre a pose de menor energia encontrada em cada docagem e o respectivo ligante co-cristalizado. Estes foram realizados com o *software* UCSF Chimera 1.14 (PETTERSEN et al., 2004), desconsiderando os átomos de hidrogênio. Os valores de RMSD menores que 2Å foram considerados satisfatórios (WANG et al., 2016).

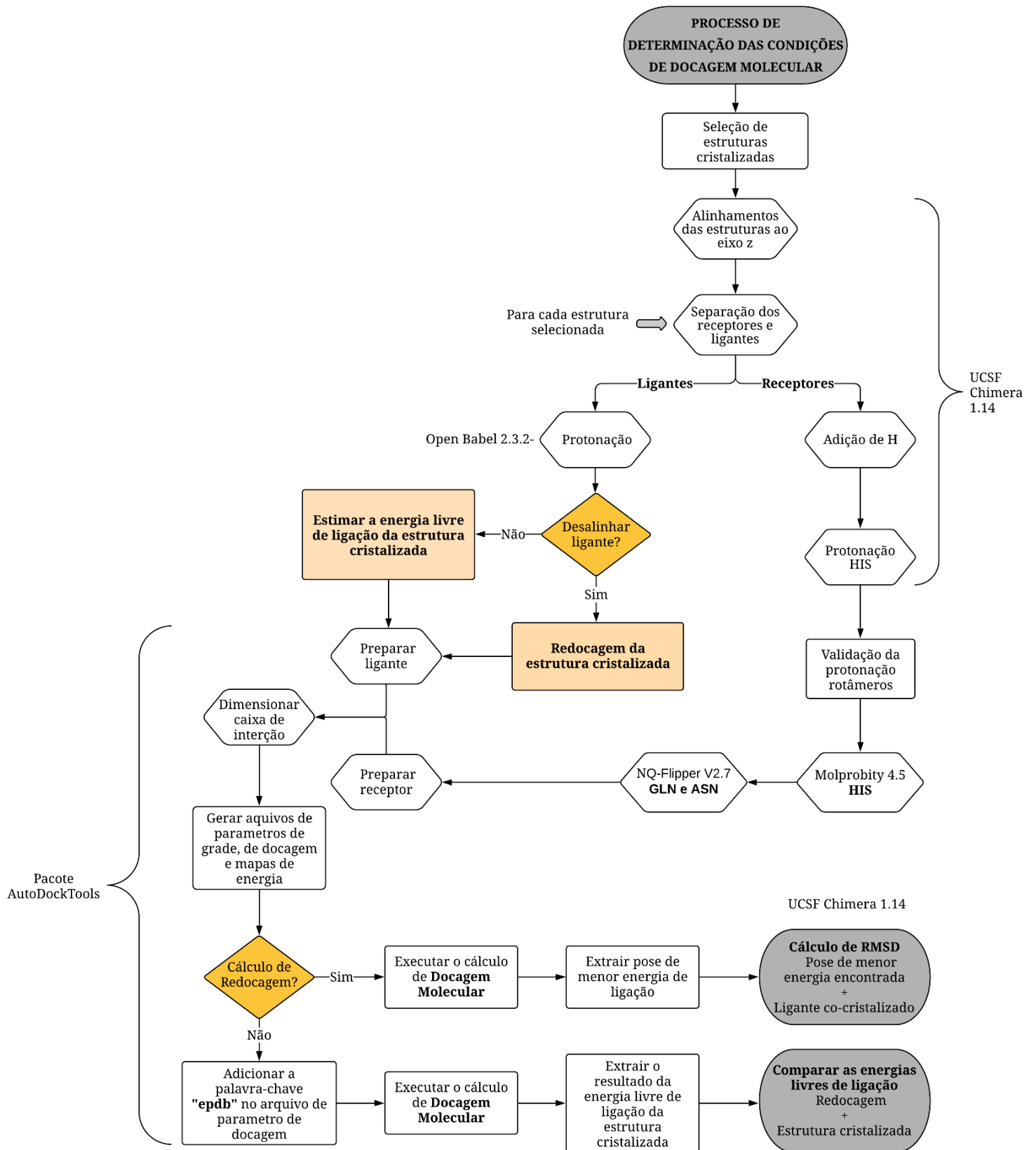
Também foi realizada a comparação entre a energia livre de ligação das poses encontradas com aquelas dos respectivos ligantes co-cristalizados. Para tanto foi estimada a energia livre de ligação da interação ligante-receptor dos complexos cristalizados. Foram então

preparados todos os arquivos necessários para o cálculo de docagem molecular com as mesmas dimensões de caixa de interação aplicados no processo de redocagem, utilizando os complexos em suas coordenadas originais. No arquivo de parâmetros de docagem foi adicionado o parâmetro *epdb* e removido os demais parâmetros de pesquisa, e em seguida calculada uma estimativa da energia livre de ligação. Desta forma, a energia é calculada para a posição original do ligante no receptor.

Para a escolha da melhor condição foi considerada a média aritmética dos valores de RMSD entre as mesmas condições, e escolhida a condição de menor média com relação aos valores de RMSD em que seus valores de energia de ligação estivessem dentro dos limites do erro padrão do *software* AutoDock 4.2.6 (2,5 kcal/mol) (MORRIS et al., 2009).

Utilizando os parâmetros definidos no processo anterior e o *software* AutoDock 4.2.6, as estruturas representativas obtidas por dinâmica molecular foram separadas dos seus respectivos ligantes e acoplados novamente, com o intuito de certificar que o método validado é também adequado para os demais sistemas do presente estudo. Os cálculos de docagem molecular foram realizados considerando o receptor rígido e os ligantes flexíveis. Os maiores clusters formados em cada cálculo de docagem realizado foram classificados em ordem decrescente de tamanho. Nos casos onde houveram clusters de mesmo tamanho em um único cálculo de docagem, estes também foram classificados em ordem crescente de energia de ligação observada na melhor pose de cada cluster. Em cada docagem realizada foi escolhida a pose de menor energia de ligação de até três clusters e comparadas, através do cálculo de RMSD, com os respectivos ligantes associados às estruturas representativas.

Todo o processo de determinação das condições de docagem molecular foi descrito de forma esquematizada e exposto no Fluxograma 1.



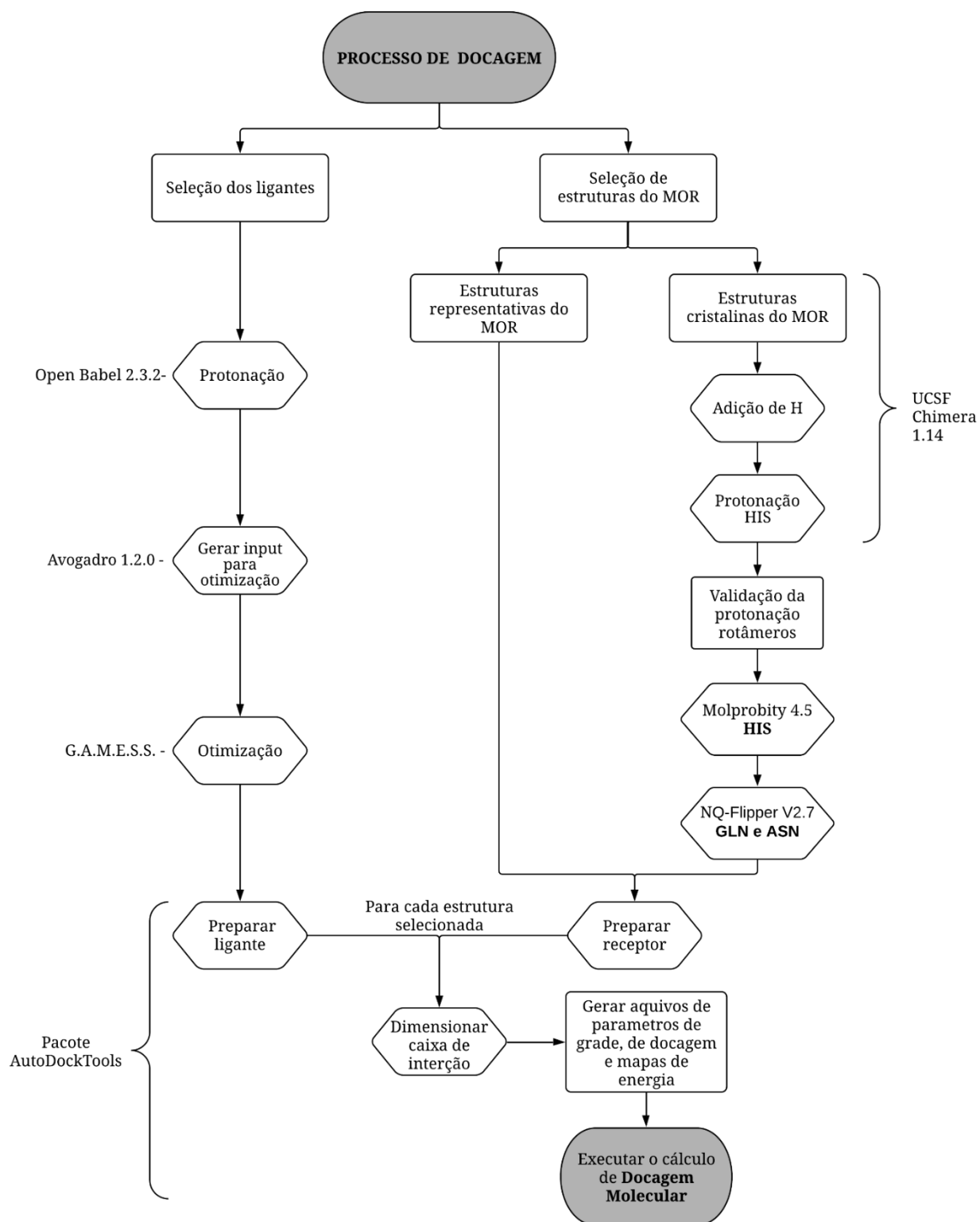
Fluxograma 1 - Processo de determinação das condições de docagem molecular.

4.3.2 DOCAGEM DOS SISTEMAS DE INTERESSE

As docagens entre os estados conformacionais do MOR e os ligantes selecionados foram realizadas aplicando os parâmetros estabelecidos nas etapas anteriores. Baseados em ensaios de mutagênese sítio dirigida, publicados na literatura, os resíduos D147 (LI et al., 1999), Y148 (XU et al., 1999), H297 (MANSOUR et al., 1997; BOT et al., 1998), W318 (XU et al., 1999), HIS319 (XU et al., 1999) e Y326 (MANSOUR et al., 1997) foram considerados flexíveis.

Definiu-se como sítio de ligação do MOR todos os resíduos que estavam a 5 Å de distância do ligante co-cristalizado (LAM et al., 2018). Para cada grupo de estruturas representativas (ou seja, a partir da trajetória do mesmo complexo), foi definida uma única caixa de interação, de forma a abranger todos os resíduos do sítio de ligação do MOR.

O *software* escolhido para a realização dos cálculos foi o AutoDock 4.2.6 (MORRIS et al., 2009), aplicando como método de busca o algoritmo genético Lamarckiano (AGL). Foram utilizadas ferramentas disponíveis no *software* MGLTools (MORRIS et al., 2009) para a preparação dos arquivos necessários aos cálculos. Os cálculos foram realizados entre cada conformação do MOR e os ligantes selecionados, no total de 135 cálculos. O processo de docagem foi descrito de forma esquematizada e exposto no Fluxograma 2.



Fluxograma 2 - Processo de preparação e cálculo de docagem com ligantes selecionados.

4.4 ÍNDICE UNIVERSAL DE ATIVAÇÃO (UAI)

Foi calculado o índice universal de ativação das estruturas do MOR utilizadas no processo de docagem molecular (estruturas cristalinas e representativas), de acordo com a metodologia descrita por IBRAHIM et al. (2019), através de um script disponibilizado por seu grupo. Este modelo permite classificar os diferentes estados conformacionais de um receptor, atribuindo valores menores que 0 (zero) para estruturas no estado inativo, maiores que 55 para estruturas no estado ativo, e valores entre 0 (zero) e 55 para estruturas consideradas intermediárias. Os valores obtidos foram relacionados aos dados de energia livre de ligação das melhores poses obtidas no processo de docagem molecular.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 PROCESSO DE REDOCAGEM

O método de docagem utilizado foi capaz de reproduzir satisfatoriamente as poses iniciais cristalizadas. Todas as médias dos valores de RMSD entre as condições com os mesmos parâmetros de docagem apresentaram valores inferiores a 2 Å, como apresentado na Tabela 5. Entre os resultados com o mesmo receptor em condições diferentes observou-se uma variação pequena nos valores de RMSD, apesar das variações de parâmetros (Tabela 6).

Tabela 5 - Média dos valores de RMSD entre as poses com a menor energia de ligação obtidas no processo de redocagem das estruturas MOR, KOR, DOR, NOP, A2AR, β 1AR e β 1AR e a poses dos seus respectivos ligantes co-cristalizados.

Corridas	Condição		Média dos valores de RMSD / Å
	Nº de avaliações/10 ⁶		
50	1		1,195
	10		1,177
	20		1,708
100	1		0,928
	10		1,310
	20		1,086
200	1		0,960
	10		1,115
	20		1,172
500	1		0,973
	10		1,114
	20		1,106
700	1		1,120
	10		1,510
	20		1,144
2000	1		1,028
	10		1,189
	20		1,074

Fonte: Autor.

Quando comparados os valores de energia de ligação destes complexos formados com os valores estimados nos complexos cristalizados, estes se apresentaram dentro do desvio padrão do *software* (2,5 kcal·mol⁻¹) em todas as condições de docagem (Tabela 7). A condição de docagem que utilizou 100 corridas e 1 milhão de avaliações de energia, foi a que apresentou os melhores resultados de docagem, sendo então aplicada nas etapas subsequentes.

Tabela 6 - Valores de RMSD obtidos das poses resultantes do processo de redocagem.

		RMSD/Å por estrutura								
Condições		MOR	KOR	DOR	NOP	A2AR	β1AR		β2AR	
Corrida	Nº de avaliações/10 ⁶	Ativo	Ativo	Inativo	Inativo	Ativo	Ativo	Inativo	Ativo	Inativo
50	1	0,951	0,756	1,133	1,916	0,448	1,926	0,940	1,336	1,349
	10	1,118	0,776	1,161	0,758	0,414	2,053	1,507	1,460	1,349
	20	1,165	0,822	1,143	0,826	5,785	1,215	1,238	1,644	1,538
100	1	1,002	0,831	1,189	0,701	0,314	1,265	0,839	1,034	1,181
	10	1,160	0,770	1,140	2,227	0,584	1,836	1,333	1,263	1,474
	20	1,173	0,781	1,150	0,795	0,402	2,071	1,012	1,151	1,236
200	1	1,186	0,750	1,133	0,906	0,406	1,389	0,734	0,714	1,423
	10	1,168	0,860	1,141	0,800	0,916	1,072	1,610	1,127	1,344
	20	1,162	0,789	1,136	0,831	0,408	2,149	1,006	1,759	1,308
500	1	1,166	0,732	1,403	0,820	0,423	1,049	0,828	1,018	1,320
	10	1,194	0,766	1,141	0,767	0,422	2,117	1,033	1,316	1,269
	20	1,164	0,774	1,144	0,781	0,937	1,932	1,280	0,609	1,329
700	1	1,051	0,841	1,390	0,774	0,387	1,879	1,205	1,136	1,413
	10	1,184	0,777	1,381	0,776	0,368	1,943	4,694	1,239	1,229
	20	1,188	0,773	1,140	0,786	0,970	2,033	1,164	1,166	1,080
2000	1	1,053	0,854	1,349	0,769	0,404	1,143	1,259	1,239	1,181
	10	1,163	0,774	1,142	0,812	0,813	2,034	1,274	1,409	1,278
	20	1,159	0,829	1,149	0,754	1,002	1,996	1,132	0,658	0,991

Fonte: Autor.

Tabela 7 - Valores de energias de ligação dos complexos cristalizados e dos complexos formados no processo de redocagem.

Energia de ligação (kcal·mol ⁻¹)/por estrutura																			
CONDIÇÕES		MOR		KOR		DOR		NOP		A2AR		β1AR		β2AR					
Corrida	Nº de Avaliações/10 ⁶	Ativo		Ativo		Inativo		Inativo		Ativo		Ativo		Inativo		Ativo		Inativo	
		Ref.	Dock.	Ref.	Dock.	Ref.	Dock.	Ref.	Dock.	Ref.	Dock.	Ref.	Dock.	Ref.	Dock.	Ref.	Dock.	Ref.	Dock.
50	1		-10,63		-13,01		-10,92		-10,11		-6,54		-10,20		-9,57		-10,65		-9,50
	10		-10,62		-13,11		-10,91		-10,32		-6,50		-10,74		-9,84		-11,04		-9,64
	20		-10,63		-13,11		-10,91		-10,27		-6,24		-10,80		-9,94		-11,17		-9,65
100	1		-10,65		-13,01		-10,92		-10,16		-6,37		-9,98		-9,46		-10,47		-9,09
	10		-10,63		-13,10		-10,92		-10,32		-6,47		-10,77		-9,90		-11,03		-9,66
	20		-10,63		-13,12		-10,92		-10,33		-6,48		-10,87		-9,93		-11,11		-9,67
200	1		-10,62		-13,04		-10,95		-10,25		-6,64		-10,34		-9,34		-10,87		-9,64
	10		-10,63		-13,11		-10,92		-10,31		-6,56		-10,78		-9,95		-11,37		-9,67
	20		-10,63		-13,12		-10,92		-10,33		-6,49		-10,80		-10,0		-11,36		-9,69
500	1	-10,86	-10,63	-12,54	-13,06	-9,52	-10,99	-9,85	-10,30	-5,94	-6,66	-10,66	-10,56	-9,13	-9,81	-10,11	-11,01	-9,48	-9,53
	10		-10,63		-13,11		-10,93		-10,34		-6,51		-10,82		-10,0		-11,18		-9,76
	20		-10,64		-13,12		-10,93		-10,34		-6,59		-10,93		-9,99		-11,39		-9,73
700	1		-10,64		-13,11		-11,05		-10,29		-6,75		-10,63		-9,59		-10,52		-9,55
	10		-10,63		-13,11		-10,96		-10,36		-6,72		-10,84		-9,99		-11,39		-9,73
	20		-10,63		-13,12		-10,93		-10,34		-6,61		-10,92		-10,01		-11,30		-9,75
2000	1		-10,66		-13,09		-11,03		-10,34		-6,71		-10,56		-9,85		-10,98		-9,57
	10		-10,64		-13,12		-10,94		-10,34		-6,64		-10,93		-9,96		-11,35		-9,74
	20		-10,64		-13,12		-10,93		-10,35		-6,60		-10,98		-10,03		-11,37		-9,76

Fonte: Autor

Ref.: Energia de ligação do complexo cristalizado. Dock.: Energia de ligação do complexo formado durante o processo de redocagem.

Nos resultados do processo de validação utilizando as estruturas representativas, oriundas de cálculos de dinâmica molecular, e incluindo a pose de menor energia de ligação dos três primeiros clusters mais populosos, obteve-se um cluster que apresentou uma pose com RMSD de até 2,05 Å, com exceção da estrutura NBH_2 (Tabela 8). Portanto, o método utilizando o *software* Autodock 4.2.6, demonstrou eficácia nos modelos de cálculos realizados nesta pesquisa.

Tabela 8 - Melhores valores de RMSD entre os clusters analisados de cada estrutura representativa.

Estruturas representativas	RMSD/ Å
B72_1	1,320
B72_2	1,481
B72_3	1,631
MOP_1	1,245
MOP_2	2,049
MOP_3	0,649
NBH_1	0,611
NBH_2	3,180
NBH_3	1,249
NBH_4	1,385
NBH_5	1,777
NLX_1	1,775
NLX_2	0,933

Fonte: Autor.

4.2 UAI DAS ESTRUTURAS DO MOR E ASSOCIAÇÃO COM A ENERGIA DE LIGAÇÃO OBTIDAS NOS CÁLCULOS DE DOCAGEM

Tanto as estruturas cristalográficas (códigos PDB: 5C1M e 4DKL) como as estruturas representativas do MOR obtidas de trajetórias de dinâmica molecular foram classificadas em ordem decrescente de valores do UAI.

Como mostrado na Tabela 9, apenas uma estrutura apresentou UAI maior que 55, a estrutura cristalizada no estado ativo do MOR. Três estruturas apresentam valores entre 0 e 55, classificadas como intermediárias (todas associadas ao agonista total B72); e 11 conformações com valores de UAI menores que 0, consideradas como inativas (a estrutura cristalizada no

estado inativo do MOR e todas as estruturas associadas aos ligantes MOP, NBH e NLX). Estes resultados refletem os diferentes estados conformacionais das estruturas em questão.

Tabela 9 - Valores de índice de ativação universal de estados conformacionais do MOR.

Estrutura	UAI	Estado de ativação
Cristal (5C1M)	60,19	Ativo
B72_1	40,12	Intermediário
B72_3	36,10	Intermediário
B72_2	25,80	Intermediário
MOP_3	-45,02	Inativo
NBH_4	-45,94	Inativo
MOP_2	-47,05	Inativo
MOP_1	-53,77	Inativo
NBH_3	-53,96	Inativo
Cristal (4DKL)	-59,44	Inativo
NLX_2	-60,26	Inativo
NBH_5	-63,04	Inativo
NLX_1	-63,77	Inativo
NBH_1	-66,49	Inativo
NBH_2	-68,84	Inativo

Fonte: Autor.

Os dados sobre a energia de ligação entre os ligantes selecionados e as estruturas utilizadas nos diferentes estados conformacionais do MOR, obtidos no processo de docagem molecular, foram relacionados com o respectivo valor de UAI.

Em geral, as conformações do MOR com alto UAI mostraram um padrão entre os valores de energia de ligação, de maneira que quanto maior o UAI dos estados conformacionais menor a energia de ligação, exceto para BUP (Figura 12), que mostrou oscilação entre os valores energia de ligação associados aos estados conformacionais estudados. Já nos estados conformacionais com baixo UAI não foi observado um padrão entre os valores de energia de ligação.

Na maioria dos ligantes, os maiores valores de energia de ligação foram encontrados ao serem associados ao estado conformacional NBH_3, com exceção do BUP, OLI e P21. Alguns ligantes quando associados a um estado conformacional intermediário / inativo do receptor apresentaram energia de ligação menor do que aquela observada quando ligada à conformação ativa (por exemplo, BUP, CBP, MOP, P21 e OLI).

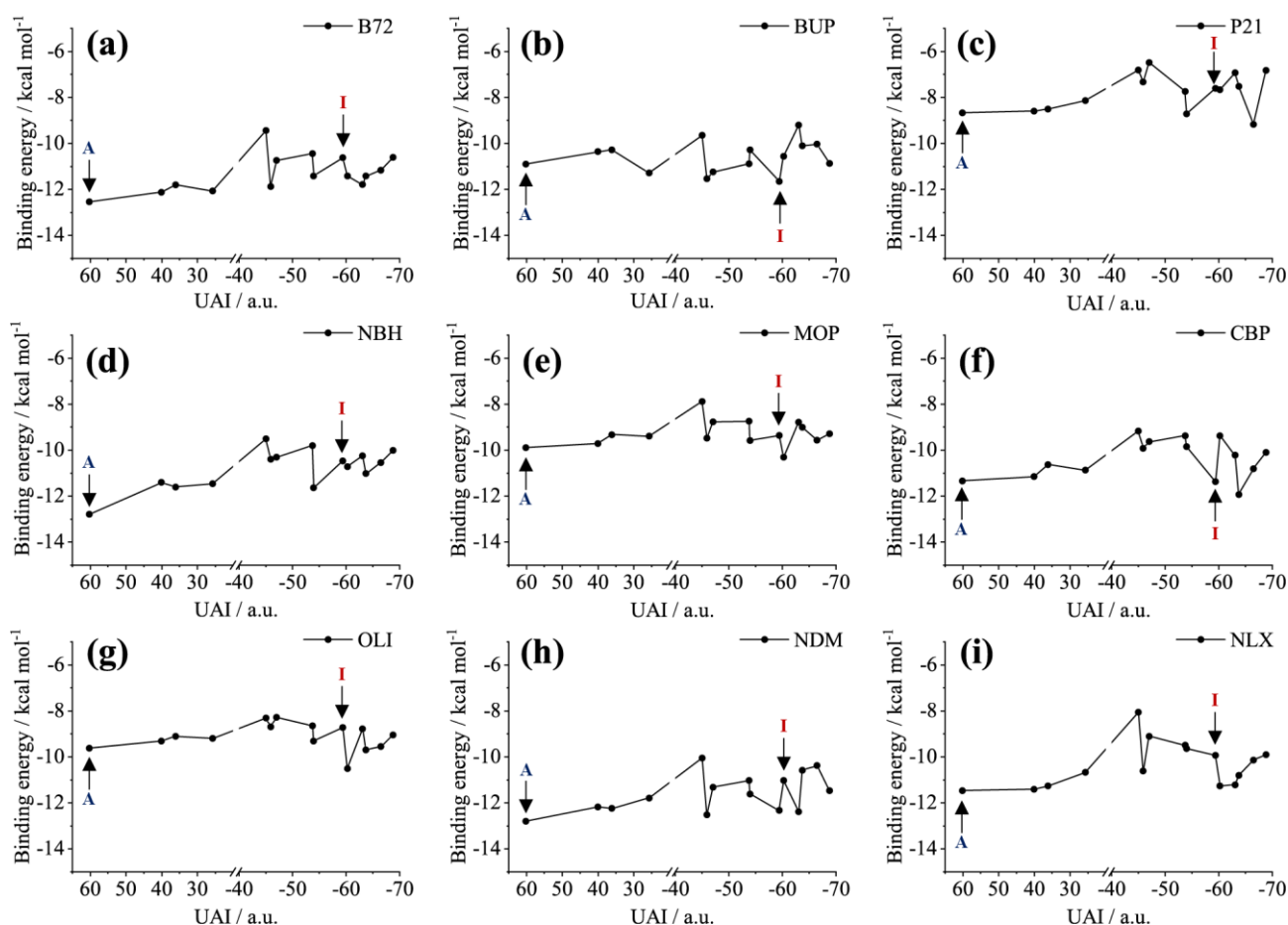


Figura 12 - Gráficos de correlação entre os valores de energia de ligação e o UAI.

A: Estrutura cristalizada no estado ativo do MOR, **I:** Estrutura cristalizada no estado inativo do MOR.

Os ligantes B72 ($-12,53 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$), NDM e NBH (ambos $-12,79 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$) apresentaram os menores valores de energia de ligação (Figura 12). O resultado referente ao B72 está de acordo com o seu valor de constante de inibição obtidos experimentalmente (0,060 nM), quando associado ao MOR murino e em competição com o radioligante [^3H]Diprenorfina (NEILAN et al., 2004). O valor de energia de ligação correspondente ao NDM corroboram com os dados do ensaio in vitro de afinidade de ligação desenvolvido por KANEMASA et al. (2019), onde o NDM apresentou alta afinidade pelo MOR com K_i , de 0,340 nM (MOR humano) e de 1,400 nM (MOR de rato), ambos utilizando o radioligante [^3H]DAMGO. Já o resultado para o NBH reflete a alta afinidade experimental pelo MOR humano (1,500 nM), utilizando como radioligante a diprenorfina (OZAKI et al., 2000). Enquanto o P21 (Figura 12c) apresentou os maiores valores de energia de ligação, fato que não reflete a sua alta afinidade experimental (MANGLIK et al., 2016).

4.3 ENERGIA DE LIGAÇÃO VERSUS AFINIDADE DE LIGAÇÃO

Dados de K_i encontrados na literatura, e apresentados na **Erro! Fonte de referência não encontrada.**, foram utilizados como base para estabelecer um critério de ordenamento dos ligantes e facilitar a correlação com outras propriedades. Os ensaios de afinidade de ligação publicados para fármacos que agem sobre o MOR apresentam, muitas vezes, dados de K_i incompletos e inconsistentes. Isso se deve às diferenças metodológicas entre estes estudos, gerando valores de K_i diferentes para um mesmo ligante. Este fato dificulta a realização de uma classificação simples e significativa dos fármacos opióides com base em suas afinidades de ligação ao MOR (VOLPE et al., 2011).

Levando em consideração este fato, foram aplicados dois fatores de conversão com o intuito de obter valores ajustados de K_i equivalentes aos do MOR de ratos obtidos com o radioligante [^3H]diprenorfina. Para o primeiro fator foram considerados os dados dos ensaios de afinidade de ligação que utilizaram o mesmo tipo de radioligante ([^3H]diprenorfina ou [^3H]DAMGO) e o MOR de diferentes espécies, sendo este a média das razões entre os valores de K_i do MOR humano e murino, correspondendo ao valor de 0,289 (Tabela 10). Os ligantes utilizados foram CBP, NDM e OLI, tendo em vista que foram encontrados valores de K_i para as duas espécies de MOR (rato e humano). Este fator conversão foi aplicado para obter valores equivalentes entre os dados de K_i que utilizaram o MOR de diferentes espécies com o mesmo tipo de radioligante.

Tabela 10 - Dados dos ensaios de afinidade de ligação utilizados na construção do 1º fator de conversão e razões entre os valores de K_i do MOR humano e murino.

Espécies	Valores de K_i (nM)		
	[^3H]DAMGO		[^3H]Diprenorfina
	CBP	NDM	OLI
Humano	0,7	0,34	6
Rato	2,4	1,4	18
$K_{i \text{ humano}} / K_{i \text{ rato}}$	0,292	0,243	0,333

Fonte: Autor.

$$\text{1º Fator de conversão} = \frac{0,292+0,243+0,333}{3} = 0,289$$

O segundo fator considerou os valores de K_i referentes ao MOR de uma mesma espécie (rato ou humano) e valores de K_i para os dois tipos de radioligantes (Tabela 11). Neste caso o fator foi a média das razões entre os valores de K_i do radioligante [^3H]diprenorfina com aqueles do radioligante [^3H]DAMGO, correspondendo ao valor de 5,128. Para os ligantes que apresentaram dois valores de K_i em diferentes condições, foi utilizado a média dos valores

ajustados obtidos a partir destes resultados. Este segundo fator conversão foi aplicado para obter valores equivalentes entre dados de K_i que utilizaram o MOR de uma mesma espécie, porém com tipos radioligantes diferentes.

Tabela 11 - Dados dos ensaios de afinidade de ligação utilizados na construção do 2º fator de conversão e razões entre os valores de K_i do MOR humano e murino.

Espécies	Valores de K_i (nM)	
	Humano	Rato
	NLX	MOP
[³ H]DAMGO	1,518	1,2
[³ H]Diprenorfina	7,6	6,3
K_i [³ H]Diprenorfina / K_i [³ H]DAMGO	5,007	5,250

Fonte: Autor.

$$\text{2º Fator de conversão} = \frac{5,007 + 5,250}{2} = 5,128$$

Tabela 12 - K_i experimental e ajustado de opióides.

Ligante	^[3H] DAMGO		^[3H] Diprenorfina		
	K _i Humano	K _i Rato	K _i Humano	K _i Rato	K _i rato ajustado
	nM	nM	nM	nM	nM
NLX	1,518 (VOLPE et al., 2011)	-	7,600 (DEWIRE et al., 2013)	-	26,591
OLI	-	-	6,000 (DEWIRE et al., 2013)	18,000 (DEWIRE et al., 2013)	18,000
CPB	0,700 (LINZ et al., 2014)	2,400 (LINZ et al., 2014)	-	-	12,359
NDM	0,340 (KANEMASA et al., 2019)	1,400 (KANEMASA et al., 2019)	-	-	7,180
MOP	-	1,200 (CHEN, Z. R. et al., 1991)	-	6,300 (NEILAN et al., 2004)	6,300
NBH	-	-	1,500 (OZAKI et al., 2000)	-	5,185
P21	-	-	1,100 (MANGLIK et al., 2016)	-	3,802
BUP	-	-	-	0,740 (NEILAN et al., 2004)	0,740
B72	-	-	-	0,060 (NEILAN et al., 2004)	0,060

Fonte: Autor.

Partindo da análise destes dados, os ligantes utilizados neste estudo foram classificados em ordem decrescente de K_i , como apresentado na Tabela 12. Estes dados foram relacionados com os resultados de energia de ligação entre estes ligantes e as estruturas do MOR utilizadas, oriundas dos cálculos de docagem molecular.

De modo geral os dados apresentados na Figura 13, não demonstraram uma tendência clara na relação estabelecida entre os dados de energia de ligação e K_i . Porém os valores de energia de ligação mostraram um padrão semelhante de distribuição entre as estruturas de cada grupo de estados conformacionais. Esta divergência pode ser explicada pela falta de homogeneidade dos dados utilizados para calcular os valores K_i ajustados e também pelas condições experimentais empregadas nos ensaios de afinidade de ligação para a determinação destes valores (por exemplo, presença de solvente e o tipo de radioligante usados) que não são levados em consideração pelo software.

Como observado na Figura 13, o P21 apresentou baixa afinidade de ligação pelos estados conformacionais docados, com valores altos de energia de ligação. Estes dados vão de encontro aos dados de afinidade de ligação apresentado por MANGLIK et al. (2016), que obtiveram uma constante de inibição de 1,1 nM, utilizando como radioligante [^3H]diprenorfina em MOR humano.

O antagonista NDM (Figura 13) apresentou os menores valores de energia de ligação na maioria dos estados conformacionais analisados. Estes dados estão de acordo com os resultados experimentais apresentados por KANEMASA et al. (2019), onde a NDM mostrou alta afinidade de ligação pelo MOR com K_i igual a 0,340 nM em MOR humano e 1,400 nM em MOR murino, ambos utilizando o radioligante [^3H]DAMGO.

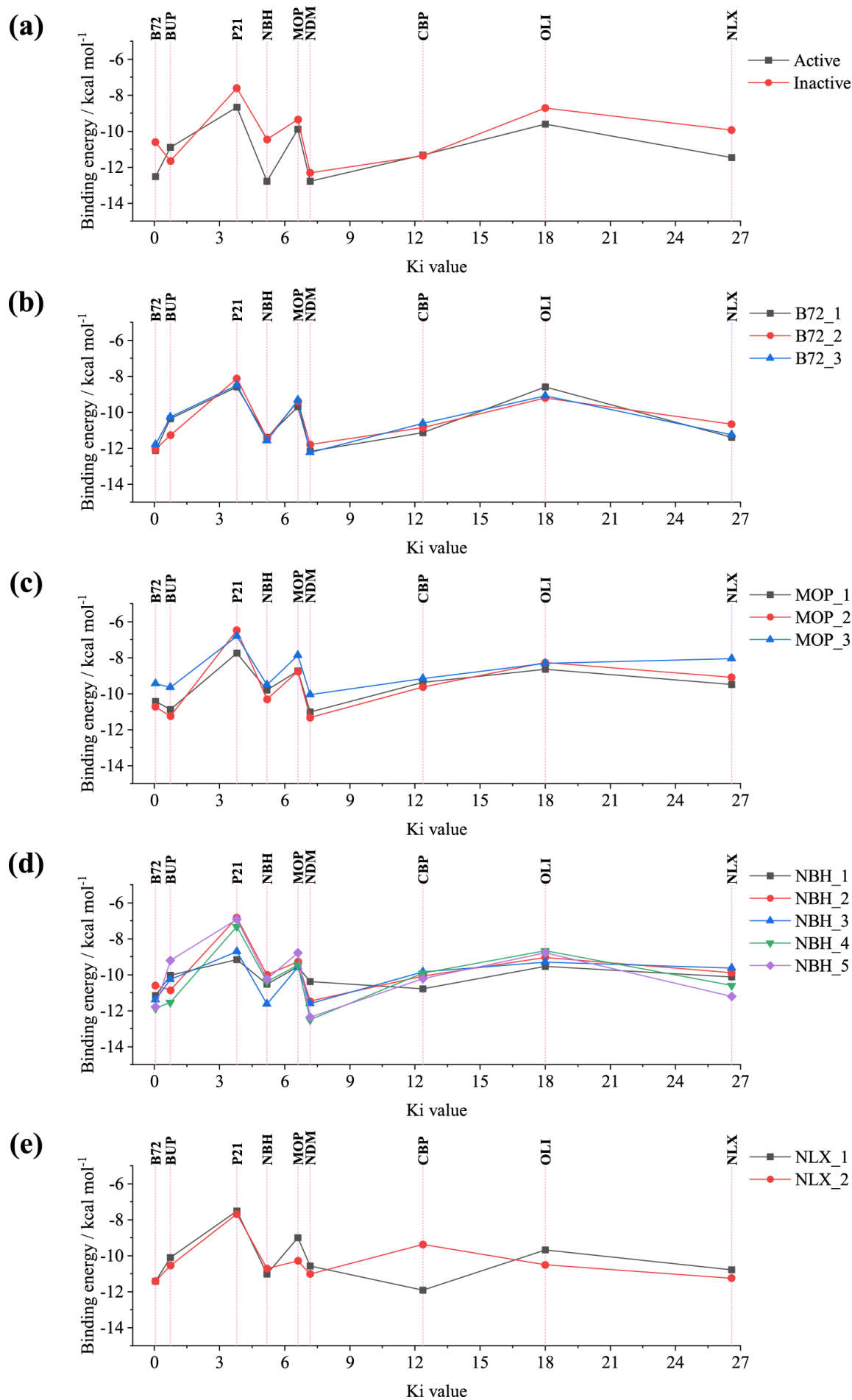


Figura 13 - Energia de ligação, por ligante, para as diferentes conformações do MOR.

5 CONCLUSÃO

Neste estudo o procedimento de redocking realizado com GPCRs classe A reproduziu com sucesso as poses originais do ligante e ajudou a estabelecer parâmetros de docking apropriados para uso com o MOR.

Também foi possível, a partir do script disponibilizado por IBRAHIM et al. (2019) classificar os estados conformacionais utilizados do MOR quanto ao seu nível de ativação, onde apenas uma estrutura foi considerada ativa, 3 como intermediárias e as demais foram consideradas inativas.

Uma maneira intuitiva de obter valores comparáveis para constantes de inibição foi sugerida. Estes fatores de conversão, juntamente com os valores experimentais da constante de inibição dos ligantes selecionados para o estudo de docagem molecular, obtidos na literatura científica, possibilitaram uma classificação quanto a sua afinidade de ligação pelo MOR, no qual a NLX foi o fármaco com menor afinidade pelo MOR e o B72 com o menor valor de K_i . No entanto, esta abordagem necessita de um maior refinamento utilizando um conjunto de dados maior, a fim de ser estatisticamente significativa e fornecer uma classificação mais precisa.

Os cálculos de docagem molecular de ligantes em diferentes conformações do MOR confirmou, com algumas exceções, uma maior afinidade do MOR no estado ativo. Embora os estados conformacionais inativos possam ser classificados em ordem de estado de ativação, as interações com os ligantes não seguiram um padrão claro.

Também não foi possível estabelecer, através do método empregado, uma relação entre os valores de energias de ligação calculadas e os dados de K_i ajustados, calculados a partir dos dados experimentais de estudos de afinidade de ligação, apesar de alguns ligantes apresentarem valores de energia de ligação condizentes com a sua afinidade pelo MOR quando associados a maioria dos estados conformacionais docados.

REFERÊNCIAS

- ACAMPORA, G. A.; NISAVIC, M.; ZHANG, Y. Perioperative Buprenorphine Continuous Maintenance and Administration Simultaneous With Full Opioid Agonist: Patient Priority at the Interface Between Medical Disciplines. **J Clin Psychiatry**, v. 81, n. 1, p., 2020.
- ACHARYA, C.; COOP, A.; POLLI, J. E.; MACKERELL, A. D., JR. Recent advances in ligand-based drug design: relevance and utility of the conformationally sampled pharmacophore approach. **Curr Comput Aided Drug Des**, v. 7, n. 1, p. 10-22, 2011.
- ALEIXO, G. A. S.; TUDURY, E. A. UTILIZAÇÃO DE OPIÓIDES NA ANALGESIA DE CÃES E GATOS. **Veterinária Notícias**, v. 11, n. 2, p., 2005.
- AYAD, S. et al. Evaluating the Incidence of Opioid-Induced Respiratory Depression Associated with Oliceridine and Morphine as Measured by the Frequency and Average Cumulative Duration of Dosing Interruption in Patients Treated for Acute Postoperative Pain. **Clin Drug Investig**, v. 40, n. 8, p. 755-764, 2020.
- BALLESTEROS, J. A.; WEINSTEIN, H. Integrated methods for the construction of three-dimensional models and computational probing of structure-function relations in G protein-coupled receptors. In: Sealfon, S. C. (Ed.). **Methods in Neurosciences**: Academic Press, 1995. v.25, p.366-428.
- BARCA, G. M. J. et al. Recent developments in the general atomic and molecular electronic structure system. **J Chem Phys**, v. 152, n. 15, p. 154102, 2020.
- BARTUZI, D.; KACZOR, A. A.; TARGOWSKA-DUDA, K. M.; MATOSIUK, D. Recent Advances and Applications of Molecular Docking to G Protein-Coupled Receptors. **Molecules**, v. 22, n. 2, p., 2017.
- BERZETEI-GURSKE, I. P. et al. The in vitro pharmacological characterization of naloxone benzoylhydrazone. **Eur J Pharmacol**, v. 277, n. 2-3, p. 257-263, 1995.
- BHAVE, S. et al. Connexin-purinergic signaling in enteric glia mediates the prolonged effect of morphine on constipation. **FASEB J**, v. 31, n. 6, p. 2649-2660, 2017.
- BLAIR, H. A. Naldemedine: A Review in Opioid-Induced Constipation. **Drugs**, v. 79, n. 11, p. 1241-1247, 2019.
- BOT, G.; BLAKE, A. D.; LI, S.; REISINE, T. Mutagenesis of a single amino acid in the rat mu-opioid receptor discriminates ligand binding. **Journal Neurochemistry**, v. 70, n. 1, p. 358-365, 1998.
- CHAN, H. C. S.; MCCARTHY, D.; LI, J.; PALCZEWSKI, K.; YUAN, S. Designing Safer Analgesics via mu-Opioid Receptor Pathways. **Trends Pharmacol Sci**, v. 38, n. 11, p. 1016-1037, 2017.
- CHAVKIN, C.; MCLAUGHLIN, J. P.; CELVER, J. P. Regulation of opioid receptor function by chronic agonist exposure: constitutive activity and desensitization. **Mol Pharmacol**, v. 60, n. 1, p. 20-25, 2001.

- CHEN, X. T. et al. Structure-activity relationships and discovery of a G protein biased mu opioid receptor ligand, [(3-methoxythiophen-2-yl)methyl]({2-[(9R)-9-(pyridin-2-yl)-6-oxaspiro-[4.5]decan-9-yl]ethyl})amine (TRV130), for the treatment of acute severe pain. **J Med Chem**, v. 56, n. 20, p. 8019-8031, 2013.
- CHEN, Z. R.; IRVINE, R. J.; SOMOGYI, A. A.; BOCHNER, F. Mu receptor binding of some commonly used opioids and their metabolites. **Life Sciences**, v. 48, n. 22, p. 2165-2171, 1991.
- CHENG, J. X. et al. Computational insights into the G-protein-biased activation and inactivation mechanisms of the mu opioid receptor. **Acta Pharmacol Sin**, v. 39, n. 1, p. 154-164, 2018.
- CHIOU, L. C. Differential antagonism by naloxone benzoylhydrazone of the activation of inward rectifying K⁺ channels by nociceptin and a mu-opioid in rat periaqueductal grey slices. **Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol**, v. 363, n. 6, p. 583-589, 2001.
- COLUZZI, F.; SCERPA, M. S.; PERGOLIZZI, J. Naldemedine: A New Option for OIBD. **J Pain Res**, v. 13, n., p. 1209-1222, 2020.
- DE FRANCESCO, E.; SOTGIA, F.; CLARKE, R.; LISANTI, M.; MAGGIOLINI, M. G protein-coupled receptors at the crossroad between physiologic and pathologic angiogenesis: old paradigms and emerging concepts. **International journal of molecular sciences**, v. 18, n. 12, p. 2713, 2017.
- DEVEREAUX, A. L.; MERCER, S. L.; CUNNINGHAM, C. W. DARK Classics in Chemical Neuroscience: Morphine. **ACS Chem Neurosci**, v. 9, n. 10, p. 2395-2407, 2018.
- DEWIRE, S. M. et al. A G protein-biased ligand at the mu-opioid receptor is potently analgesic with reduced gastrointestinal and respiratory dysfunction compared with morphine. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 344, n. 3, p. 708-717, 2013.
- DING, H. et al. Antinociceptive, reinforcing, and pruritic effects of the G-protein signalling-biased mu opioid receptor agonist PZM21 in non-human primates. **Br J Anaesth**, v., n., p., 2020.
- FANG, Y.; KENAKIN, T.; LIU, C. Editorial: Orphan GPCRs As Emerging Drug Targets. **Front Pharmacol**, v. 6, n., p. 295, 2015.
- FARKAS, A. et al. Pulmonary Complications of Opioid Overdose Treated With Naloxone. **Ann Emerg Med**, v. 75, n. 1, p. 39-48, 2020.
- FERREIRA, L. G.; DOS SANTOS, R. N.; OLIVA, G.; ANDRICOPULO, A. D. Molecular docking and structure-based drug design strategies. **Molecules**, v. 20, n. 7, p. 13384-13421, 2015.
- FERREIRA, L. G.; OLIVA, G.; ANDRICOPULO, A. D. From Medicinal Chemistry to Human Health: Current Approaches to Drug Discovery for Cancer and Neglected Tropical Diseases. **An Acad Bras Cienc**, v. 90, n. 1 Suppl 1, p. 645-661, 2018.
- FILIPEK, S. Molecular switches in GPCRs. **Curr Opin Struct Biol**, v. 55, n., p. 114-120, 2019.

- FREEMAN, P. R.; HANKOSKY, E. R.; LOFWALL, M. R.; TALBERT, J. C. The changing landscape of naloxone availability in the United States, 2011 - 2017. **Drug Alcohol Depend**, v. 191, n., p. 361-364, 2018.
- GILMAN, A. G. G proteins and dual control of adenylate cyclase. **Cell**, v. 36, n. 3, p. 577-579, 1984.
- 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.
- GOHLER, K. et al. Assessment of the Abuse Potential of Cebranopadol in Nondependent Recreational Opioid Users: A Phase 1 Randomized Controlled Study. **J Clin Psychopharmacol**, v. 39, n. 1, p. 46-56, 2019.
- GRASEL, F. D. S. Investigação da interação de ligantes fluorescentes derivados de benzazóis com B-DNA por docking e dinâmica molecular. v., n., p., 2013.
- GUDIN, J.; FUDIN, J. A Narrative Pharmacological Review of Buprenorphine: A Unique Opioid for the Treatment of Chronic Pain. **Pain Ther**, v. 9, n. 1, p. 41-54, 2020.
- GUEDES, I. A.; DE MAGALHAES, C. S.; DARDENNE, L. E. Receptor-ligand molecular docking. **Biophys Rev**, v. 6, n. 1, p. 75-87, 2014.
- HANWELL, M. D. et al. Avogadro: an advanced semantic chemical editor, visualization, and analysis platform. **J Cheminform**, v. 4, n. 1, p. 17, 2012.
- HILL, R. et al. The novel mu-opioid receptor agonist PZM21 depresses respiration and induces tolerance to antinociception. **Br J Pharmacol**, v. 175, n. 13, p. 2653-2661, 2018.
- HU, G. M.; MAI, T. L.; CHEN, C. M. Visualizing the GPCR Network: Classification and Evolution. **Sci Rep**, v. 7, n. 1, p. 15495, 2017.
- HUANG, W. et al. Structural insights into μ -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. **J Chem Inf Model**, v. 59, n. 9, p. 3938-3945, 2019.
- INAGAKI, M. et al. Discovery of naldemedine: A potent and orally available opioid receptor antagonist for treatment of opioid-induced adverse effects. **Bioorg Med Chem Lett**, v. 29, n. 1, p. 73-77, 2019.
- KALYAANAMOORTHY, S.; CHEN, Y. P. Structure-based drug design to augment hit discovery. **Drug Discov Today**, v. 16, n. 17-18, p. 831-839, 2011.
- KANEMASA, T. et al. Pharmacologic effects of naldemedine, a peripherally acting mu-opioid receptor antagonist, in in vitro and in vivo models of opioid-induced constipation. **Neurogastroenterol Motil**, v. 31, n. 5, p. e13563, 2019.

- KIM, J.; HAM, S.; HONG, H.; MOON, C.; IM, H. I. Brain Reward Circuits in Morphine Addiction. **Mol Cells**, v. 39, n. 9, p. 645-653, 2016.
- KOEHL, A. et al. Structure of the micro-opioid receptor-Gi protein complex. **Nature**, v. 558, n. 7711, p. 547-552, 2018.
- KUDLA, L. et al. Functional characterization of a novel opioid, PZM21, and its effects on the behavioural responses to morphine. **Br J Pharmacol**, v. 176, n. 23, p. 4434-4445, 2019.
- LAM, P. C.; ABAGYAN, R.; TOTROV, M. Ligand-biased ensemble receptor docking (LigBEnD): a hybrid ligand/receptor structure-based approach. **J Comput Aided Mol Des**, v. 32, n. 1, p. 187-198, 2018.
- LAMBERT, D. G. The nociceptin/orphanin FQ receptor: a target with broad therapeutic potential. **Nat Rev Drug Discov**, v. 7, n. 8, p. 694-710, 2008.
- LATORRACA, N. R.; VENKATAKRISHNAN, A. J.; DROR, R. O. GPCR Dynamics: Structures in Motion. **Chemical Reviews**, v. 117, n. 1, p. 139-155, 2017.
- LEELANANDA, S. P.; LINDERT, S. Computational methods in drug discovery. **Beilstein J Org Chem**, v. 12, n., p. 2694-2718, 2016.
- LI, J. G. et al. ASP147 in the third transmembrane helix of the rat mu opioid receptor forms ion-pairing with morphine and naltrexone. **Life Sciences**, v. 65, n. 2, p. 175-185, 1999.
- LINZ, K. et al. Cebranopadol: a novel potent analgesic nociceptin/orphanin FQ peptide and opioid receptor agonist. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 349, n. 3, p. 535-548, 2014.
- MADHUSOODANAN, J. Inner Workings: Safer opioids may be on the horizon, but mitigating addiction is a long shot. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 115, n. 33, p. 8229-8231, 2018.
- MANGLIK, A. et al. Crystal structure of the micro-opioid receptor bound to a morphinan antagonist. **Nature**, v. 485, n. 7398, p. 321-326, 2012.
- MANGLIK, A. et al. Structure-based discovery of opioid analgesics with reduced side effects. **Nature**, v. 537, n. 7619, p. 185-190, 2016.
- MANSOUR, A. et al. Key residues defining the mu-opioid receptor binding pocket: a site-directed mutagenesis study. **Journal Neurochemistry**, v. 68, n. 1, p. 344-353, 1997.
- MCDONALD, J. et al. Partial agonist behaviour depends upon the level of nociceptin/orphanin FQ receptor expression: studies using the ecdysone-inducible mammalian expression system. **Br J Pharmacol**, v. 140, n. 1, p. 61-70, 2003.
- MEGURO, Y. et al. Neuropeptide oxytocin enhances mu opioid receptor signaling as a positive allosteric modulator. **J Pharmacol Sci**, v. 137, n. 1, p. 67-75, 2018.
- MIYAGI, H. et al. The discovery of a new antibody for BRIL-fused GPCR structure determination. **Sci Rep**, v. 10, n. 1, p. 11669, 2020.

- MONDAL, D.; KOLEV, V.; WARSHEL, A. Exploring the activation pathway and Gi-coupling specificity of the mu-opioid receptor. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v., n., p., 2020.
- MORRIS, G. M. et al. Automated docking using a Lamarckian genetic algorithm and an empirical binding free energy function. **Journal of Computational Chemistry**, v. 19, n. 14, p. 1639-1662, 1998.
- MORRIS, G. M. et al. **Automated Docking of Flexible Ligands to Receptors: User's Guide**. La Jolla (CA), U.S.A., v. 3.0.5, 2001. Disponível em: <http://autodock.scripps.edu/faqs-help/manual/autodock-3-user-s-guide/AutoDock3.0.5_UserGuide.pdf>.
- 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.
- MOSS, R. B. et al. Higher naloxone dosing in a quantitative systems pharmacology model that predicts naloxone-fentanyl competition at the opioid mu receptor level. **PLoS One**, v. 15, n. 6, p. e0234683, 2020.
- MUSIANI, F.; ROSSETTI, G.; GIORGETTI, A.; CARLONI, P. Chemosensorial G-proteins-coupled receptors: a perspective from computational methods. **Adv Exp Med Biol**, v. 805, n., p. 441-457, 2014.
- NAIR, A. S.; MANTHA, S. P.; PULIPAKA, S. K.; RAYANI, B. K. Cebranopadol: A First-in-Class Nociceptin Receptor Agonist for Managing Chronic Pain. **Indian J Palliat Care**, v. 26, n. 1, p. 147-148, 2020.
- NARVÁEZ, Á. V. et al. Analgésicos en el paciente hospitalizado: Revisión de tema. **Revista Colombiana de Ciencias Químico - Farmacéuticas**, v. 44, n., p. 107-127, 2015.
- NEILAN, C. L. et al. Characterization of the complex morphinan derivative BU72 as a high efficacy, long-lasting mu-opioid receptor agonist. **Eur J Pharmacol**, v. 499, n. 1-2, p. 107-116, 2004.
- O'BOYLE, N. M. et al. Open Babel: An open chemical toolbox. **J Cheminform**, v. 3, n., p. 33, 2011.
- OKUDE, J. et al. Identification of a Conformational Equilibrium That Determines the Efficacy and Functional Selectivity of the mu-Opioid Receptor. **Angew Chem Int Ed Engl**, v. 54, n. 52, p. 15771-15776, 2015.
- OLIANAS, M. C.; CONCAS, D.; ONALI, P. Agonist activity of naloxone benzoylhydrazone at recombinant and native opioid receptors. **Br J Pharmacol**, v. 147, n. 4, p. 360-370, 2006.
- OZAKI, S. et al. In vitro and in vivo pharmacological characterization of J-113397, a potent and selective non-peptidyl ORL1 receptor antagonist. **Eur J Pharmacol**, v. 402, n. 1-2, p. 45-53, 2000.
- PAULINO, A. L. A.; NOGUEIRA, Y. L. B.; GOME, J. P. P.; MATTOS, C. L. C.; RODRIGUES, L. R. On the Use of Cultural Enhancement Strategies to Improve the NEAT Algorithm. In: 2020 IEEE Congress on Evolutionary Computation (CEC), 2020, 19-24 July 2020, p. 1-8.

- PELLISSIER, L. P.; GANDIA, J.; LABOUTE, T.; BECKER, J. A. J.; LE MERRER, J. mu opioid receptor, social behaviour and autism spectrum disorder: reward matters. **British Journal of Pharmacology**, v. 175, n. 14, p. 2750-2769, 2018.
- PERGOLIZZI, J. V., JR.; RAFFA, R. B. Safety And Efficacy Of The Unique Opioid Buprenorphine For The Treatment Of Chronic Pain. **J Pain Res**, v. 12, n., p. 3299-3317, 2019.
- PETTERSEN, E. F. et al. UCSF Chimera--a visualization system for exploratory research and analysis. **J Comput Chem**, v. 25, n. 13, p. 1605-1612, 2004.
- PICCIRILLO, E.; AMARAL, A. T. D. VIRTUAL SCREENING OF BIOACTIVE COMPOUNDS: CONCEPTS AND APLICATIONS. **Química Nova**, v. 41, n. 6, p. 662-677, 2018.
- QUE, D. L.; BALTAZAR, M.; LAXAMANA, L.; MACROHON-VALDEZ, M. C.; NG, A. Morphine-induced myoclonus in an 85-year old male: A case report. **Journal of the Neurological Sciences**, v. 405, n., p. 229-230, 2019.
- RAEHAL, K. M.; WALKER, J. K.; BOHN, L. M. Morphine side effects in beta-arrestin 2 knockout mice. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 314, n. 3, p. 1195-1201, 2005.
- RAFFA, R. B. et al. Cebranopadol: novel dual opioid/NOP receptor agonist analgesic. **J Clin Pharm Ther**, v. 42, n. 1, p. 8-17, 2017.
- RIBEIRO, J. M. L.; FILIZOLA, M. Insights From Molecular Dynamics Simulations of a Number of G-Protein Coupled Receptor Targets for the Treatment of Pain and Opioid Use Disorders. **Frontiers in molecular neuroscience**, v. 12, n., p. 207-207, 2019.
- SAKKAL, L. A.; RAJKOWSKI, K. Z.; ARMEN, R. S. Prediction of consensus binding mode geometries for related chemical series of positive allosteric modulators of adenosine and muscarinic acetylcholine receptors. **J Comput Chem**, v. 38, n. 15, p. 1209-1228, 2017.
- SALMASO, V.; MORO, S. Bridging Molecular Docking to Molecular Dynamics in Exploring Ligand-Protein Recognition Process: An Overview. **Front Pharmacol**, v. 9, n., p. 923, 2018.
- SCHWARTZ, T. W.; FRIMURER, T. M.; HOLST, B.; ROSENKILDE, M. M.; ELLING, C. E. Molecular mechanism of 7TM receptor activation--a global toggle switch model. **Annu Rev Pharmacol Toxicol**, v. 46, n., p. 481-519, 2006.
- SENA, D. M.; CONG, X.; GIORGETTI, A. Ligand based conformational space studies of the μ -opioid receptor. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects**, v. 1865, n. 3, p. 129838, 2021.
- SINGLA, N. et al. A randomized, Phase IIb study investigating oliceridine (TRV130), a novel micro-receptor G-protein pathway selective (mu-GPS) modulator, for the management of moderate to severe acute pain following abdominoplasty. **J Pain Res**, v. 10, n., p. 2413-2424, 2017.

- SINGLA, N. K. et al. APOLLO-2: A Randomized, Placebo and Active-Controlled Phase III Study Investigating Oliceridine (TRV130), a G Protein-Biased Ligand at the mu-Opioid Receptor, for Management of Moderate to Severe Acute Pain Following Abdominoplasty. **Pain Pract**, v. 19, n. 7, p. 715-731, 2019.
- SOUNIER, R. et al. Propagation of conformational changes during mu-opioid receptor activation. **Nature**, v. 524, n. 7565, p. 375-378, 2015.
- SPAHN, V. et al. Opioid receptor signaling, analgesic and side effects induced by a computationally designed pH-dependent agonist. **Sci Rep**, v. 8, n. 1, p. 8965, 2018.
- STOTTS, A. L.; DODRILL, C. L.; KOSTEN, T. R. Opioid dependence treatment: options in pharmacotherapy. **Expert Opin Pharmacother**, v. 10, n. 11, p. 1727-1740, 2009.
- SURRATT, C. K. et al. -mu opiate receptor. Charged transmembrane domain amino acids are critical for agonist recognition and intrinsic activity. **Journal of Biological Chemistry**, v. 269, n. 32, p. 20548-20553, 1994.
- TAN, B.; LIU, M. Newly characterized crystal structures: further insights into the architecture of GPCRs. **Sci China Life Sci**, v. 61, n. 5, p. 593-596, 2018.
- THOMPSON, G. L.; KELLY, E.; CHRISTOPOULOS, A.; CANALS, M. Novel GPCR paradigms at the mu-opioid receptor. **Br J Pharmacol**, v. 172, n. 2, p. 287-296, 2015.
- TOUBIA, T.; KHALIFE, T. The Endogenous Opioid System: Role and Dysfunction Caused by Opioid Therapy. **Clin Obstet Gynecol**, v. 62, n. 1, p. 3-10, 2019.
- VOLPE, D. A. et al. Uniform assessment and ranking of opioid mu receptor binding constants for selected opioid drugs. **Regul Toxicol Pharmacol**, v. 59, n. 3, p. 385-390, 2011.
- WANG, Z. et al. Comprehensive evaluation of ten docking programs on a diverse set of protein-ligand complexes: the prediction accuracy of sampling power and scoring power. **Physical Chemistry Chemical Physics**, v. 18, n. 18, p. 12964-12975, 2016.
- WEICHENBERGER, C. X.; SIPPL, M. J. NQ-Flipper: validation and correction of asparagine/glutamine amide rotamers in protein crystal structures. **Bioinformatics**, v. 22, n. 11, p. 1397-1398, 2006.
- WILLIAMS, C. J. et al. MolProbity: More and better reference data for improved all-atom structure validation. **Protein Sci**, v. 27, n. 1, p. 293-315, 2018.
- XU, H. et al. Opioid peptide receptor studies, 11: involvement of Tyr148, Trp318 and His319 of the rat mu-opioid receptor in binding of mu-selective ligands. **Synapse**, v. 32, n. 1, p. 23-28, 1999.
- YARLAGADDA, K.; KIM, J.; KANDERI, T.; SENDIL, S.; NOOKALA, V. K. Opioid antidote induced pulmonary edema and lung injury. **Respir Med Case Rep**, v. 30, n., p. 101107, 2020.
- YU, W.; MACKERELL, A. D., JR. Computer-Aided Drug Design Methods. **Methods Mol Biol**, v. 1520, n., p. 85-106, 2017.

YUDIN, Y.; ROHACS, T. The G-protein-biased agents PZM21 and TRV130 are partial agonists of mu-opioid receptor-mediated signalling to ion channels. **Br J Pharmacol**, v. 176, n. 17, p. 3110-3125, 2019.

ZAMANI, N.; BUCKLEY, N. A.; HASSANIAN-MOGHADDAM, H. Buprenorphine to reverse respiratory depression from methadone overdose in opioid-dependent patients: a prospective randomized trial. **Crit Care**, v. 24, n. 1, p. 44, 2020.

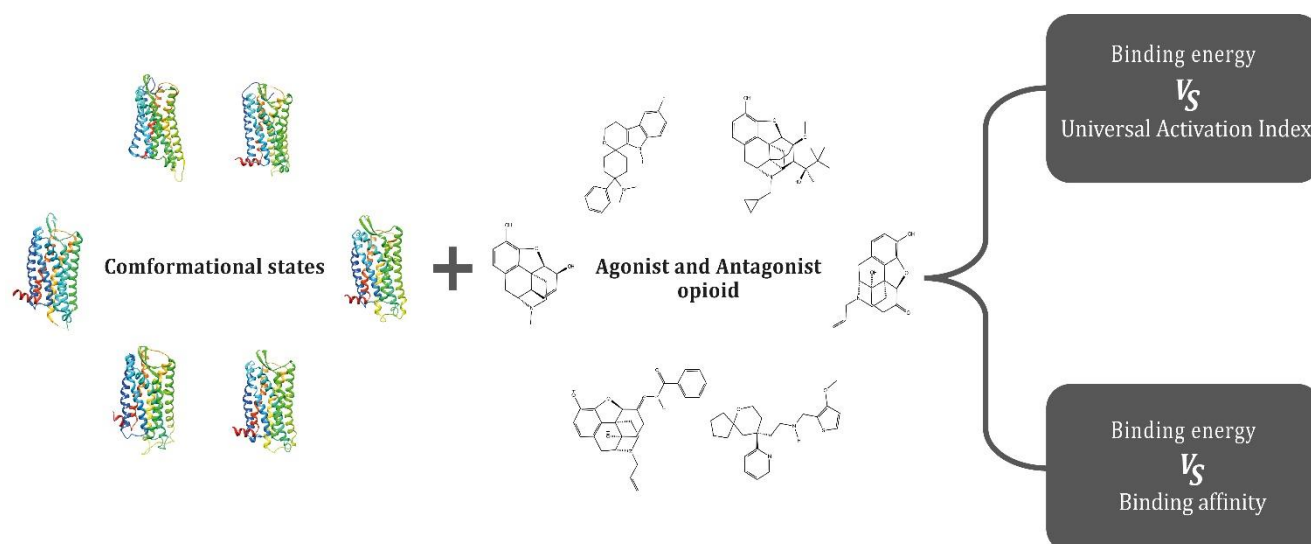
ZENG, X. S.; GENG, W. S.; WANG, Z. Q.; JIA, J. J. Morphine Addiction and Oxidative Stress: The Potential Effects of Thioredoxin-1. **Front Pharmacol**, v. 11, n., p. 82, 2020.

APÊNDICE**ARTIGO NO FORMATO DA REVISTA QUE SUBMETIDO**

Nome da revista: Molecular Diversity

Link para revista: <https://www.springer.com/journal/11030>**Ensemble docking to the μ -opioid receptor**Josué Dantas de Sousa¹, Rubem Francisco Silva Bezerra¹, Guilherme Mota dos Santos¹, Mira Raya Paula de Lima¹, Diniz Maciel de Sena Junior¹**Abstract**

The μ -opioid receptor (MOR) is a G protein coupled receptor (GPCR) from the rhodopsin family. Several conformational states that exist in equilibrium between active and inactive conformations tend to be stabilized when small molecules bind the receptor. These states present subtle differences in the receptor binding site, leading to varying ligand-receptor interaction profiles. Computational methods are powerful alternatives to study ligand interactions and help understand the mechanisms involved in MOR activation. In this study, the binding site of MOR in different conformations was assessed using molecular docking, with parameters that were determined by redocking of ligands to other GPCRs with available structures. 13 representative conformations of MOR were extracted from molecular dynamics simulations of the receptor bound to morphine, BU72, naloxone and naloxone benzoylhydrazone. In addition to these ligands, buprenorphine, PZM21, cebranopadol, oliceridine and naldemedine were docked to each receptor structure, including the inactive and active crystal structures. Results were interpreted considering the Universal Activation Index of each receptor structure and ligand binding affinity (expressed in terms of their inhibition constants, K_i). In general, receptor conformations with higher Universal Activation Indices showed a pattern among the binding energy values. However, the relation of calculated binding energies with experimental K_i values did not show a clear tendency.

Graphic abstract**Keywords** G protein-coupled receptors, Opioids, Computational chemistry, Molecular docking

Extended author information available on the last page of the article

Introduction

G protein coupled receptors (GPCRs) are key components to several cellular signaling processes [1]. With approximately 900 human genes, GPCRs comprise the largest family of transmembrane receptors [1]. These receptors are considered one of the main pharmacological targets in humans, accounting for more than one third of all drugs currently marketed [2,3].

The μ -opioid receptor (MOR) is a GPCR involved in most analgesic properties of opioid drugs [4]. It belongs to class A (rhodopsin-like) family and is bound to inhibitory G protein (G_i) [5]. MOR can be found in several parts of the human body: heart, joints, central nervous system, immune system and gastrointestinal tract, which facilitates the analgesic action of opioids [6].

The therapeutic effects of opioids are due to MOR activation and signaling through the G_i protein pathway [7]. However, undesired side effects such as respiratory depression and constipation, results from signaling through the β -arrestin pathway [8].

When bound to a small molecule, MOR has its internal cavity stabilized in conformational equilibria among active, inactive and intermediary states [9]. The relative population in each state will determine the signaling levels in each pathway [9].

Long molecular dynamics simulations can be used to observe the transitions of conformational states during the activation process of GPCRs [7]. The level of activation of these conformational states obtained from molecular dynamics simulations and also of the crystallization process of GPCRs structure can be indicated through an activation index model based on interhelix distances, developed by Ibrahim et al. [10].

In general, different conformational states present distinct modifications on the binding site structure [11]. This

allows the occurrence of different interaction profiles for the same ligand. Subtle changes to the binding site will then trigger specific signaling profiles. Thus, investigation of the structural dynamics of GPCRs is important to understand their physiology and help the development of structure-based drug design more effectively [12].

Structure-based drug design is a powerful method that reduces the number of potential leads in experimental studies, reducing research costs and the time necessary to reach the market [13].

One popular method used to study ligand-receptor interactions is molecular docking, which is very useful at the beginning of new drugs development research [12]. In this study, the binding site of the MOR in different conformations is assessed by molecular docking in order to relate binding energy with receptor and ligand properties, namely the activation state (indicated by the Universal Activation Index) and the dissociation constant (K_i), respectively.

Methods

Structures selection

The set of structures used for assessing the docking parameters was comprised by 9 class A GPCRs (listed in Table 1), which were chosen based on availability in the PDB repository, resolution and sequence integrity.

The target structures used for docking include the active (PDB id: 5C1M) and inactive (PDB id: 4DKL) states of MOR, as well as representative conformations extracted from molecular dynamics simulations of MOR bound to different ligands, in a total of 13 structures, as listed in Table 2 [11].

Table 1 Selected structures for the molecular redocking process

Receptor	Activation status	PDB-ID	Co-crystal ligand	Resolution (Å)
μ -opioid	Active	5C1M	BU72	2.1
κ -opioid	Active	6B73	MP1104	3.1
δ -opioid	Inactive	4N6H	Naltrindol	1.8
nociceptin/orphanin FQ opioid	Inactive	5DHH	SB-612111	3.0
Adenosine A _{2A}	Active	2YDV	NECA	2.6
β_1 -Adrenergic	Active	2Y02	Carmoterol	2.6
	Inactive	2YCW	Carazolol	3.0
β_2 -Adrenergic	Active	4LDE	BI167107	2.8
	Inactive	2RH1	Carazolol	2.4

Table 2 Representative structures used in molecular docking

Group based on the associated ligand	Representative structure	Universal Activation Index
B72	B72_1	40.12
	B72_2	25.80
	B72_3	36.10
MOP	MOP_1	-53.77
	MOP_2	-47.05
	MOP_3	-45.02
NBH	NBH_1	-66.49
	NBH_2	-68.84
	NBH_3	-53.96
	NBH_4	-45.94
	NBH_5	-63.04
NLX	NLX_1	-63.77
	NLX_2	-60.26

The following substances were docked to the MOR: BU72 (B72, the co-crystallized ligand in 5C1M), morphine (MOP, the prototypical opioid), oliceridine (OLI, a successful G-protein biased agonist), cebranopadol (CBP), PZM21 (P21), buprenorphine (BUP), naloxone (NLX, the classical opioid antagonist), naloxone benzoylhydrazone (NBH, a partial agonist) and naldemedine (NDM).

Redocking

The structures of the crystallized complexes were aligned with the active state MOR structure (PDB id: 5C1M) previously oriented along the z-axis of coordinates, using the most conserved residues as reference. UCSF Chimera 1.14 was used to remove non-protein molecules, separate the co-crystallized ligands coordinates, and add missing hydrogen atoms to the receptor [14].

The resultant receptor structures were submitted to online servers NQ-Flipper V2.7 [15] and molprobit 4.5 [16] in order to validate the rotamer states of asparagine and glutamine, and the protonation state of histidines, respectively. Structures taken from molecular dynamics trajectories were used without modification, as they had been prepared prior to running the simulations.

Ligand structures were protonated using Open Babel 2.3.2 [17], and had their geometries optimized at the Hartree-Fock level of theory, with 6-31G (d,p) basis set, using G.A.M.E.S.S. package [18].

Assessment of docking conditions

The docking parameters were assessed by redocking the co-crystallized ligands back into their receptors under different conditions, using AutoDock 4.2.6 [19]. A unique simulation box, where the whole binding site fits in, was defined and the Lamarckian Genetic Algorithm method was used. The population was fixed to 300 individuals while number of

runs (50, 100, 200, 500, 700 and 2000) and energy evaluations (1, 10 and 20 million) were varied. Additional parameters were kept with their default values. Receptor structures were kept rigid, while ligand torsions were allowed.

The RMSDs between the lowest energy pose obtained from the redocking process and the original ligand position, considering heavy atoms only, were calculated using UCSF Chimera 1.14 [14,20].

The binding energy difference between that of the original ligand pose and the docked pose was also calculated. The conditions for which the average RMSD was lowest and the binding energy was within the experimental error (i.e., 2.5 kcal/mol) were elected for the subsequent docking calculations.

Molecular Docking

Using the parameters set in the previous step, all ligands were docked to MOR structures using AutoDock4.2.6. Based on site-directed mutagenesis assays, published in the literature, the residues D147 [21], Y148 [22], H297 [23,24], W318 [22], HIS319 [22], and Y326 [23] were considered flexible.

All residues within a distance of 5 Å from the ligand in the crystal structure 5C1M were considered belonging to the binding site of MOR [25]. For each set of representative structures (i.e., from the trajectory of the same complex), a unique grid box containing all residues of the binding site was defined.

Universal Activation index

Each structure of the MOR had its Universal Activation Index (UAI) assessed according to the methodology proposed by Ibrahim et al., using a python script provided by their group [10]. UAI values greater than 55 are observed for active structures, while values between 0 and 55 are attributed to intermediate states, and negative values to inactive states.

Results and Discussion

Redocking

Redocking of ligands to their receptors successfully reproduced the original pose from the crystal structure (Figure S1). The average RMSD values between docked pose and original pose for each set of conditions were less than 2 Å and are shown in Table 3 (individual values are shown in Table S1). Additionally, all binding energies are within the calculated values for the original pose, considering an error of ± 2.5 kcal·mol⁻¹ (Table S2). The lowest values for the average RMSD corresponds to the condition of 100 runs and 1 million energy evaluations, thus these parameters were used for docking to the MOR.

Table 3 RMSD values between the poses with the lowest binding energy obtained in redocking and the respective co-crystallized ligand

Runs	Condition		Average of RMSD /Å
	Energy Evaluations /10 ⁶		
50	1		1.195
	10		1.177
	20		1.708
100	1		0.928
	10		1.310
	20		1.086
200	1		0.960
	10		1.115
	20		1.172
500	1		0.973
	10		1.114
	20		1.106
700	1		1.120
	10		1.510
	20		1.144
2000	1		1.028
	10		1.189
	20		1.074

Receptor activation states

The MOR structures considered for docking the selected ligands span a range of activation states, as determined by their UAI (Table 2), ranging from -68.84 (inactive state) to 60.19 (active state crystal structure). Conformations extracted from the MOR-B72 complex trajectories were classified as in intermediate states of activation.

Docking results

Binding energies obtained from docking calculations are presented in Table S3. In general, receptor conformations with higher UAI showed a pattern among the binding energy values, where the higher the UAI of the conformational states the lower the binding energy, except for BUP, as shown in Figure 1.

The P21 showed the highest binding energy values, that fact does not reflect the experimental high affinity presented by the ligand [26], while B72, NBH and NDM showed the lowest values, in accordance with their experimental high affinities [27] [28] [29].

For some ligands, the calculated binding energy when bound to an intermediate/inactive conformational state of the receptor was found to be lower than that observed when bound to the active conformation (e.g., BUP, CBP, MOP, P21, and OLI).

Binding affinity vs. binding energy

Another approach used to analyze the docking results was to relate the calculated binding energies with the experimental inhibition constants reported for each ligand. However, the availability of such data is not straightforward to obtain, for different methods will result in different values for the same ligand [30]. In order to bring some homogeneity to K_i data, we have compared available values from human and murine receptors, using [³H]diprenorphine and [³H]DAMGO radioligands, and established a scale factor to convert all values to an equivalent rat/[³H]diprenorphine set.

In Table 5 K_i values for CBP, NDM and OLI bound to human and murine receptor, using [³H]DAMGO (CBP, NDM) and [³H]diprenorphine (OLI) as the radioligand are presented. From this data, the relationship between $K_{i(\text{human})}$ and $K_{i(\text{rat})}$ can be established as the average of the ratio $K_{i(\text{human})}/K_{i(\text{rat})}$. In this way, one can estimate the $K_{i(\text{rat})}$ from the $K_{i(\text{human})}$ by dividing the latter by 0.289 (Equation 1).

Likewise, in Table 6 values of K_i for NLX bound to the human receptor and MOP bound to the murine receptor are shown for essays using both radioligands. From this data, the ratio $K_{i([\text{H}]diprenorphine)}/K_{i([\text{H}]DAMGO)}$ is found to be 5.128, thus, an estimate of $K_{i([\text{H}]diprenorphine)}$ can be obtained by multiplying $K_{i([\text{H}]DAMGO)}$ by this factor (Equation 2).

Using the scale factors described above, values of adjusted K_i for all ligands considered in this study are presented in Table 7.

Ligands were then ordered based on their adjusted K_i values and plots of calculated binding energy versus K_i , grouped by conformation clusters, are shown in Figure 2.

Table 4 Elaboration of the 1st conversion factor

Species	K _i values (nM)		
	³ H]DAMGO		³ H]diprenorphine
	CBP	NDM	OLI
Human	0.7	0.34	6
Rat	2.4	1.4	18
<hr/>			
K _i human/ K _i rat	0.292	0.243	0.333

Equation 1 1st conversion factor

$$\frac{0,292+0,243+0,333}{3} = \mathbf{0.289}$$

Table 5 Elaboration of the 2nd conversion factor

Radioligand	K _i values (nM)	
	Human	Rat
	NLX	MOP
³ H]DAMGO	1.518	1.2
³ H]diprenorphine	7.6	6.3
<hr/>		
K _i [³ H]diprenorphine / K _i [³ H]DAMGO	5.007	5.250

Equation 2 2st conversion factor

$$\frac{5,007 + 5,250}{2} = \mathbf{5.128}$$

Table 6 Experimental and adjusted K_i of opioids

Ligand	³ H]DAMGO			Ref.	³ H]Diprenorphine				
	K _i human	Ref.	K _i rat		K _i human	Ref.	K _i rat	Ref.	K _i rat adjusted
	nM		nM		nM		nM		nM
NLX	1.518	[30]	-		7.600	[31]	-		26.591
OLI	-		-		6.000	[31]	18.000	[31]	18.000
CPB	0.700	[32]	2.400	[32]	-		-		12.359
NDM	0.340	[29]	1.400	[29]	-		-		7.180
MOP	-		1.200	[33]	-		6.300	[27]	6.300
NBH	-		-		1.500	[28]	-		5.185
P21	-		-		1.100	[26]	-		3.802
BUP	-		-		-		0.740	[27]	0.740
B72	-		-		-		0.060	[27]	0.060

In general, binding energies values showed a similar pattern among all receptor structures when plotted against the adjusted K_i, but does not correspond to the expected logarithmic behavior. This divergence can be explained by the inhomogeneity of data used to calculate the adjusted K_i values and to the experimental conditions employed to determine those values (e.g., presence of solvent and radioligand used) that are not taken into account by the software.

Conclusion

The redocking procedure performed with class A GPCRs could successfully reproduce the original ligand poses and help establish appropriate docking parameters for using with the MOR. Docking of ligands to different conformations of the MOR confirmed, with some exceptions, the higher affinity of the receptor when in the active state. Even though inactive states can be classified in order of activation state, the interactions with ligands did not follow a clear pattern.

An intuitive way to obtain comparable values for inhibition constants was suggested but needs further

refinement with a larger set of data, in order to be statistically significant.

Acknowledgements D.M.S.Jr. acknowledges National Laboratory for Scientific Computing (LNCC) for computing resources at Santos Dumont supercomputer (proj. AVSMOR), and Centro Nacional de Processamento de Alto Desempenho (CENAPAD/SP, proj. 643).

Funding D.M.S.Jr. acknowledges financial support from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ) (Research Grant 313407/2017-7).

Compliance with ethical standards

Conflicts of interest The authors declare no conflicts of interest.

References

1. Tan B, Liu M (2018) Newly characterized crystal structures: further insights into the architecture of GPCRs. *Sci China Life Sci* 61 (5):593-596. doi:https://doi.org/10.1007/s11427-017-9159-6
2. Fang Y, Kenakin T, Liu C (2015) Editorial: Orphan GPCRs As Emerging Drug Targets. *Front Pharmacol* 6:295. doi:https://doi.org/10.3389/fphar.2015.00295
3. Sakkal LA, Rajkowski KZ, Armen RS (2017) Prediction of consensus binding mode geometries for related chemical series of positive allosteric modulators of adenosine and muscarinic acetylcholine receptors. *J Comput Chem* 38 (15):1209-1228. doi:https://doi.org/10.1002/jcc.24728
4. Pellissier LP, Gandia J, Laboute T, Becker JAJ, Le Merrer J (2018) μ opioid receptor, social behaviour and autism spectrum disorder: reward matters. *British Journal of Pharmacology* 175 (14):2750-2769. doi:https://doi.org/10.1111/bph.13808
5. Cheng JX, Cheng T, Li WH, Liu GX, Zhu WL, Tang Y (2018) Computational insights into the G-protein-biased activation and inactivation mechanisms of the μ opioid receptor. *Acta Pharmacol Sin* 39 (1):154-164. doi:https://doi.org/10.1038/aps.2017.158
6. Madhusoodanan J (2018) Inner Workings: Safer opioids may be on the horizon, but mitigating addiction is a long shot. *Proc Natl Acad Sci U S A* 115 (33):8229-8231. doi:https://doi.org/10.1073/pnas.1812313115
7. Mondal D, Kolev V, Warshel A (2020) Exploring the activation pathway and Gi-coupling specificity of the μ -opioid receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. doi:https://doi.org/10.1073/pnas.2013364117
8. Mafi A, Kim SK, Goddard WA, 3rd (2020) Mechanism of beta-arrestin recruitment by the μ -opioid G protein-coupled receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 117 (28):16346-16355. doi:https://doi.org/10.1073/pnas.1918264117
9. Okude J, Ueda T, Kofuku Y, Sato M, Nobuyama N, Kondo K, Shiraishi Y, Mizumura T, Onishi K, Natsume M, Maeda M, Tsujishita H, Kuranaga T, Inoue M, Shimada I (2015) Identification of a Conformational Equilibrium That Determines the Efficacy and Functional Selectivity of the μ -Opioid Receptor. *Angew Chem Int Ed Engl* 54 (52):15771-15776. doi:https://doi.org/10.1002/anie.201508794
10. Ibrahim P, Wifling D, Clark T (2019) Universal Activation Index for Class A GPCRs. *J Chem Inf Model* 59 (9):3938-3945. doi:https://doi.org/10.1021/acs.jcim.9b00604
11. Sena DM, Cong X, Giorgetti A (2021) Ligand based conformational space studies of the μ -opioid receptor. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* 1865 (3):129838. doi:https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2020.129838
12. Latorraca NR, Venkatakrisnan AJ, Dror RO (2017) GPCR Dynamics: Structures in Motion. *Chemical Reviews* 117 (1):139-155. doi:https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.6b00177
13. Leelananda SP, Lindert S (2016) Computational methods in drug discovery. *Beilstein J Org Chem* 12:2694-2718. doi:https://doi.org/10.3762/bjoc.12.267
14. Pettersen EF, Goddard TD, Huang CC, Couch GS, Greenblatt DM, Meng EC, Ferrin TE (2004) UCSF Chimera--a visualization system for exploratory research and analysis. *J Comput Chem* 25 (13):1605-1612. doi:https://doi.org/10.1002/jcc.20084
15. Weichenberger CX, Sippl MJ (2006) NQ-Flipper: validation and correction of asparagine/glutamine amide rotamers in protein crystal structures. *Bioinformatics* 22 (11):1397-1398. doi:https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btl128
16. Williams CJ, Headd JJ, Moriarty NW, Prisant MG, Videau LL, Deis LN, Verma V, Keedy DA, Hintze BJ, Chen VB, Jain S, Lewis SM, Arendall WB, 3rd, Snoeyink J, Adams PD, Lovell SC, Richardson JS, Richardson DC (2018) MolProbity: More and better reference data for improved all-atom structure validation. *Protein Sci* 27 (1):293-315. doi:https://doi.org/10.1002/pro.3330
17. O'Boyle NM, Banck M, James CA, Morley C, Vandermeersch T, Hutchison GR (2011) Open Babel: An open chemical toolbox. *J Cheminform* 3:33. doi:https://doi.org/10.1186/1758-2946-3-33
18. Barca GMJ, Bertoni C, Carrington L, Datta D, De Silva N, Deustua JE, Fedorov DG, Gour JR, Gunina AO, Guidez E, Harville T, Irle S, Ivanic J, Kowalski K, Leang SS, Li H, Li W, Lutz JJ, Magoulas I, Mato J, Mironov V, Nakata H, Pham BQ, Piecuch P, Poole D, Pruitt SR, Rendell AP, Roskop LB, Ruedenberg K, Sattasathuchana T, Schmidt MW, Shen J, Slipchenko L, Sosonkina M, Sundriyal V, Tiwari A, Galvez Vallejo JL, Westheimer B, Wloch M, Xu P, Zahariev F, Gordon MS (2020) Recent developments in the general atomic and molecular electronic structure system. *J Chem Phys* 152 (15):154102. doi:https://doi.org/10.1063/5.0005188
19. Morris GM, Huey R, Lindstrom W, Sanner MF, Belew RK, Goodsell DS, Olson AJ (2009) AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility. *J Comput Chem* 30 (16):2785-2791. doi:https://doi.org/10.1002/jcc.21256
20. Wang Z, Sun H, Yao X, Li D, Xu L, Li Y, Tian S, Hou T (2016) Comprehensive evaluation of ten docking programs on a diverse set of protein-ligand complexes: the prediction accuracy of sampling power and scoring power. *Physical Chemistry Chemical Physics* 18 (18):12964-12975. doi:https://doi.org/10.1039/c6cp01555g
21. Li JG, Chen C, Yin J, Rice K, Zhang Y, Matecka D, de Riel JK, DesJarlais RL, Liu-Chen LY (1999) ASP147 in the third transmembrane helix of the rat μ opioid receptor forms ion-pairing with morphine and naltrexone. *Life Sciences* 65 (2):175-185. doi:https://doi.org/10.1016/s0024-3205(99)00234-9

22. Xu H, Lu YF, Partilla JS, Zheng QX, Wang JB, Brine GA, Carroll FI, Rice KC, Chen KX, Chi ZQ, Rothman RB (1999) Opioid peptide receptor studies. 11: involvement of Tyr148, Trp318 and His319 of the rat mu-opioid receptor in binding of mu-selective ligands. *Synapse* 32 (1):23-28. doi:[https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-2396\(199904\)32:1<23::AID-SYN3>3.0.CO;2-N](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-2396(199904)32:1<23::AID-SYN3>3.0.CO;2-N)
23. Mansour A, Taylor LP, Fine JL, Thompson RC, Hoversten MT, Mosberg HI, Watson SJ, Akil H (1997) Key residues defining the mu-opioid receptor binding pocket: a site-directed mutagenesis study. *Journal Neurochemistry* 68 (1):344-353. doi:<https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.1997.68010344.x>
24. Bot G, Blake AD, Li S, Reisine T (1998) Mutagenesis of a single amino acid in the rat mu-opioid receptor discriminates ligand binding. *Journal Neurochemistry* 70 (1):358-365. doi:<https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.1998.70010358.x>
25. Lam PC, Abagyan R, Totrov M (2018) Ligand-biased ensemble receptor docking (LigBEnD): a hybrid ligand/receptor structure-based approach. *J Comput Aided Mol Des* 32 (1):187-198. doi:<https://doi.org/10.1007/s10822-017-0058-x>
26. Manglik A, Lin H, Aryal DK, McCorvy JD, Dengler D, Corder G, Levit A, Kling RC, Bernat V, Hubner H, Huang XP, Sassano MF, Giguere PM, Lober S, Da D, Scherrer G, Kobilka BK, Gmeiner P, Roth BL, Shoichet BK (2016) Structure-based discovery of opioid analgesics with reduced side effects. *Nature* 537 (7619):185-190. doi:<https://doi.org/10.1038/nature19112>
27. Neilan CL, Husbands SM, Breeden S, Ko MC, Aceto MD, Lewis JW, Woods JH, Traynor JR (2004) Characterization of the complex morphinan derivative BU72 as a high efficacy, long-lasting mu-opioid receptor agonist. *Eur J Pharmacol* 499 (1-2):107-116. doi:<https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2004.07.097>
28. Ozaki S, Kawamoto H, Itoh Y, Miyaji M, Azuma T, Ichikawa D, Nambu H, Iguchi T, Iwasawa Y, Ohta H (2000) In vitro and in vivo pharmacological characterization of J-113397, a potent and selective non-peptidyl ORL1 receptor antagonist. *Eur J Pharmacol* 402 (1-2):45-53. doi:[https://doi.org/10.1016/s0014-2999\(00\)00520-3](https://doi.org/10.1016/s0014-2999(00)00520-3)
29. Kanemasa T, Koike K, Arai T, Ono H, Horita N, Chiba H, Nakamura A, Morioka Y, Kihara T, Hasegawa M (2019) Pharmacologic effects of naldemedine, a peripherally acting mu-opioid receptor antagonist, in vitro and in vivo models of opioid-induced constipation. *Neurogastroenterol Motil* 31 (5):e13563. doi:<https://doi.org/10.1111/nmo.13563>
30. Volpe DA, McMahan Tobin GA, Mellon RD, Katki AG, Parker RJ, Colatsky T, Kropp TJ, Verbois SL (2011) Uniform assessment and ranking of opioid mu receptor binding constants for selected opioid drugs. *Regul Toxicol Pharmacol* 59 (3):385-390. doi:<https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2010.12.007>
31. DeWire SM, Yamashita DS, Rominger DH, Liu G, Cowan CL, Graczyk TM, Chen XT, Pitis PM, Gotchev D, Yuan C, Koblisch M, Lark MW, Violin JD (2013) A G protein-biased ligand at the mu-opioid receptor is potentially analgesic with reduced gastrointestinal and respiratory dysfunction compared with morphine. *J Pharmacol Exp Ther* 344 (3):708-717. doi:<https://doi.org/10.1124/jpet.112.201616>
32. Linz K, Christoph T, Tzschentke TM, Koch T, Schiene K, Gautrois M, Schroder W, Kogel BY, Beier H, Englberger W, Schunk S, De Vry J, Jahnel U, Frosch S (2014) Cebranopadol: a novel potent analgesic nociceptin/orphanin FQ peptide and opioid receptor agonist. *J Pharmacol Exp Ther* 349 (3):535-548. doi:<https://doi.org/10.1124/jpet.114.213694>
33. Chen ZR, Irvine RJ, Somogyi AA, Bochner F (1991) Mu receptor binding of some commonly used opioids and their metabolites. *Life Sciences* 48 (22):2165-2171. doi:[https://doi.org/10.1016/0024-3205\(91\)90150-A](https://doi.org/10.1016/0024-3205(91)90150-A)

Affiliations

Josué Dantas de Sousa^{1,*}, Rubem Francisco Silva Bezerra¹, Guilherme Mota dos Santos¹, Mira Raya Paula de Lima¹, Diniz Maciel de Sena Junior^{1,}**

* Josué Dantas de Sousa

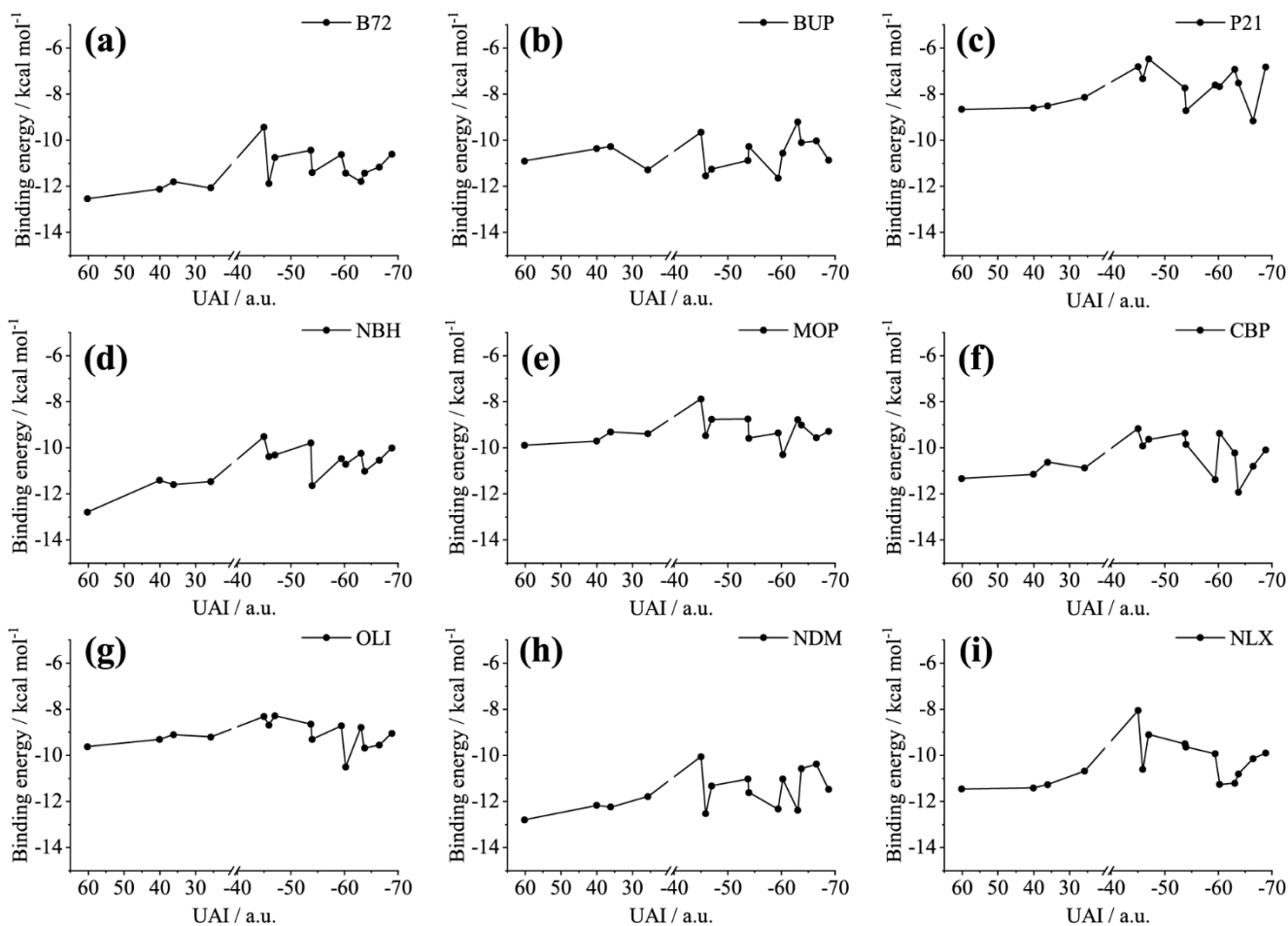
josue.sousa@urca.br

** Diniz Maciel de Sena Junior

dnz@urca.br

¹ Biological Chemistry Department, Universidade Regional do Cariri, Crato, CE, 63105-000, Brazil

FIGURAS PERTENCENTES AO ARTIGO

**Fig. 1** Correlation graphs between binding energy values and UAI

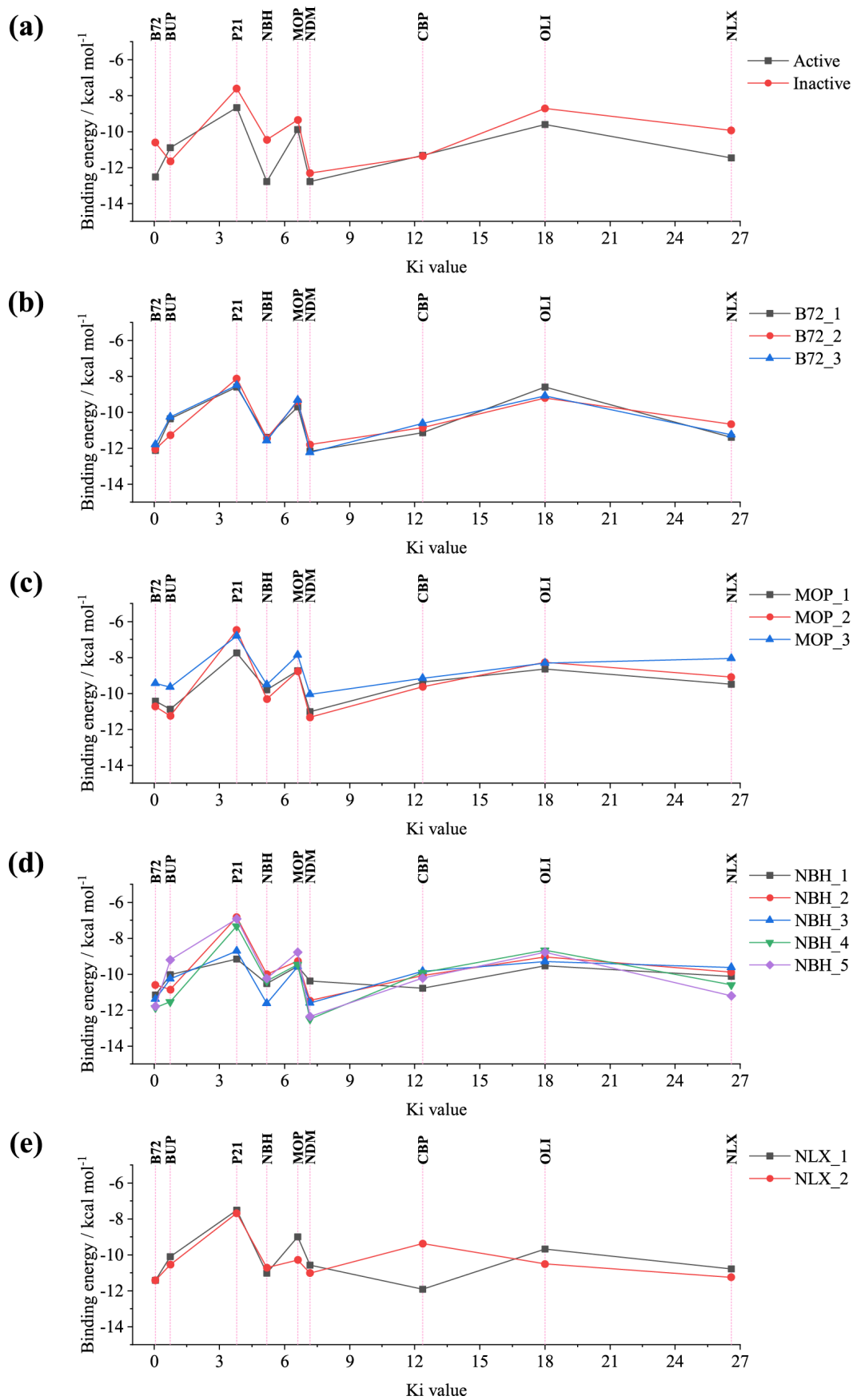


Fig. 2 Correlation graphs between binding energy data and binding affinity data

Ensemble docking to the μ -opioid receptor

Josué Dantas de Sousa^{1,*}, Rubem Francisco Silva Bezerra¹, Guilherme Mota dos Santos¹,
Mira Raya Paula de Lima¹, Diniz Maciel de Sena Junior^{1,**}

Corresponding authors e-mail:

* Josué Dantas de Sousa
josue.sousa@urca.br

** Diniz Maciel de Sena Junior
dnz@urca.br

¹ Biological Chemistry Department, Universidade Regional do Cariri, Crato, CE, 63105-000, Brazil

Journal name: Molecular Diversity

Supplementary Information

Abbreviations

PDB	Protein data bank
RMSD	Root-mean-square deviation
MOR	μ -opioid receptor
KOR	k-opioid receptor
DOR	δ -opioid receptor
NOP	Nociceptin/ orphanin FQ opioid receptor
A2AR	A _{2A} adenosine receptor
B1AR	β_1 -Adrenergic receptor
B2AR	β_2 -Adrenergic receptor
REF.	Binding energy of the crystallized structure
DOCK.	Binding energy of the re-docking process
NLX	Naloxone
OLI	Oliceridine
CBP	Cebranopadol
NDM	Naldemedine
MOP	Morphine
NBH	Naloxone benzoylhydrazone
P21	PZM21
BUP	Buprenorphine
B72	BU72

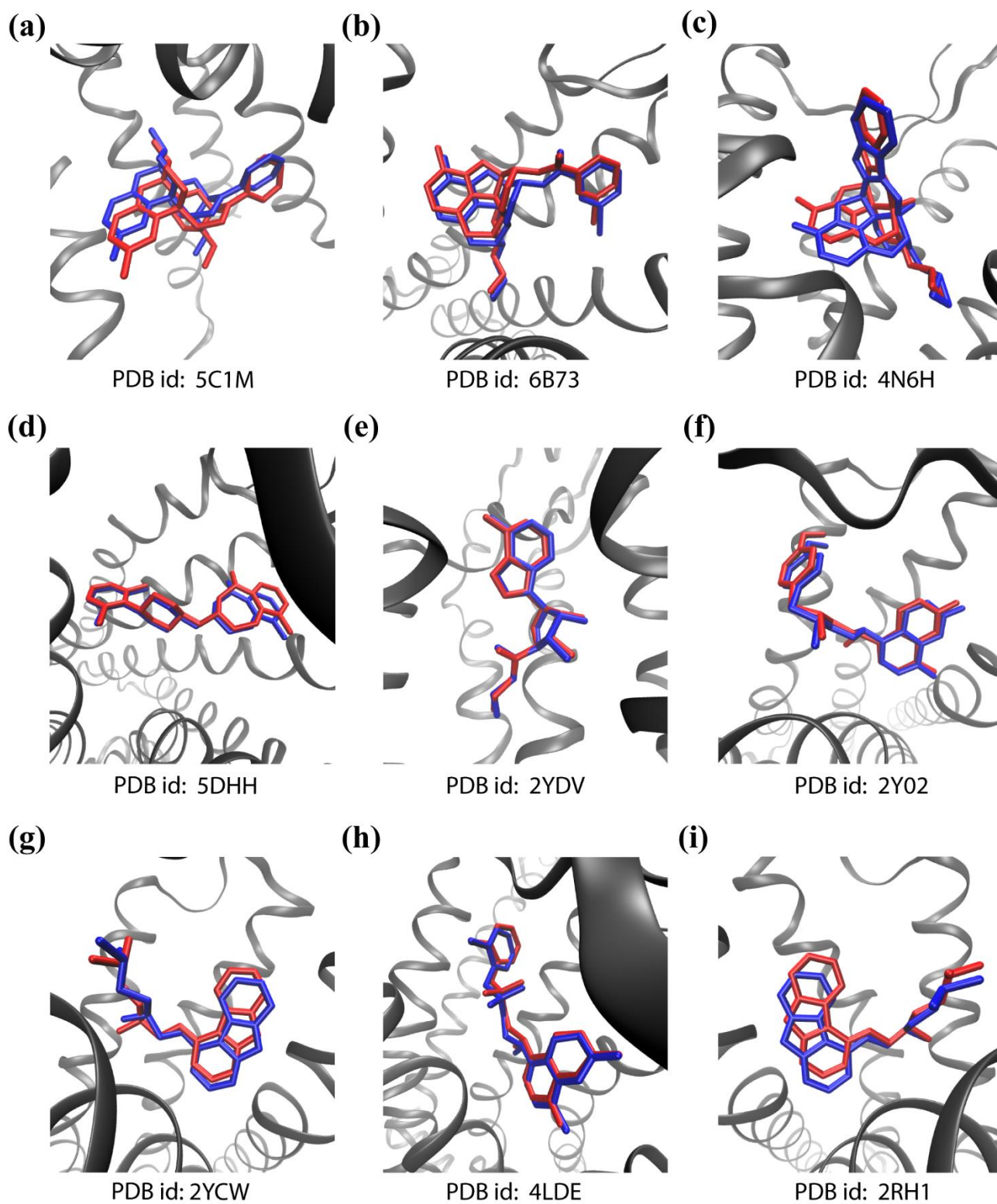


Fig. S1: Lower energy poses found in the re-docking process (in blue) compared to co-crystallized ligands in the original position (in red), with the receptors: μ -opioid active state (a), κ -opioid active state (b), δ -opioid inactive state (c), nociceptin/orphanin FQ opioid inactive state (d), Adenosine A_{2A} active state (e), β_1 -Adrenergic active state (f), β_1 -Adrenergic inactive state (g), β_2 -Adrenergic active state (h), and β_2 -Adrenergic inactive state (i).

Table S1: RMSD values of the re-docking process.

Conditions		RMSD (Å)/ by structure									Average of RMSD
Running	Evaluations/10 ⁶	MOR Active	KOR Active	DOR Inactive	NOP Inactive	A2AR Active	β1AR Active Inactive		β2AR Active Inactive		
50	1	0,951	0,756	1,133	1,916	0,448	1,926	0,940	1,336	1,349	1,195
	10	1,118	0,776	1,161	0,758	0,414	2,053	1,507	1,460	1,349	1,177
	20	1,165	0,822	1,143	0,826	5,785	1,215	1,238	1,644	1,538	1,708
100	1	1,002	0,831	1,189	0,701	0,314	1,265	0,839	1,034	1,181	0,928
	10	1,160	0,770	1,140	2,227	0,584	1,836	1,333	1,263	1,474	1,310
	20	1,173	0,781	1,150	0,795	0,402	2,071	1,012	1,151	1,236	1,086
200	1	1,186	0,750	1,133	0,906	0,406	1,389	0,734	0,714	1,423	0,960
	10	1,168	0,860	1,141	0,800	0,916	1,072	1,610	1,127	1,344	1,115
	20	1,162	0,789	1,136	0,831	0,408	2,149	1,006	1,759	1,308	1,172
500	1	1,166	0,732	1,403	0,820	0,423	1,049	0,828	1,018	1,320	0,973
	10	1,194	0,766	1,141	0,767	0,422	2,117	1,033	1,316	1,269	1,114
	20	1,164	0,774	1,144	0,781	0,937	1,932	1,280	0,609	1,329	1,106
700	1	1,051	0,841	1,390	0,774	0,387	1,879	1,205	1,136	1,413	1,120
	10	1,184	0,777	1,381	0,776	0,368	1,943	4,694	1,239	1,229	1,510
	20	1,188	0,773	1,140	0,786	0,970	2,033	1,164	1,166	1,080	1,144
2000	1	1,053	0,854	1,349	0,769	0,404	1,143	1,259	1,239	1,181	1,028
	10	1,163	0,774	1,142	0,812	0,813	2,034	1,274	1,409	1,278	1,189
	20	1,159	0,829	1,149	0,754	1,002	1,996	1,132	0,658	0,991	1,074

Table S2: Binding energy values of the re-docking process and the of crystallized complexes.

Binding energy (kcal·mol ⁻¹)/ by structure																	
Conditions		MOR		KOR		DOR		NOP		A2AR		β1AR		β2AR		Average of binding energy	
Running	Evaluations/ 10 ⁶	Active		Active		Inactive		Inactive		Active		Active		Inactive			
		Ref.	Dock.	Ref.	Dock.	Ref.	Dock.	Ref.	Dock.	Ref.	Dock.	Ref.	Dock.	Ref.	Dock.		
50	1		-10,63		-13,01		-10,92		-10,11		-6,54		-10,20		-9,57		-10,13
	10		-10,62		-13,11		-10,91		-10,32		-6,50		-10,74		-9,84		-10,30
	20		-10,63		-13,11		-10,91		-10,27		-6,24		-10,80		-9,94		-10,30
100	1		-10,65		-13,01		-10,92		-10,16		-6,37		-9,98		-9,46		-10,01
	10		-10,63		-13,10		-10,92		-10,32		-6,47		-10,77		-9,90		-10,31
	20		-10,63		-13,12		-10,92		-10,33		-6,48		-10,87		-9,93		-10,34
200	1		-10,62		-13,04		-10,95		-10,25		-6,64		-10,34		-9,34		-10,19
	10		-10,63		-13,11		-10,92		-10,31		-6,56		-10,78		-9,95		-10,37
	20		-10,63		-13,12		-10,92		-10,33		-6,49		-10,80		-10,0		-10,37
500	1	-10,86		-12,54		-9,52		-9,85		-5,94		-10,66		-9,13		-10,11	-9,48
	10		-10,63		-13,06		-10,99		-10,30		-6,66		-10,56		-9,81		-10,28
	20		-10,63		-13,11		-10,93		-10,34		-6,51		-10,82		-10,0		-10,36
700	1		-10,64		-13,11		-11,05		-10,29		-6,75		-10,63		-9,59		-10,24
	10		-10,63		-13,11		-10,96		-10,36		-6,72		-10,84		-9,99		-10,41
	20		-10,63		-13,12		-10,93		-10,34		-6,61		-10,92		-10,01		-10,40
2000	1		-10,66		-13,09		-11,03		-10,34		-6,71		-10,56		-9,85		-10,31
	10		-10,64		-13,12		-10,94		-10,34		-6,64		-10,93		-9,96		-10,41
	20		-10,64		-13,12		-10,93		-10,35		-6,60		-10,98		-10,03		-10,42

Table S3: binding energy values obtained from molecular docking calculation.

Conformational state	Binding energy (kcal·mol ⁻¹)								
	Associated ligand								
	NLX	OLI	CBP	NDM	MOP	NBH	P21	BUP	B72
Active	-11,46	-9,62	-11,33	-12,79	-9,89	-12,79	-8,66	-10,90	-12,53
Inactive	-9,93	-8,72	-11,37	-12,32	-9,36	-10,47	-7,61	-11,65	-10,63
B72_1	-11,41	-9,31	-11,14	-12,17	-9,70	-11,41	-8,60	-10,36	-12,12
B72_2	-10,68	-9,20	-10,87	-11,79	-9,39	-11,45	-8,14	-11,28	-12,06
B72_3	-11,26	-9,10	-10,62	-12,24	-9,32	-11,59	-8,50	-10,27	-11,81
MOP_1	-9,50	-8,65	-9,37	-11,02	-8,75	-9,79	-7,75	-10,89	-10,43
MOP_2	-9,09	-8,28	-9,63	-11,32	-8,76	-10,32	-6,48	-11,25	-10,75
MOP_3	-8,05	-8,32	-9,17	-10,05	-7,88	-9,51	-6,81	-9,66	-9,44
NBH_1	-10,14	-9,55	-10,79	-10,38	-9,57	-10,54	-9,16	-10,04	-11,17
NBH_2	-9,89	-9,04	-10,08	-11,47	-9,28	-10,00	-6,83	-10,87	-10,60
NBH_3	-9,63	-9,30	-9,84	-11,61	-9,59	-11,64	-8,71	-10,27	-11,41
NBH_4	-10,60	-8,68	-9,91	-12,51	-9,48	-10,39	-7,32	-11,54	-11,87
NBH_5	-11,21	-8,78	-10,22	-12,37	-8,79	-10,25	-6,93	-9,21	-11,79
NLX_1	-10,79	-9,69	-11,92	-10,58	-9,01	-11,03	-7,51	-10,10	-11,43
NLX_2	-11,25	-10,51	-9,37	-11,02	-10,29	-10,71	-7,68	-10,55	-11,42