



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Químicas

“Modelos de interacción de agonistas sesgados en el receptor opioide Mu”

T E S I S

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA:

Ricardo Bruno Hernández Alvarado

TUTOR

Dra. Karina Martínez Mayorga

Instituto de Química

CIUDAD DE MEXICO, NOVIEMBRE 2020



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Agradecimientos

Agradezco a la Universidad Nacional Autónoma de México por permitir mi formación profesional en ya más de 10 años y al Instituto de Química donde se realizó este trabajo de tesis.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca otorgada bajo el número de becario 957374. Al Grupo de Química Biológica y Computacional (QUIBIC) por permitirme el desarrollo de mis habilidades técnicas y financiamiento.

A la Dra. Karina Martínez Mayorga y al Dr. Abraham Madariaga Mazón por su asesoría y acompañamiento a lo largo del proyecto.

A cada uno de los miembros del jurado, la Dra. Adela Rodríguez, Dr. Andrés Navarrete, Dr. Joaquín Barroso, Dr. Martín González y Dra. Laura Domínguez, por el tiempo invertido en leer y corregir esta tesis.

A DGTIC por el tiempo de supercómputo bajo el proyecto LANCAD-UNAM-DGTIC-367. Así como a Molsoft L.L.C., Chemical Computing Group, OpenMolecules, Grupo Amber y a la Universidad de Rochester por el uso de software.

Al Dr. Alan Grossfield por su tutela durante mi estancia de investigación en la Universidad de Rochester, Nueva York.

Agradezco a mi madre, hermano y abuela.

Cursos impartidos, publicaciones y conferencias

Cursos impartidos:

- “Relaciones cuantitativas estructura-actividad (Q)SAR: Fundamentos e interpretación”, 22-24 octubre 2018. Impartido a PLAFEST S.C.

Publicaciones

- Hernández-Alvarado, R., Madariaga-Mazón, A., Martínez-Mayorga, K. (2019). Prediction of toxicity of secondary metabolites. Physical Sciences Reviews, DOI: 10.1515/psr-2018-0107
- Madariaga-Mazón, A., Hernández-Alvarado, R., Noriega-Colima, K., et al. (2019). Toxicity of secondary metabolites. Physical Sciences Reviews DOI: 10.1515/psr-2018-011
- Hernández-Alvarado, R. B., Madariaga-Mazón, A., Ortega, A., Martínez-Mayorga K. (2020) DARK Classics in Chemical Neuroscience: Salvinorin A. ACS Chemical Neuroscience, *ASAP*. DOI:10.1021/acschemneuro.0c00608

Además, se presentaron los siguientes trabajos en congresos internacionales:

- Spring 2019 National Meeting & Exposition, Orlando FL. American Chemical Society, General Poster Session: Local vs global models for the prediction of acute oral toxicity in rat.
- Spring 2019 National Meeting & Exposition, Orlando FL. American Chemical Society, General Poster Session: Pharmacophore generation of μ -opioid receptor biased-ligands: Uncovering structural features from molecular modeling analysis.

Contenido

Introducción.....	2
Marco teórico.....	3
2.1 Receptores acoplados a proteínas G, dolor y el receptor opioide μ (μ OR).....	3
2.1.1 Tolerancia y desensibilización en μ OR	6
2.1.2 Agonismo sesgado en μ OR.....	6
2.2 Modelado molecular de sistemas biológicos	8
2.2.1 Docking o Acoplamiento molecular	9
2.2.1.1 Docking rígido.....	9
2.2.1.2 Docking flexible	10
2.2.1.3 ICM y MOE	11
2.2.2 Dinámica molecular.....	11
Antecedentes.....	13
3.1 Agonismo sesgado.....	13
3.1.1 Herkinorina.....	15
3.1.1.1 Sitio alostérico del átomo de sodio	15
3.1.2 Compuestos tipo <i>N</i> -bencil piperidina 4-benzimidazolona	16
3.2 Hipótesis.....	17
Objetivo	18
4.1 Objetivo general	18
4.2 Objetivos específicos.....	18
Metodología	19
5.1 Búsqueda y selección del receptor opioide μ	19
5.1.1 Limpieza y Verificación	21
5.2 Acoplamiento molecular o Docking	21
5.2.1 Docking en ICM y MOE.....	21
5.2.2 Selección de poses	23
5.3 Dinámica molecular.....	24
5.3.1 Preparación de los sistemas.....	24
5.3.1.1 Preparación del receptor y membranalipídica	24
5.3.1.2 Preparación de los ligandos	24
5.3.2 Simulaciones de dinámica molecular.....	25

5.4	Análisis de las dinámicas moleculares	28
5.4.1	Análisis RMSD y energía	28
5.4.2	Clustering	28
5.4.3	Análisis de Componentes Principales	29
5.4.4	Interacción ligando-proteína	29
RESULTADOS Y DISCUSIÓN		30
6.1	Docking molecular y selección de poses	30
6.1.1	Limpieza y verificación	30
6.1.2	Controles	33
6.1.3	Morfina	35
6.1.4	Herkinorina	38
6.1.5	Compuestos N-bencil piperidina4-benzimidazolona	41
6.2	Dinámica molecular	48
6.2.1	Análisis de energía y RMSD	48
6.2.2	Análisis temporal del complejo μ OR-ligando	51
6.2.3	Análisis de interacción proteína-ligando	54
6.2.4	Análisis de agrupamiento (<i>clustering</i>) y componentes principales	57
CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS		61
Bibliografía		63
Anexos		73
Anexo A. De los términos biológicos y farmacológicos		73
Posible mecanismo de la trayectoria del ion sodio dentro de la activación de GPCRs		73
Interacciones de los ligandos co-cristalizados en MOR de DAMGO y BU72		74
Factor de sesgo y modelo operacional		75
Anexo B. De los términos metodológicos y computacionales		77
Función de puntaje London dG		77
Agrupamiento y Análisis de componentes principales		78
Metodología de simulación de dinámica molecular de MOR- Herkinorina previa a este trabajo		78

Lista de abreviaturas

AMPc	Adenosín monofosfato cíclico
μ OR	Receptor opioide μ
KOP	Receptor opioide k
DOR	Receptor opioide δ
DAMGO	Tyr-D-Ala-Gly-N-Me-Phe-Gly-ol
CHL	Colesterol
GPCR	Receptor acoplado a proteína G
ECL	Asa extracelular
ICL	Asa intracelular
PC	Componente principal
PCA	Análisis de componentes principales
RMSD	Root mean square deviation
GRK	Cinasa de receptor acoplado a proteína G
POPC	1-palmitoil. 2-oleoil-glicero-3-fosfolina
UNODC	United Nations Office on Drugs and
FDA	Food and Drugs Administration
SBDD	Diseño de fármacos basado en estructura
LBDD	Diseño de fármacos basado en ligando
NBPB	<i>N</i> -Bencil piperidina 4-benzimidazolona
β -FNA	β -funaltrexamina
PDB	Protein Databank
TM	Dominio transmembranal
GAFF	Campo de fuerza general de AMBER
SD	Steepest descent

RESUMEN

Los opioides siguen siendo ampliamente utilizados para aliviar el dolor agudo y crónico. Los avances en biología estructural y biofísica (entre otras disciplinas), han permitido indagar en mayor medida el uso y efecto biológico de diversos opioides, con el objetivo de reducir los efectos adversos que presentan tras altas dosis, uso crónico y contraindicaciones. Recientemente, se ha descrito el fenómeno de agonismo sesgado en receptores acoplados a proteínas G, el cual se caracteriza por la acción de un agonista que orienta a una ruta de señalización preferente a otra. En el caso del receptor opioide μ (blanco molecular de gran parte de los opioides en el mercado), los efectos terapéuticos deseados se han asociado a la ruta de proteína G, por lo que diversos grupos de investigación se han enfocado a buscar agonistas sesgados, además de caracterizar el fenómeno. Con el objetivo de contribuir al conocimiento sobre la interacción de agonistas sesgados con el receptor, en este proyecto se desarrollaron modelos computacionales mediante acoplamiento y dinámica molecular del receptor opioide μ y un compuesto con evidencia experimental de alto nivel de sesgo (C44), así como compuestos control (morfina y herkinorina). Los resultados obtenidos indican que existen diversos residuos en el receptor que tienen interacción con ligandos sesgados, ausentes en el agonista no sesgado. Por otra parte, se observa una tendencia a adoptar conformaciones diferentes del receptor al comparar ambos grupos. Estos resultados representan una herramienta en el diseño de protocolos experimentales enfocados en el desarrollo de nuevas moléculas con efectos adversos reducidos.

Los opioides son una clase de compuestos que interactúan con receptores de opioides y están estructuralmente relacionados con alcaloides naturales encontrados en *Papaver somniferum*. Estos han sido utilizados para diversos fines terapéuticos, por ejemplo, como neuroprotectores de retina (Husain et al., 2012) o para la reducción de la presión arterial (P. Headrick et al., 2012). Sin embargo, su uso más destacado es el de agentes analgésicos sin pérdida de consciencia. Tras su aislamiento a principios del siglo XIX (Presley & Lindsley, 2018) la morfina ha sido un estándar para el alivio del dolor, además de prototipo de comparación en ensayos de analgesia y efectos adversos. Sin embargo, la morfina y la mayoría de opioides producen dependencia y tolerancia, lo que conduce a adicción y abuso de estas sustancias. Algunos opioides sintéticos, como la heroína, el fentanilo, y la metadona están estructuralmente relacionados a la morfina, y algunos de ellos pueden tener incluso efectos adversos potenciados. Los opioides presentan diversos perfiles farmacocinéticos y terapéuticos, pero también efectos adversos. Se sugiere que estas diferencias se deben a la selectividad que tiene cada ligando hacia los diferentes receptores opioides. El desarrollo del analgésico “ideal” ha sido abordado desde diferentes perspectivas. El analgésico ideal sería aquel que permita un efecto analgésico eficiente y prolongado, con mínimos efectos adversos. Una prometedora opción para lograr este objetivo es el desarrollo de los llamados agonistas sesgados. Este efecto es el protagonista de este trabajo y se abordará a detalle más adelante.

La cristalografía de rayos X ha permitido la determinación de la estructura tridimensional de proteínas dando información clave en el rubro de la biología estructural. La resolución que se logra mediante esta técnica permite estudiar detalles estructurales a nivel atómico, como el reconocimiento molecular entre ligandos y biomacromoléculas y los procesos de activación de diversas proteínas. Esta información resulta útil para la farmacología, toxicología, bacteriología, entre otras disciplinas (Jacobson & Costanzi, 2012). Técnicas más recientes, como la criomicroscopía electrónica, permite obtener estructuras de sistemas moleculares complejos y de gran tamaño, aunque la resolución con la que se obtiene aún es un factor para mejorar. En este trabajo no se mencionará a más detalle sobre esta técnica, pero es de considerar que la determinación de la estructura tridimensional de proteínas en estos últimos años se ha orientado a la criomicroscopía (García-Nafría & Tate, 2020).

Nota:

Opioide es toda sustancia endógena o exógena que tiene afinidad por receptores opioides, mientras que opiáceo se refiere a la sustancia derivada del opio.

Según el “Reporte mundial de drogas 2019” de la Oficina sobre Drogas y Crimen de las Naciones Unidas (*UNODC*, por sus siglas en inglés), México representa el segundo lugar de producción de opio a nivel mundial con un 5.6%, después de Afganistán con el 86%. México se ubica como el principal distribuidor de opio en América, siendo el principal proveedor de heroína en la crisis de opioides en Estados Unidos y el alza de víctimas por sobredosis en las fronteras de EU y Canadá (United Nations, 2019). Sin embargo, el cultivo de amapola y venta de heroína se han visto disminuidos por el incremento en el uso de fentanilo en Estados Unidos, lo que dio lugar al término de “La última cosecha” (Le Cour Grandmaison et al., 2019), que hace referencia a la crisis económica en zonas marginadas donde se produce el opio, al perder territorio por la alta demanda de fentanilo que ingresa a Estados Unidos, proveniente de China. El uso de diversos opioides y opiáceos impacta fuertemente en la salud pública, no sólo por ser pioneros en el tratamiento del dolor en condiciones crónicas y neuropáticas, sino por los efectos secundarios adversos que producen. Resulta fundamental contribuir al entendimiento del funcionamiento, modulación y balance de estos efectos. En esta sección se resumen aspectos relevantes del agonismo en receptores opioides, así como de metodologías de modelado molecular empleadas en este trabajo.

2.1 Receptores acoplados a proteínas G, dolor y el receptor opioide μ (μ OR)

Los receptores acoplados a proteínas G (GPCRs, por sus siglas en inglés), conforman una superfamilia de receptores estructuralmente caracterizados por siete hélices transmembranales. Estos receptores están involucrados en una gran cantidad de procesos fisiológicos y representan entre el 30-40% de blancos moleculares de los medicamentos aprobados por la FDA (R. Santos et al., 2016). Los GPCRs también han sido investigados mediante técnicas de biología estructural, lo que permite sumar información sobre señalización, diversidad conformacional, entre otras características importantes asociadas a estas proteínas (Cong et al., 2015a; Liang & Tamm, 2016).

Dentro de los GPCRs se encuentran los receptores opioides, los cuales pertenecen a la clase A, la más grande de los GPCRs, también llamada familia de tipo rodopsina, dentro del sistema de clasificación GRAFS (Fredriksson et al., 2003). Una vez que un agonista se introduce en el sitio de unión, el receptor cambia su conformación del estado inactivo al activo, el cual permite e induce la interacción con un conjunto de proteínas intracelulares. Hasta ahora se han descrito y caracterizado tres receptores opioides; μ , δ y κ , aunque algunos autores también consideran al receptor de nociceptina NOP. La distribución de los receptores opioides predomina en el sistema nervioso, cerebro y columna vertebral, aunque también destaca su presencia en tejido cardiaco, pulmón, intestino e inclusive células mononucleares en sangre (**Figura 1**). La **Tabla 1** resume características y propiedades fisiológicas relevantes de los receptores opioides. Por otra parte, diversos procesos biológicos en los que participan los GPCRs han sido reportados (J. Hu et al., 2010; Oakley et al., 2000). Dentro de los receptores opioides, existen diversas estrategias que buscan abordar la problemática de los efectos adversos que producen. La dimerización de receptores opioides (L. Wang et al., 2018), los moduladores alostéricos y el agonismo sesgado son tópicos con amplio interés científico, que sin duda aumentan la posibilidad de hallar nuevas metodologías de ciencia aplicada con el objetivo de disminuir los efectos indeseados.

Tabla 1. Receptores opioides y características principales.

Receptor opioide	Efectos	Código PDB	Referencia
μ	Euforia, analgesia, confusión, depresión respiratoria, motilidad gastrointestinal reducida, retención urinaria, adicción	6DDE, 2018	(Koehl et al., 2018)
δ	Analgesia, desordenes de estado de ánimo	4N6H, 2013	(Granier et al., 2012)
κ	Analgesia, disforia, sedación, efectos psicomiméticos	4DJH, 2012	(Wu et al., 2012)

Efectos indeseados de cada receptor se encuentran subrayados

Nota:

El gobierno de Vancouver decidió proporcionar gratuitamente dosis de Nascar (naloxona) para disminuir el número de fallecidos por sobredosis de opioides.

Los ligandos naturales de estos receptores ya se han descrito, tales como las endorfinas, las endomorfina y las encefalinas, así como antagonistas (e.g. naloxona o naltrexona). Estos últimos son invaluable para contrarrestar la intoxicación por sobredosis de agonistas de opioides, por su alta afinidad con receptores opioides.

Los GPCRs se caracterizan por involucrar en su mecanismo de señalización a proteínas G heterotriméricas, las cuales son llamadas α , β y γ . En el caso de μ OR la subunidad α del complejo heterotrimérico es subtipo Gi. El mecanismo por el cual μ OR ejerce analgesia es a través de la liberación de las subunidades α , β y γ del complejo trimérico, inhibiendo así la proteína adenilato ciclasa. En consecuencia, se reduce el contenido intracelular de AMPc (Eguchi, 2004). De esta forma se afectan las funciones de la fosfocinasa C, la cual se encarga de fosforilar diversas proteínas para

ejercer funciones específicas como la traducción de genes. Además, las subunidades de la proteína G activadas, presentan acoplamiento a canales iónicos, lo que facilita apertura (en caso de canales de potasio) e inhibición (en caso de canales de calcio). Estas acciones reducen tanto la excitabilidad de la neurona (hiperpolarización por salida de K^+) como la liberación de neurotransmisores (inhibición de la entrada de Ca^{2+}).

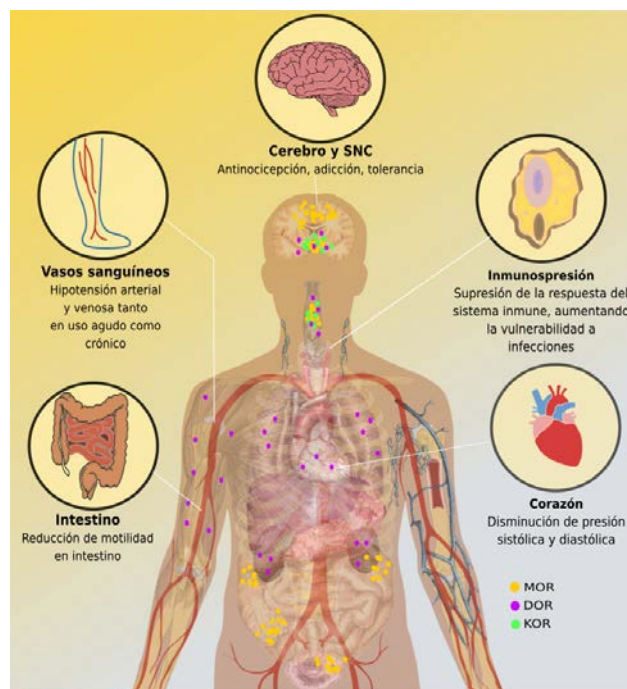


Figura 1. Opioides en el cuerpo. Efectos de opioides en algunos órganos, así como la distribución de sus receptores en tejidos (J. Peng et al., 2012; Schilling et al., 2015).

Con el objetivo de facilitar la numeración y el análisis de los GPCRs, Ballesteros y Weinstein (Ballesteros & Weinstein, 1995) desarrollaron un método esquemático que informa sobre posiciones relativas de cada aminoácido. Los identificadores de cada aminoácido se describen con una nomenclatura la cual consta de las siguientes características: cada identificador comienza con un número de las siete hélices transmembranales, seguido de la posición relativa referenciado al residuo más conservado de esa hélice. A ese residuo de referencia se le asigna el valor de 50. Por ejemplo, el residuo más conservado dentro de la hélice transmembranal 3 es una arginina, la cual tendrá como identificador 3.50, es decir $R^{3.50}$. Se puede relacionar el identificador con la numeración secuencial de un GPCR en específico adicionando el número de aminoácido seguido del identificador. Así, en el ejemplo anterior, quedaría como $R165^{3.50}$. A 6 residuos de esta arginina, en dirección al C-terminal, se encuentra una histidina, la cual se identifica como $H171^{3.56}$.

2.1.1 Tolerancia y desensibilización en μ OR

Los efectos adversos de los opioides, tales como depresión respiratoria, tolerancia (Pasternak & Pan, 2013), adicción, constipación, náusea, entre otros, siguen siendo un reto en su uso clínico. Diversos grupos de investigación han tratado de determinar a nivel molecular, las causas de dichos efectos (Allouche et al., 2014; Listos et al., 2019). La tolerancia se puede definir como una pérdida de respuesta a un agonista después de una exposición continua. Este fenómeno se ha asociado con la desensibilización de μ OR. Los términos de desensibilización y tolerancia son frecuentemente usados de manera intercambiable para describir la pérdida de la actividad de un receptor después de un tratamiento continuo con agonista, pero cabe destacar que la desensibilización involucra un cambio molecular a nivel de la señalización del receptor. En caso de μ OR, la desensibilización sucede al momento de que las cinasas de receptor acoplado a proteína G (GRK, por sus siglas en inglés) fosforilan de manera sitio-específica al dominio intracelular de μ OR. Estas fosforilaciones aumentan la selectividad de β -arrestina2 hacia el dominio intracelular de μ OR, permitiendo su unión y bloqueando la interacción del receptor activado con la proteína G. Una vez que la β -arrestina2 se une al receptor, se promueve su internalización para su reciclaje o degradación (Tian et al., 2014).

2.1.2 Agonismo sesgado en μ OR

Diversos estudios termodinámicos y farmacológicos indican que los receptores adoptan múltiples conformaciones al ser activados. La dinámica conformacional de los GPCRs conlleva a una gama de estados conformacionales con una energía asociada (Vincent J. Hilser et al., 2006), de los cuales algunos conducen al acoplamiento con proteínas intracelulares, como las proteínas G u otras proteínas efectoras. Puede entenderse entonces que los ligandos de receptores modifican el estado variable de alosterismo en la proteína, induciendo y fijando el complejo ligando-proteína en estados funcionalmente relevantes y con una conformación específica en el plano energético (Kobilka & Deupi, 2007).

Se define un agonista sesgado como aquel que dirige la cascada de señalización del GPCR hacia una ruta específica (Kenakin, 2011). Si bien es un concepto que tiene cabida en la superfamilia de GPCRs (Gesty-Palmer et al., 2006), en este trabajo se destaca su incidencia en receptores opioides, particularmente en μ OR. Los trabajos que caracterizan al agonismo sesgado dentro de μ OR datan de 1999, donde se observó que ratones *knockout* de β -arrestina2 presentaron un mayor efecto analgésico al ser tratados con morfina (Bohn et al., 1999). Se ha reportado recientemente que los efectos de constipación, depresión respiratoria y tolerancia también se ven disminuidos en ratones con mismo perfil de *knockout* (Connor et al., 2015; Raehal et al., 2005). Estos hallazgos han estimulado la búsqueda de opioides sesgados hacia efectos analgésicos mediados por la ruta dependiente de proteína G, puesto que varios de los efectos adversos se han

relacionado con señalización de β -arrestina2. En la sección de **Antecedentes** se describen análisis recientes basados en estas premisas.

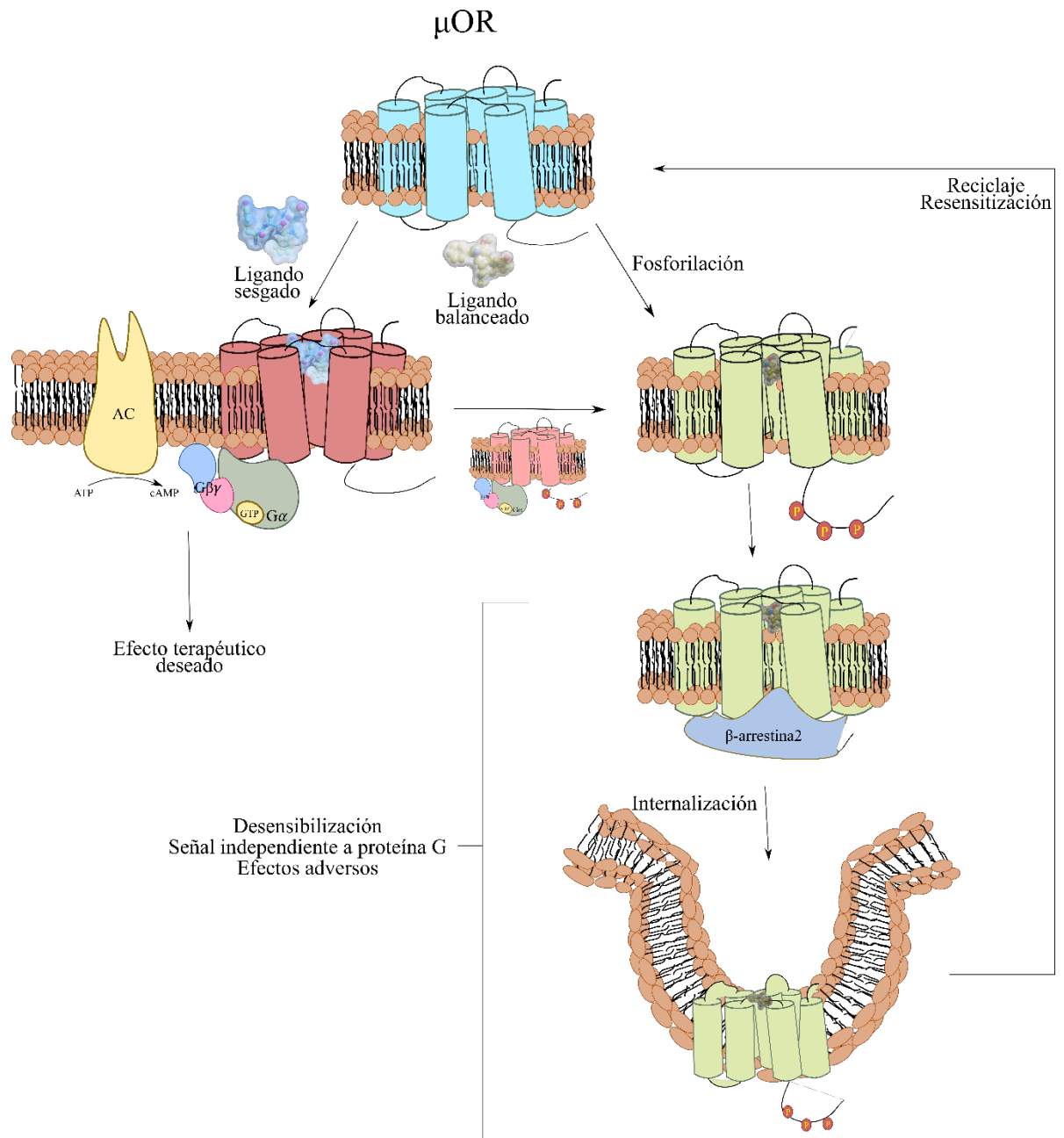


Figura 2. Agonismo en μ OR por agonistas sesgados y balanceados. Se inicia con el estado inactivo del receptor, previo a ser activado, ya sea por un ligando sesgado o balanceado. La activación del receptor puede verse diferenciada por el cambio de color. Imagen diseñada por Bruno Hernández.

2.2 Modelado molecular de sistemas biológicos

Nota:

Las grandes barreras que ha roto el modelado y la simulación molecular son: posibilidad de tiempos de muestreo mayores, programación en paralelo con procesadores de propósito general, Graphics Processing Units (GPU), exactitud de los campos de fuerza y muestreo acelerado

Diversas técnicas de modelado molecular son utilizadas para el entendimiento de la estructura y función de sistemas biológicos. Estas técnicas, utilizadas desde el finales de los 70's (Kuntz et al., 1982; McCammon et al., 1977), han atraído la atención de diversos grupos de investigación por la disponibilidad de software, bajos costos y velocidad que proporcionan (Dror et al., 2012). En el campo de los GPCRs, el modelado molecular es una herramienta muy valiosa. Por ejemplo, debido a la similitud entre las proteínas de la superfamilia, ha sido posible generar modelos usando la técnica de modelado por homología. Esto ha dado lugar a la creación de servidores eficientes como GPCR-I-TASSER (J. Zhang et al., 2015) o GPCRM (Miszta et al., 2018) para la producción de modelos de estos receptores.

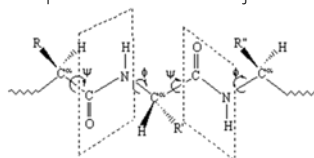
En los métodos de modelado molecular basados en ‘Campos de fuerza’, los átomos son tratados como partículas que obedecen las leyes de la mecánica clásica. Esto hace que el costo computacional sea menor que el requerido para cálculos de mecánica cuántica, permitiendo con ello estudiar sistemas con un número de átomos mucho y con tiempos de simulación también mayores (Vanommeslaeghe et al., 2014). En la mecánica molecular, los átomos se consideran esferas con carga que se conectan con resortes. La función del campo de fuerza es calcular, mediante aproximaciones, la energía potencial de cada átomo. En general, es una suma de términos energéticos intra- e intermoleculares (Ecuación 1).

$$V = \sum_{\text{enlaces}} K_b(b - b_0)^2 + \sum_{\text{angulos}} K_\theta(\theta - \theta_0)^2 + \sum_{\text{dihedro}} K_X(1 + \cos(nX - \delta)) \\ + \sum_{\text{pares } ij} \frac{q_i q_j}{\epsilon r^{(ij)}} + \sum_{\text{pares } ij} \left(\frac{C_{(12)}^{(ij)}}{r^{(ij)}} \right)^{12} - \left(\frac{C_{(6)}^{(ij)}}{r^{(ij)}} \right)^6$$

Ecuación 1. Fórmula general de un campo de fuerza. Los términos intramoleculares se describen por los términos de potencial de enlace, ángulos y ángulos diedros, mientras que el aporte de los términos intermoleculares se describe por las interacciones de Van der Waals y el potencial electrostático de Coulomb. K_b , K_θ y K_X son las constantes de fuerza de enlace, de ángulo y de torsión, las cuales varían dependiendo del campo de fuerza que se elija. b , θ y X son longitud de enlace, ángulo de enlace y ángulo diedro, r es la distancia interatómica, mientras que C_{12} y C_6 son términos de repulsión y atracción, respectivamente, dependientes de los átomos i, j . ϵ es la constante dieléctrica del medio.

Nota:

El ángulo diedro τ_{ijk} de la serie de átomos unidos i-j-k-l es el ángulo formado entre la normal del plano de átomos i-j-k y la normal del plano de los átomos j-k-l



En el caso del estudio de interacciones ligando-receptor, se han desarrollado y aplicado diversas técnicas computacionales basadas en campos de fuerzas (Drie, 2007). En las siguientes secciones se hablará sobre una de las técnicas más utilizadas, tanto en la industria como en la investigación dentro de las herramientas usadas para el diseño de fármacos basados en la estructura del receptor (SBDD), acoplamiento molecular (docking). Además, se describe la técnica computacional más usada para simular el comportamiento dinámico de sistemas moleculares a través del tiempo: Dinámica molecular.

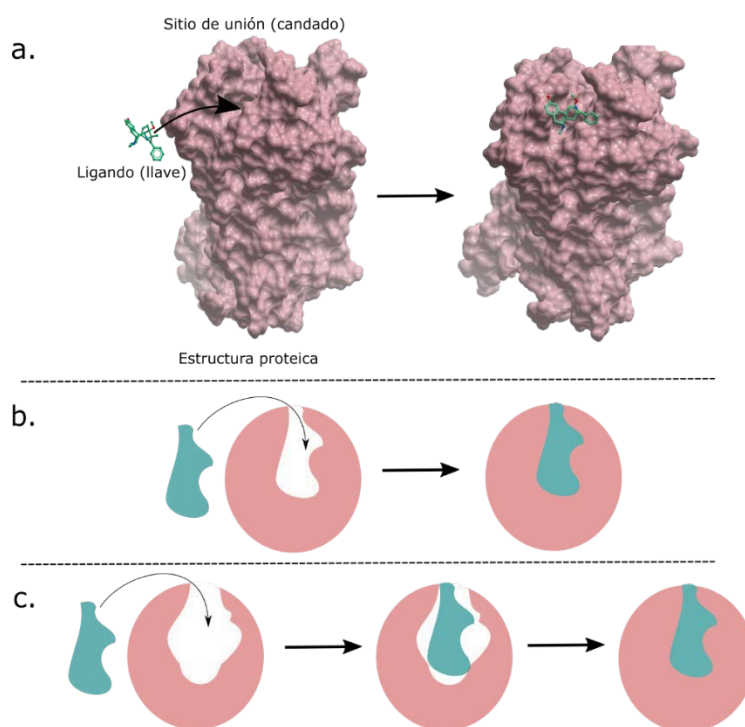
2.2.1 Docking o Acoplamiento molecular

El acoplamiento molecular automatizado es ampliamente utilizado por empresas e investigación (Bajorath, 2002; Kitchen et al., 2004), ya que provee de información de la interacción entre una molécula pequeña y una proteína, a nivel atómico. El procedimiento involucra dos pasos básicos: predecir la conformación del ligando o molécula pequeña dentro de una cavidad de interés en una proteína (referido como *pose*) y estimar la energía de dicho complejo, y con ello proponer un puntaje relacionado con la afinidad de unión. Estas etapas son obtenidas a través de métodos de muestreo y funciones de puntuación, respectivamente (Meng et al., 2012). En general, para tener un complejo ligando-receptor estable, la conformación de unión debe alcanzar un mínimo energético, lo que maximiza las interacciones favorables y minimiza las no favorables (Neves et al., 2012).

2.2.1.1 Docking rígido

Este método mantiene fijos a todos los aminoácidos de la proteína y se basa en el modelo de llave y cerradura, propuesto por Fischer en 1894 (Figura 3.b). Para cada ligando analizado se explora su posición y conformación dentro de la región proteica seleccionada (Salmaso & Moro, 2018). Al imaginar al ligando como una llave y a la proteína como un candado, la idea se vuelve bastante simple, aunque muy poderosa.

Figura 3. Docking rígido. En rosa se ilustra la estructura proteica con representación de superficie. En verde, un ligando con afinidad al sitio de unión de la proteína. a. Acoplamiento del ligando dentro del sitio activo. b. Modelo de llave- cerradura de Fischer. c. Modelo de ajuste inducido.



El docking rígido es el método de elección para el cribado virtual de bibliotecas que contienen un gran número de compuestos. Sin embargo, cuando los ligandos son muy flexibles, grandes o el sistema biológico depende funcionalmente de su diversidad conformacional (como es el caso de las cinasas) es preferible utilizar métodos que permitan cierto grado de libertad conformacional de la macromolécula (Wei et al., 2016). Este tipo de métodos son llamados docking flexible y están disponibles en diversos programas de modelado molecular.

2.2.1.2 Docking flexible

El docking flexible se basa en la premisa del “ajuste inducido” (Figura 3.c), propuesta por Koshland (Koshland, 1963), que estipula que el sitio activo de las proteínas modifica su forma por las interacciones que tiene con ligandos. El número de grados de libertad aumenta, haciendo que el esfuerzo computacional requerido sea mayor. Por consecuencia, es imprescindible contar con algoritmos de muestreo y de puntaje que permitan converger en un tiempo no muy amplio, ya que, en los estudios de cribado virtual, el número de moléculas a procesar puede ser del orden de millones (Kitchen et al., 2004). Se ha visto que el docking flexible, aparte de predecir el modo de unión de una manera más acertada que el docking rígido, también mejora la precisión de la predicción de afinidad de unión (Verkhivker et al., 2000).

2.2.1.3 ICM y MOE

En este trabajo, se utilizaron dos programas: *Internal Coordinates Mechanics-Pro* (ICM-Pro) de Molsoft y *Molecular Open Environment 2019* (MOE) de Chemical Computing Group. La **Tabla 2** muestra las principales diferencias de la metodología que usan, enfocado principalmente a las herramientas utilizadas.

Tabla 2. Características de los programas de cómputo ICM-Pro y MOE v2019

	ICM	MOE
Sistema de referencia	Coordenadas internas	Coordenadas 3D cartesianas
Licencia	Anual	Anual
Campo de fuerza	MMFF para moléculas pequeñas, ECEPP/3 para péptidos	MMFF94x para moléculas pequeñas, Amber 99 para péptidos
Algoritmo de acoplamiento	Monte Carlo y criterio Metrópoli	Triangle matcher, Alpha triangle, Flex, etc...
Funciones de puntaje	Funcion ICM (Totrov & Abagyan, 1999)	London dG, Alpha HB

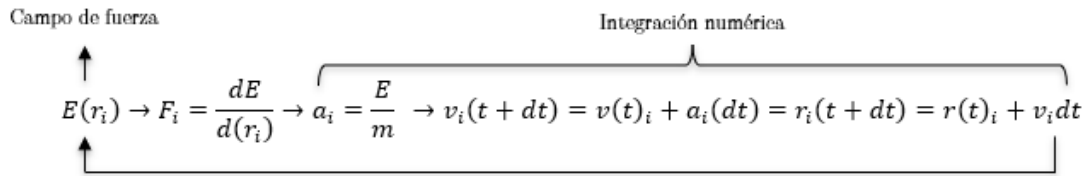
Tanto ICM como MOE han tenido diversos casos de éxito. Algunos destacables es que ICM ha ganado el primer lugar dos veces consecutivas en el reto D3R¹, el cual es una evaluación mundial de docking ciego, de los cuales se exhiben las estructuras cristalográficas una vez se ha terminado el reto. Por otra parte, MOE ha recibido diversos reconocimientos por la *American Chemical Society* por su aporte a la química medicinal, alcanzó las 1740 citas en 2019 y ha formado parte de más de 400 patentes.

2.2.2 Dinámica molecular

Dentro del rubro de la simulación de sistemas biológicos a nivel atómico, una herramienta de uso frecuente es la dinámica molecular. Los principios teóricos que fundamentan esta simulación se basan en la mecánica clásica (leyes de movimiento de Newton) y el cálculo de fuerza, derivado de la ecuación de potencial de campo de fuerza (mecánica newtoniana)(**Ecuación 2**). Una vez calculados estos dos parámetros en cada uno de los átomos del sistema, se puede integrar la ecuación de movimiento

¹ Consultar el reto en www.drugdesigndata.org/about/grand-challenge

numéricamente para obtener las aceleraciones y velocidades y, por consiguiente, nuevas posiciones atómicas (Hospital et al., 2015).



Ecuación 2. Algoritmo básico de simulación de dinámica molecular. Donde E = Energía potencial, r_i = vector de posición del átomo i, F_i = Fuerza del átomo i, a_i = aceleración del átomo i, m = masa, v_i = velocidad del átomo i, t = tiempo.

Al realizar iterativamente este cálculo, se produce una representación que traza las posiciones de los átomos a través del tiempo, influenciada por la energía y fuerza que involucra cada átomo (Hollingsworth & Dror, 2018).

Nota:
20-30% del genoma codifica proteínas de membrana.

La poca trivialidad del manejo de proteínas de membrana aunado a su importancia dentro de la biología y la farmacología, han hecho de gran atractivo su estudio mediante simulaciones de dinámica molecular. Aunado a esto, estas simulaciones son considerablemente accesibles para la comunidad científica gracias al desarrollo de la tecnología, costos modestos y algoritmos con mayor eficiencia (Salomon-Ferrer et al., 2013).

Se han descrito aspectos de la farmacodinamia y farmacocinética de los opioides, puesto que caracterizar y reducir los efectos adversos de agonistas de esta naturaleza ha sido de gran interés para la comunidad científica y la industria farmacéutica². En esta sección se destacan los últimos avances científicos que aportan conocimiento a describir el agonismo sesgado en μ OR y metodologías computacionales empleadas con el mismo fin.

3.1 Agonismo sesgado

El fenómeno del agonismo sesgado en μ OR lleva más de 20 años bajo investigación, y diversas técnicas computacionales, en conjunto a trabajo experimental, han permitido avanzar en el entendimiento de este fenómeno. Algunos trabajos reportados (Domazet et al., 2015; McCorvy et al., 2018; H. Zhang et al., 2015) han hecho énfasis en el papel que tienen los residuos W318^{7.35}, W293^{6.48} y Y326^{7.43} como involucrados en la señalización a proteína G. Estudios experimentales de mutación sitio específica mostraron que mientras la actividad de reclutamiento de β -arrestina2 de μ OR mutante Y326F resultaba indetectable con Tyr-D-Ala-Gly-N-Me-Phe-Gly-ol (DAMGO), aunque con endomorfina-1 aumentaba (Hothersall et al., 2017). Además, se observaba un efecto invertido en la mutación W318A (aumento de reclutamiento de β -arrestina2 para DAMGO y disminución para endomorfina-1). Más adelante, Cheng y colaboradores (Cheng et al., 2018) realizaron estudios de dinámica molecular con TRV-130, donde identificaron una mayor estabilidad de W293^{6.48}, además de una menor distancia promedio con Y326^{7.43}. Cabe destacar que W293^{6.48} se considera un residuo clave en la activación de μ OR (Huang et al., 2015b) por lo que los resultados recientes nos muestran que el agonismo sesgado no solo involucra residuos puntuales, sino un proceso complejo que comprende desde múltiples interacciones hasta un cambio conformacional conjunto (Suomivuori et al., 2020).

² La empresa estadounidense Trevena, Inc. fue fundada a partir de prometedores agonistas opioides sesgados tales como oliceridina (TRV-130), la cual fue recientemente aprobado por la FDA.

Bermudez y colaboradores exponen otro punto de vista sobre el agonismo sesgado con un enfoque más general. A través de observaciones de algunos ligandos sesgados cristalizados junto con diversos GPCRs, que incluyen a M₂R (Bermudez et al., 2017), 5-HT_{2B}R (McCorvy et al., 2018) y β₂AR (Ring et al., 2013), además de estudios de docking de sistemas similares, han observado que los ligandos sesgados presentan una estructura extendida que permite interactuar con el sitio ortostérico, pero además, restringiendo el espacio conformacional de la región extracelular. Esto parte de las observaciones de criomicroscopía electrónica (Capper & Wacker, 2018) y cristalografía de rayos X (Devree et al., 2016), que una vez que un agonista de GPCR se dispone en el sitio ortostérico, ocurre una disminución del volumen del sitio de unión, lo que produce una *trampa* momentánea del ligando. Dicho esto, se hipotetiza que una interacción extendida de los ligandos desde el sitio de unión hasta la región extracelular del receptor podría conferir facultades de agonismo sesgado (Bermudez et al., 2019).

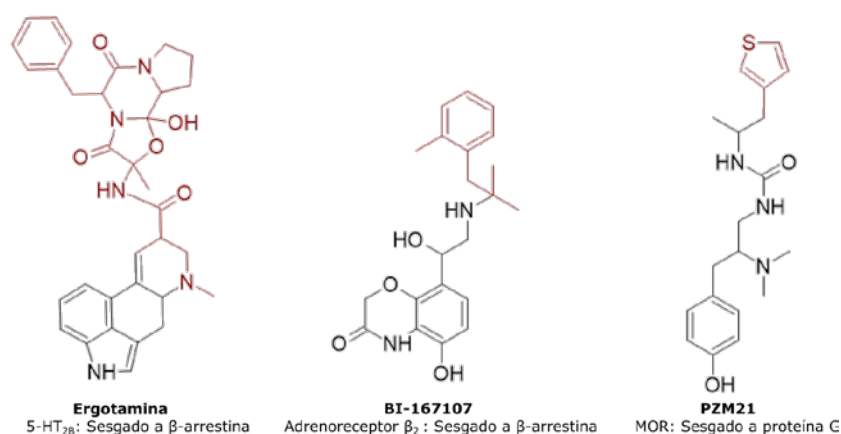


Figura 4. Ejemplos de ligandos sesgados con modos de unión extendidos.

Lo trazado en negro indica los átomos que interaccionan con semejanza a ligandos no-sesgados, mientras que las extensiones de los ligandos, que interactúan con regiones extracelulares del receptor se trazan en rojo.

Hasta ahora, ningún analgésico opioide sesgado ha logrado su comercialización, pero se han podido hallar nuevos compuestos que presentan, en diferente medida, agonismo sesgado hacia la ruta de proteína G en μOR. Dentro de ellos, se encuentran mitraginina (Kruegel et al., 2016), PZM21 (Manglik et al., 2016), oliceridina (DeWire et al., 2013), herkinorina, la serie de compuestos de tipo *N*-bencilpiperidina (*vide supra*), entre otros. Se describirán únicamente los agonistas que competen en este trabajo, sin embargo, se puede encontrar información sobre agonistas sesgados en μOR en la revisión de Madariaga-Mazón et al., 2017.

3.1.1 Herkinorina

Nota:

El primer aislamiento publicado de Salvinorina A se realizó en el Instituto de Química, a cargo del Dr. Alfredo Ortega en 1982

Herkinorina fue uno de los primeros agonistas sesgados a proteína G (Groer et al., 2007). Es un derivado de Salvinorina A (Harding et al., 2005), un agonista selectivo al receptor opioide κ (κ OR). Salvinorina A fue obtenida a partir de la planta alucinógena *Salvia divinorum* (Ortega et al., 1982), utilizada por los indígenas de la Sierra Mazateca para rituales espirituales. Se generó gran interés en herkinorina por su agonismo y señalización hacia proteína G, no causar reclutamiento de β -arrestina ni promover internalización del receptor (Groer et al., 2007) además de que, tanto salvinorina A como herkinorina carecen de nitrógenos en su estructura, lo que rompió el paradigma de la necesidad de una amina ionizada dentro de los ligandos opioides. Sin embargo, la poca solubilidad y falta de respuesta analgésica en modelos *in vivo* de herkinorina redujeron sus posibilidades como candidato a fármaco.

Existen pocos trabajos publicados sobre el modo de unión de herkinorina en μ OR. Frecuentemente se hace la extrapolación hacia herkinorina a partir de datos de salvinorina A, que tiene mayor investigación tanto experimental como computacional. De los primeros modelos de salvinorina A (Kane et al., 2006) identifican un grupo de residuos en KOR como Q115^{2.60}, Y119^{2.64}, Y313^{7.36} y Y320^{7.43} (Q124^{2.60}, Y128^{2.64}, H319^{7.36} y Y326^{7.43} en μ OR), lo que significa que el ligando se encuentra dentro del sitio ortostérico. Por otra parte, estudios más recientes difieren en la posición y orientación del grupo furano y C2. En la sección 6.1.4, se realiza un análisis considerando las diferentes propuestas.

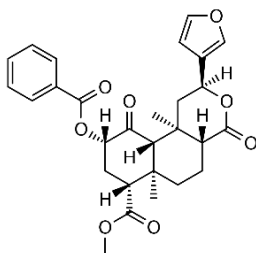


Figura 3. Estructura molecular de herkinorina

3.1.1.1 Sitio alostérico del átomo de sodio

Uno de los hallazgos importantes en el estudio de los GPCRs es un sitio alostérico conservado que aloja un ion sodio (W. Liu et al., 2012; Yabaluri & Medzihradsky, 2002). Los primeros estudios realizados sobre este sodio alostérico mostraron que tenía un efecto modulador negativo hacia la unión de agonistas, sin afectar la afinidad de antagonistas (Pert et al., 1973). Por otra parte, estudios de mutagénesis sugirieron que el sitio alostérico del ion sodio tenía un papel importante en la señalización de agonistas (W. Xu

et al., 1999). Su importancia se extendió hasta el punto de caracterizar su unión a través de cristalografía, permitiendo identificar el *cluster* de interacción entre moléculas de agua, el ion sodio alostérico y su sitio de unión (Fenalti et al., 2014; Miller-Gallacher et al., 2014; C. Zhang et al., 2012). Un posible mecanismo de la trayectoria del ion sodio dentro de la activación de GPCRs se puede encontrar en el **Anexo A**.

El sitio de ion sodio alostérico también está relacionado con el agonismo sesgado. Una vez que sucede la traslocación del sodio (X. Hu et al., 2019) debido a que el sitio ortostérico disminuye su volumen, los residuos de este sitio (N^{3.35}, D^{2.50} y S^{3.39}) prescinden de su interacción con el ion sodio. Estudios de mutación en el receptor opioide δ (DOR) mostraron que la mutación D^{2.50}A transformaba antagonistas clásicos a DOR como naltrindiol a agonistas sesgados hacia β -arrestina2. Además, este mismo estudio reveló que las mutaciones N^{3.35}V y N^{3.35}A disminuían y anulaban (respectivamente) los efectos alostéricos del sodio hacia agonistas y antagonistas (*vide infra*) pero también aumentaban la actividad constitutiva del receptor hacia β -arrestina2 (Fenalti et al., 2014).

Se ha hipotetizado sobre la función del sitio alostérico del ion sodio en la señalización sesgada. Estudios de dinámica molecular apuntan hacia un modo de unión de herkinorina en el cual el grupo C2-benzoiloxi se orienta hacia el sitio alostérico del ion sodio (Marmolejo-Valencia & Martínez-Mayorga, 2017). Esto sugiere un mecanismo característico de agonistas sesgados.

3.1.2 Compuestos tipo *N*-bencil piperidina 4-benzimidazolona

Nota:

Los compuestos de *N*-bencil piperidina 4-benzimidazolona son los primeros compuestos en tener soporte de significancia estadística al poseer agonismo sesgado en ensayos in-vitro

En 2017, a través de estudios de relación estructura-actividad, Schmid y colaboradores sintetizaron una serie de compuestos con un núcleo de *N*-Bencil piperidina 4-benzimidazolona (NBPB) (**Figura 6**) con el objetivo de evaluar su agonismo sesgado en μ OR hacia proteína G o β -arrestina2 (Schmid et al., 2017).

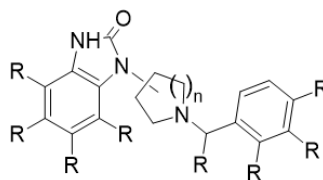


Figura 4. Núcleo *N*-bencil piperidina 4-benzimidazolona. Se pueden consultar los diferentes grupos R en la **Tabla 8**, sección de **¡Error! Marcador no definido**. Resultados y discusión.

Para cuantificar el grado de señalización sesgada, calcularon un *factor de sesgo*, el cual basa su resultado en los valores experimentales obtenidos de ensayos *in vitro* de

señalización hacia proteínas efectoras (Kenakin et al., 2011). Esta estrategia tiene como fundamento el modelo operacional (Black & Leff, 1983), el cual permite involucrar la potencia relativa y la eficacia de un agonista prueba contra un agonista de referencia. La forma del factor de sesgo se muestra en la **Ecuación 3**.

$$= 10^{\Delta \log\left(\frac{\tau}{K_A}\right)_{(Ensayo1)} - \Delta \log\left(\frac{\tau}{K_A}\right)_{(Ensayo2)}}$$

Ecuación 1. Factor de sesgo. τ es definido como la eficacia del agonista. K_A es la constante de disociación al equilibrio, $\text{Log}(\tau/K_A)$ es el coeficiente de transducción, el ensayo a evaluar se vuelve ensayo de señalización a proteína G y ensayo de señalización a β -arrestina2

En el concepto de agonismo sesgado en μOR , el factor de sesgo es una medida cuantitativa de la separación de las rutas de señalización en cada ligando en comparación a un agonista completo (DAMGO es comúnmente empleado como agonista de referencia), donde un factor de sesgo de uno indica un compuesto sin sesgo relativo a DAMGO, factor de sesgo menor a uno indica un sesgo hacia el reclutamiento de β -arrestina2 sobre el ensayo de señalización a proteína G. Por último, un factor de sesgo mayor a uno, indica un sesgo hacia la señalización de proteína G (Schmid et al., 2017). En el **Anexo A** se puede consultar más sobre el factor de sesgo y el modelo operacional. Los estudios de Schmid y colaboradores hallaron compuestos con grandes factores de sesgo, además de resultados favorables sobre su estabilidad microsomal e inhibición a CYP450. Sin embargo, al momento de escribir este trabajo, no se encuentra información publicada sobre las características estructurales de cómo actúan estos compuestos con μOR , ni sobre las facultades que los hacen desencadenar preferentemente la vía de proteínas G sobre el reclutamiento de β -arrestina2.

Para contribuir en el entendimiento del agonismo sesgado en μOR nos planteamos la siguiente hipótesis.

3.2 Hipótesis

Los patrones de interacción ligando-receptor en MOR permiten distinguir entre ligandos balanceado (morfina) y ligandos sesgados (herkinorina, C44), y pueden ser identificados en simulaciones de dinámica molecular.

4.1 Objetivo general

Desarrollar modelos moleculares de agonistas sesgados selectos como herkinorina y compuesto 44 y describir las diferencias con un agonista balanceado de referencia, a través del uso de herramientas computacionales, con la finalidad de contribuir al entendimiento de la selectividad funcional en el receptor opioide μ

4.2 Objetivos específicos

Generar y proponer un modo de unión común entre los agonistas sesgados (herkinorina y compuesto 44) e identificar diferencias en su perfil de interacción con un agonista balanceado (morfina)

Analizar las conformaciones que adopta μ OR con diferentes ligandos (herkinorina, compuesto 44 y morfina) mediante agrupamiento (*clustering*) y Análisis de Componentes Principales.

Se realizó un docking molecular por triplicado de un grupo de 63 moléculas de núcleo (NBPB) con evidencia experimental de agonismo a μ OR, además de datos sobre su señalización sesgada en este receptor. Una vez obtenidos los modelos y validar la metodología de docking, se escogió la orientación de las moléculas estudiadas: herkinorina, morfina y compuesto 44 (C44). La **Figura 7** muestra el resumen metodológico.

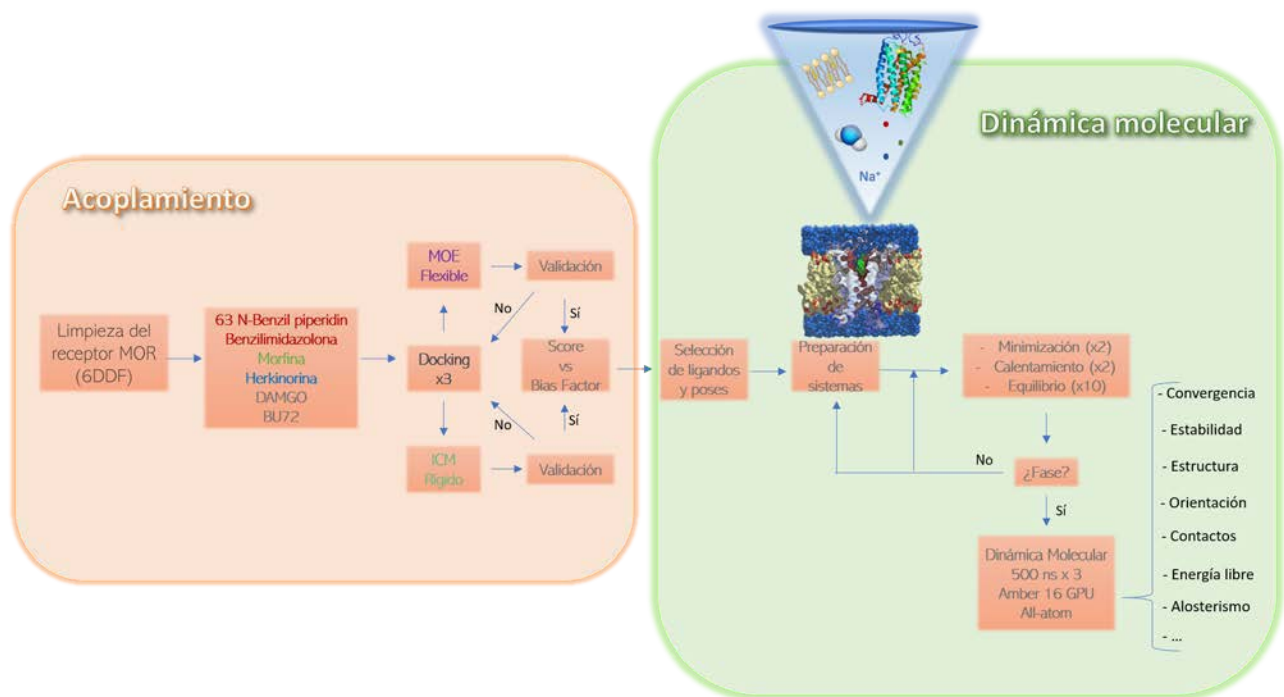


Figura 5. Diagrama de flujo de la metodología realizada a lo largo del proyecto de maestría.

5.1 Búsqueda y selección del receptor opioide Mu

Actualmente se cuenta con las estructuras de los tres receptores opioides, depositados en el *Protein Data Bank* (PDB). En el caso de μ OR, existen tres diferentes conformaciones, dos de ellas en estado activo (con un agonista en el sitio ortostérico, PDBs: 5C1M, 6DDE), y una en estado inactivo (unido covalentemente a un antagonista, PDB: 4DKL). Se seleccionó el modelo estructural de μ OR en su conformación activa más reciente (PDB: 6DDE, 2018), ya que tiene características que lo diferencian de sus

predecesores. Comparándolo con el modelo estructural del receptor en estado inactivo (PDB: 4DKL, 2012), existe un movimiento característico de los GPCRs de la familia A, el cual incluye diferencias en la orientación de las fracciones intracelulares de las hélices transmembranales (TM) 5 y 6 (TM5 y TM6, respectivamente)(**Figura 8**). Debido a que la activación del receptor es un paso previo a la interacción con las proteínas intracelulares, se decidió utilizar un modelo estructural activo.

Entre los dos modelos activos disponibles (6DDE, 2018 y 5C1M, 2015), se optó por el más reciente debido a que dicho modelo, a pesar de tener una menor resolución (3.5 Å contra 2.4 Å) se determinó junto al complejo heterotrimérico G_i , lo que aporta un mejor acercamiento hacia la realidad de lo que compete al tema de estudio de esta tesis.

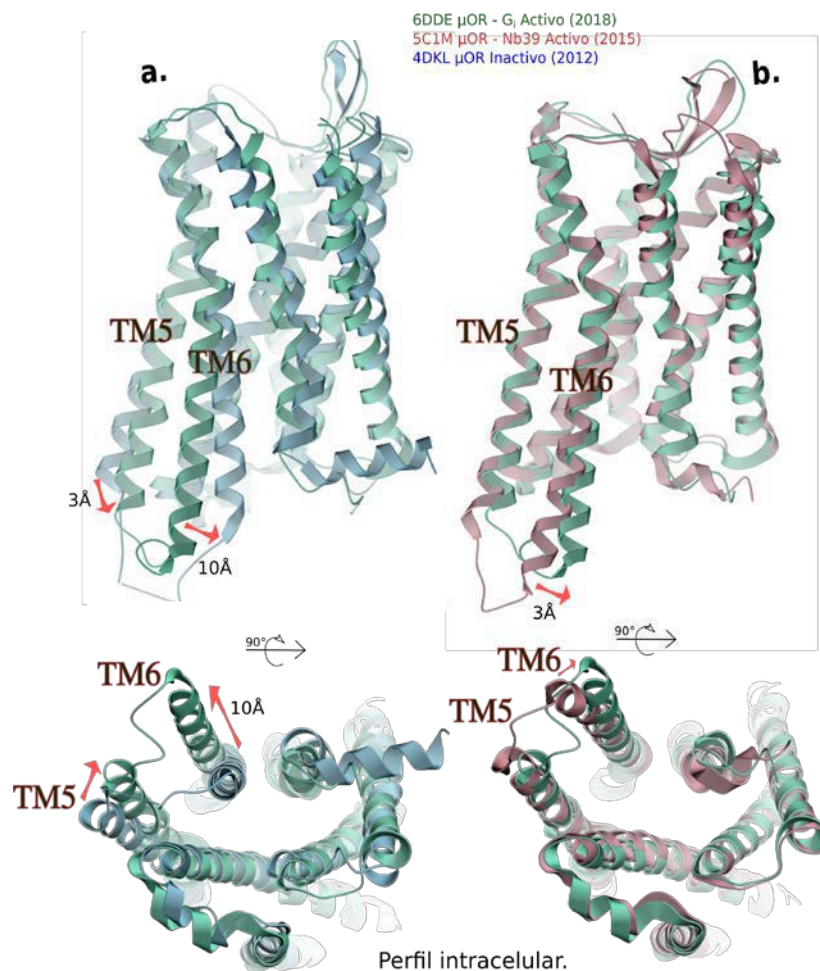


Figura 8. Estructuras depositadas en el PDB de μ OR. a. Comparación del estado inactivo de μ OR inactivo (azul) y el estado activo estabilizado por proteína G_i (verde). b. Comparación del estado activo estabilizado por nanocuerpo Nb-39 (rosa) y proteína G_i (verde). Las estructuras resultan similares a excepción de los desplazamientos de TM5 y TM6.

5.1.1 Limpieza y Verificación

Una vez seleccionado el modelo estructural, se procedió con la limpieza de éste, la cual consistió en eliminar todos aquellos componentes (cadenas diferentes, iones, agua, etc.) que no fueran el receptor opioide y el ligando (en este caso, DAMGO). Se extrajeron del modelo las cadenas de aminoácidos de la proteína G, así como moléculas auxiliares para la estabilidad del receptor y moléculas de agua. Después, se procedió a verificar aminoácidos faltantes en el modelo estructural que sean determinantes en el fenómeno a observar. En este caso, los residuos que tengan cabida en la interacción ligando-receptor deben encontrarse completos en el modelo. Algunos residuos del N-terminal no fueron determinados experimentalmente por su alta movilidad, por lo que se contempló el modelado de este extremo N-terminal, sin embargo, de acuerdo con la literatura reportada, los residuos de este extremo que pueden estar haciendo interacción con el ligando en el sitio activo no tienen relevancia fisiológica, además de que no son altamente conservados y su mutación no tiene implicación en la afinidad ni en la potencia frente a diversos ligandos (Galés et al., 2006; Huang et al., 2015a). Además, se verificó que no existieran choques en los átomos del modelo y que los ángulos diedros φ y ψ del modelo de μ OR estuvieran dentro de los valores comunes.

5.2 Acoplamiento molecular o Docking

5.2.1 Docking en ICM y MOE

En la **Figura 9** se muestra el procedimiento utilizado en ambos paquetes de software para obtener las poses de cada uno de los ligandos y controles.

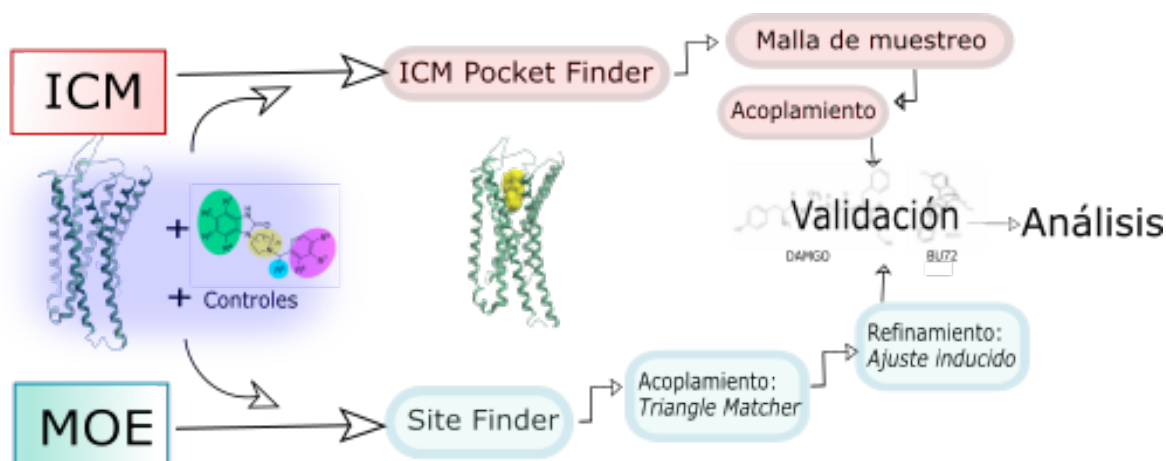


Figura 9. Procedimiento general para la realización del acoplamiento molecular en ambos softwares, ICM y MOE. Dentro de la lista de ligandos, se introducen los controles a considerar, ya que estos se utilizarán en la validación del procedimiento.

Se realizó por triplicado una serie de acoplamientos moleculares de las 63 moléculas NBPB (**Tabla 8**), hacia el sitio activo del receptor. Se incluyeron 2 controles para realizar la validación, DAMGO (ligando co-cristalizado en 6DDE) y BU72 (Ligando co-cristalizado en 5C1M). Los ligandos y controles fueron construidos en Spartan 14³.

Para definir el sitio activo en ICM se utilizó la función ICM Pocket Finder (Sheridan et al., 2010). La posición y el tamaño de la cavidad se determinan basados en la transformación del potencial de Lennard-Jones, lo que involucra el volumen, el área, y la hidrofobicidad (An et al., 2005), permitiendo obtener un puntaje final a cada una de las cavidades que el algoritmo encuentra plausibles. A diferencia de ICM, MOE utiliza Site Finder el cual pertenece a la categoría de métodos geométricos ya que no utiliza modelos energéticos. Utiliza esferas alfa (Park et al., 2006) para determinar áreas muy expuestas al solvente, identifica sitios de agua para filtrarlos y hace clusters de las esferas más cercanas.

El procedimiento de acoplamiento en MOE se obtuvo a través de dos etapas, en la primera se realizó un acoplamiento rígido mediante el algoritmo de *Triangle Matcher* (**Anexo B**), y un refinamiento con ajuste inducido, el cual permite realizar pequeñas variaciones en las posiciones de las cadenas laterales de los residuos del sitio activo, con el objetivo de mejorar la función de puntaje. Tanto para el acoplamiento como el refinamiento, la función de puntaje utilizada fue *London dG* (**Anexo B**). Se realizaron tres repeticiones para cada ligando.

El algoritmo de acoplamiento de ICM usa optimización de energía global basado en minimización por Monte Carlo, que explora el espacio conformacional del ligando dentro de las vecindades limitadas por una malla predefinida por el usuario. Una serie de potenciales de malla son calculados dentro de la malla dibujada, con un espaciado de 0.5 Angstroms. Entre ellos se encuentra el potencial de Van der Waals para enlaces de hidrógeno, potencial electrostático y potencial de hidrofobicidad (Abagyan et al., 1994).

Una vez definido el sitio de unión con *ICM Pocket Finder*, se trazó una caja donde se le indica al software sobre el sitio de muestreo. La función de puntaje de ICM (Totrov & Abagyan, 1999) es ponderada de acuerdo con parámetros como (i) pérdida de entropía del ligando entre los estados de unión y libre, (ii) interacciones de tipo enlace de hidrógeno entre el ligando y el receptor, (iii) desolvatación de donadores y aceptores de puentes de hidrógeno, y (iv) energía de hidrofobicidad.

³ Se puede consultar sobre el programa Spartan 14' en <https://www.wavefun.com/>

Antes de proseguir al análisis de los modos de unión, se realizó una validación del acoplamiento por *redock*, la cual consiste en comparar la pose obtenida en el acoplamiento de los controles contra la orientación que tienen en el modelo determinado experimentalmente. La métrica utilizada aquí fue el *root-mean-square-deviation* (RMSD). Se espera que los resultados más prometedores no superen un RMSD de 3.0 Å, comparándolo con la estructura determinada experimentalmente (Santana Azevedo et al., 2013; L. H. S. Santos et al., 2019). Este valor es un criterio de aceptación y es un umbral utilizado en la comunidad científica, pero es deseable que los valores obtenidos del acoplamiento molecular se mantengan considerablemente por debajo de este umbral.

Por otra parte, se realizó un análisis de interacción proteína-ligando, la cual permite identificar los residuos que se encuentran más cercanos al ligando, además de describir las interacciones que se presentan. Tanto en MOE como ICM, se produce un diagrama 2D que permite identificar las interacciones relevantes, así como regiones y tipos de interacciones dependientes de los grupos funcionales que estén involucrados en la interacción.

5.2.2 Selección de poses

Ambos programas producen una lista ordenada por las energías de unión (calculadas por la función de puntaje) donde valores más negativos suponen a los ligandos que mejor interacción tienen con el sitio activo de la proteína. En situaciones ideales, las poses predichas del docking con un mejor puntaje son las que tienen mayor acercamiento a la realidad (Böhm, 1994). Sin embargo, no existe una función de puntaje universal, por lo que diversos programas pueden obtener valores muy distintos de predicción de constante de afinidad (Bolcato et al., 2019), pero poses similares en las conformaciones con altos valores de puntaje. Se han propuesto diversas estrategias para poder elegir una pose determinante, especialmente en el campo de los GPCRs (Ciancetta et al., 2014). Para esta tesis, se propuso seleccionar las poses que tuvieran una similitud en orientación en ambos programas ($\text{RMSD} < 2.0$) y se encontraran dentro de los mejores puntajes de constante de afinidad.

El introducir la lista completa de los ligandos NBPB evaluados experimentalmente tenía como objetivo conocer si existía alguna estructura que cumpliera tener un factor de sesgo y un valor de constante de afinidad altos, además de una pose que compartiera similitud de orientación de grupos funcionales con los controles empleados. Para este trabajo se seleccionó únicamente un ligando de la lista mencionada (C44).

5.3 Dinámica molecular

Las etapas para la realización de la dinámica molecular de todos los átomos consistieron en:

- Preparación del sistema: Se utilizó el complejo ligando-proteína proveniente del docking para incorporar una bicapa lipídica, solvatarlo y añadir iones K^+ y Cl^- a concentración fisiológica. Por otra parte, se realizó la parametrización del ligando y proteína.
- Preparación y producción de la dinámica: minimización, calentamiento, equilibrio y producción de las simulaciones de dinámica molecular.

5.3.1 Preparación de los sistemas

Se realizó la preparación de cuatro diferentes sistemas, estos varían en el ligando analizado, además de la presencia o ausencia de Na^+ alostérico cerca del residuo N150^{3,35}. Los tres ligandos en cuestión son herkinorina, morfina y C44, además de un sistema con C44 con Na^+ alostérico.

5.3.1.1 Preparación del receptor y membrana lipídica

Se usó el modelo con código PDB 6DDE, el mismo utilizado para realizar el docking molecular. Se usó la secuencia desde el aminoácido M65 hasta R345. El modelo resultante fue introducido al servidor web *Orientations of Proteins in Membranes* (Lomize et al., 2012), con el objetivo de orientar la proteína a lo largo del plano z , lo que facilita la incorporación de la membrana lipídica con el uso del servidor *CHARMM-GUI*. Se mantuvo el puente disulfuro entre las C140 y C217. Se fijó un estado de protonación a pH 7. Se agregó una membrana lipídica con 80% de 1- palmitoil, 2-oleoil-sn-glicero-3-fosfocolina (POPC) y 20% de colesterol (Bartuzi et al., 2015). Mediante minimizaciones y compactaciones de la membrana, se va acoplado a la proteína, evitando los traslapes entre moléculas de residuos peptídicos y la bicapa lipídica. Se agregaron iones K^+ y Cl^- , moléculas de agua TIP3P para obtener una concentración de iones 0.15 M y carga neutra. Moléculas de agua fueron agregadas en el canal formado por el receptor, tomando como referencia las moléculas presentes en el modelo activo del receptor publicado en 2015 (PDB: 5C1M). Además, para evaluar la dependencia del ion sodio en el sitio alostérico (Bartuzi et al., 2015) se colocó un ion Na^+ en la proximidad a N150^{3,35} y D114^{2,50} en un sistema adicional de C44 (**Figura 10**).

5.3.1.2 Preparación de los ligandos

A partir de las posiciones resultantes de docking para cada ligando, se introducen al servidor web PRODRG (Van Aalten, 1996) para la obtención de una estructura con hidrógenos. Con el uso de la paquetería AmberTools 18, se parametrizaron los ligandos para poder incluirlos dentro de las modificaciones del campo de fuerza general de

AMBER (GAFF) (J. Wang et al., 2004). Una vez obtenidas las coordenadas y los archivos que modifican los parámetros del campo de fuerza de los ligandos se incorporaron a los parámetros del receptor, para poder obtener al complejo listo para la dinámica molecular.

5.3.2 Simulaciones de dinámica molecular

Las simulaciones fueron realizadas en paralelo usando AMBER16. Los campos de fuerza utilizados fueron ff99SB, lipid14, lipid11 y GAFF para péptidos, POPC, colesterol y moléculas pequeñas, respectivamente. Los cálculos realizados con Unidades de Procesamiento Central (*CPU*, por sus siglas en inglés) fueron realizados en procesadores Intel Xeon 2670 v1 con 64 GB de RAM e Intel 2660 v3 con 128 GB de RAM. Por otra parte, los cálculos realizados en *cluster* de Unidades de Procesamiento Gráfico (*GPU*, por sus siglas en inglés) fueron en procesadores Intel E5-2670 v1 a 2.6 GHz con 32 GB de RAM y 4 tarjetas NVIDIA Tesla M2090 del recurso de supercómputo *Miztli* de la DGTIC, UNAM. Se realizaron dos minimizaciones consecutivas, la primera minimización consistió en 5000 pasos de *steepest descent* y 5000 pasos de gradiente conjugado con restricciones en ligando y proteína, mientras que la segunda minimización con la mitad de los pasos en mismas proporciones y sin restricciones (**Tabla 3**). A continuación, dos calentamientos paulatinos; el primero NVT (número de partículas, volumen y temperatura controladas) de 0 a 100 K, seguido de un calentamiento NPT (P, presión) con condiciones a la frontera de 100-310 K con un tiempo de relajación de presión de 2 ps, dando un total de 320 ps con un paso de tiempo de 2 ps utilizando el algoritmo SHAKE con termostato de Langevin con frecuencia de colisión de 1 ps^{-1} . Se procedió con una serie de diez equilibrios con restricciones a lo largo de 10 ns. Los equilibrios tenían el mismo termostato que los calentamientos, mientras que el baróstato usado fue el baróstato de Berendsen. A partir de los equilibrios se hizo uso del recurso GPU. Tras finalizar los equilibrios, se procedió a la producción de la dinámica molecular con las mismas condiciones que la última etapa del equilibrio, pero sin restricciones. Cada simulación con tiempos de 500 ns, equivalentes a un total de 12 μs . Las interacciones no enlazantes tenían un radio de corte (*cut-off*) de 10 Å, mientras que las interacciones electrostáticas de larga distancia fueron computadas con el método de *Particle Mesh Ewald* (PME). AMBER 16 utiliza el algoritmo de integración *Leap-frog* para las ecuaciones de movimiento.

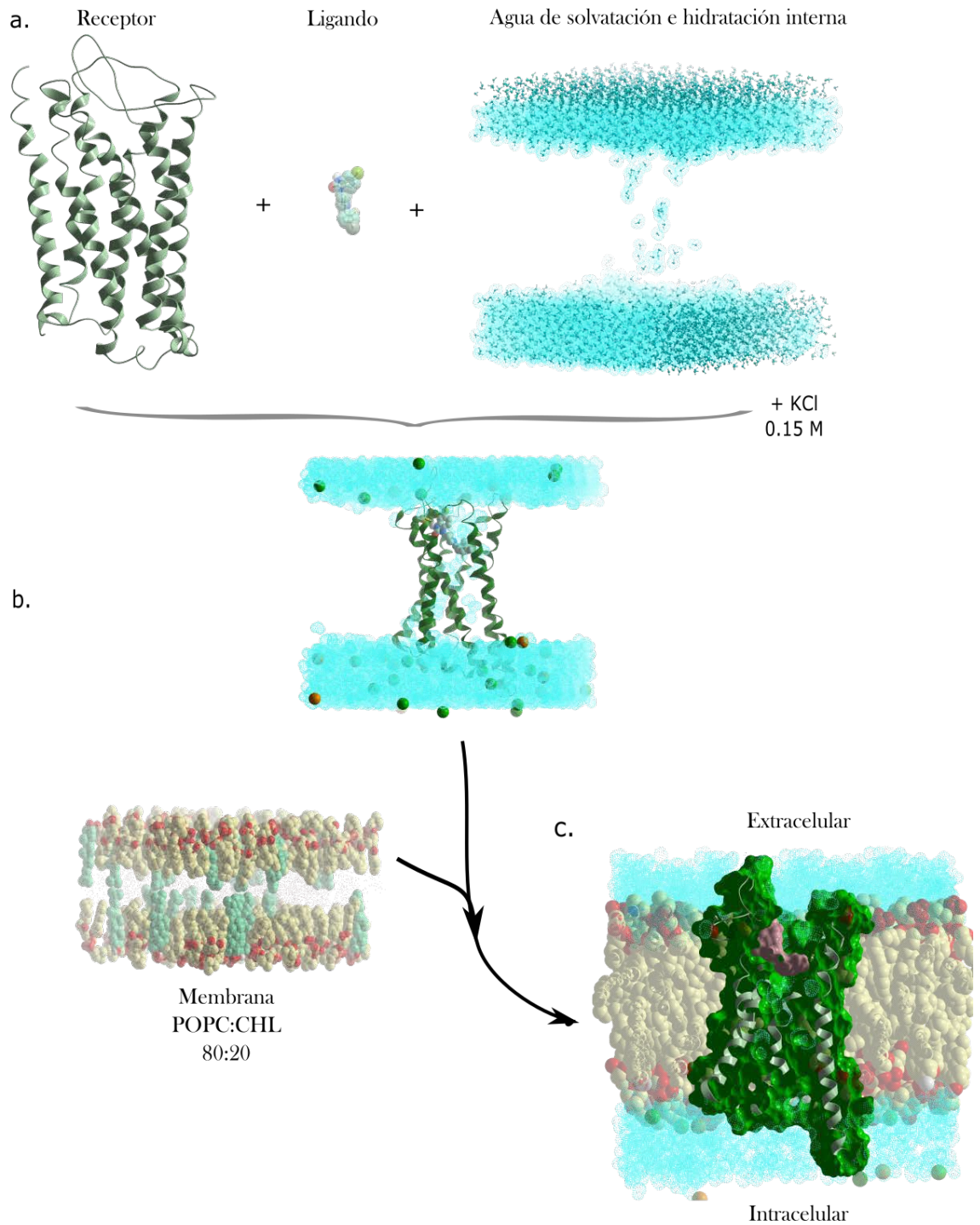


Figura 10. Construcción de los sistemas para la producción de las dinámicas moleculares. a. Preparación del receptor, solvatación e hidratación del canal interno de μ OR. b. Incorporación de solutos de KCl y membrana lipídica. c. Sistema integrado, en superficie verde μ OR, y en superficie rosa el ligando.

Tabla 3. Características descriptivas de las etapas de preparación y producción de la dinámica molecular

Etapa	Valores de constante k para los pesos en las restricciones de coordenadas cartesianas en $kcal/mol\text{\AA}^2$		
	Receptor (μ OR) (Na^+ alostérico, si aplica)	Ligandos	POPC y colesterol
Minimización 1 (SD:5000, GC:5000)*	10	10	---
Minimización 2 (SD:2500, GC:2500)*	---	10	---
Calentamiento 1 (NVT, 80 ps)	10	10	10
Calentamiento 2 (NPT, 240 ps)	2	2	2
Equilibrio 1 (NPT, 200 ps)	2	2	2
Equilibrio 2 (NPT, 200 ps)	2×10^{-1}	5×10^{-1}	2×10^{-1}
Equilibrio 3 (NPT, 200 ps)	2×10^{-2}	5×10^{-2}	2×10^{-2}
Equilibrio 4 (NPT, 400 ps)	1×10^{-3}	5×10^{-3}	1×10^{-3}
Equilibrio 5 (NPT, 400 ps)	2×10^{-4}	5×10^{-4}	2×10^{-4}
Equilibrio 6 (NPT, 400 ps)	1×10^{-8}	1×10^{-7}	1×10^{-8}
Equilibrio 7 (NPT, 300 ps)		1×10^{-8}	
Equilibrio 8 (NPT, 400 ps)		1×10^{-11}	
Equilibrio 9 (NPT, 600 ps)		---	
Equilibrio 10 (NPT, 1 ns)		---	
Producción (NPT, 500 ns)		---	

Las restricciones de posición están en la forma $k(\Delta x)^2$, donde k es el valor de la constante fijada y Δx son las diferencias entre una de las coordenadas cartesianas del átomo restringido y su posición de referencia. Por tanto, hay un término $k(\Delta x)^2$ para cada coordenada Cartesiana de cada átomo restringido.

*SD para Steepest Descent y GC para Gradiente Conjugado

5.4 Análisis de las dinámicas moleculares

5.4.1 Análisis RMSD y energía

Como parte de los análisis básicos de una dinámica molecular de sistemas biomacromoleculares, el RMSD mide desviaciones promedio de un grupo de átomos a comparación de una posición de referencia (**Ecuación 4**), donde $RMSD=0$ indica un traslape perfecto. Este análisis fue realizado con el software *cpptraj* (Roe & Cheatham, 2013)

$$RMSD = \sqrt{\frac{\sum_{i=0}^N [m_i (X_i - Y_i)^2]}{M}}$$

Ecuación 4. Medida RMSD donde N es el número de átomos, m_i es la masa del átomo i , X_i es el vector de coordenadas del átomo i , Y_i es el vector de coordenadas del átomo de referencia i , y M es el total de la masa. Si el RMSD no está ponderado por la masa, entonces $m_i=1$ y $M=N$.

Por otro lado, los análisis de control deben ser realizados durante y después de la dinámica para asegurarse que la temperatura, presión y energía se encuentran dentro de valores razonables y no realiza fluctuaciones mayores. Para esto, se utilizó un *script* en Perl que extrae información de archivos de salida del integrador de AMBER16, para poder graficar energía potencial, energía cinética, energía total, temperatura y presión a través del tiempo. El análisis de energía y de RMSD se realizaron en cada una de las repeticiones de los diferentes sistemas.

5.4.2 Clustering

Debido a que una simulación de dinámica molecular produce gran número de pasos, analizarlas visualmente o con análisis sencillos se vuelve una tarea poco factible (Silva et al., 2014), por lo que diferentes algoritmos de agrupamiento o *clustering* se han adaptado para resolver incógnitas en dinámica molecular. Aquí se desarrolló y aplicó un algoritmo de clustering por *K-means* que permitiera diferenciar grupos de conformaciones de los $C\alpha$ de μ OR. El algoritmo permite la creación de centroides al centro de cada grupo. Dentro de cada grupo se ubican las conformaciones que tengan mayor similitud con el centroide utilizando el RMSD como métrica de distancia. Para más información sobre el algoritmo de *clustering* por *K-means*, consultar el **Anexo B**. Se utilizó este algoritmo para los $C\alpha$ de μ OR en todas las repeticiones a lo largo de los 500 ns, variando el número de centroides de cuatro a seis.

5.4.3 Análisis de Componentes Principales

Nota:

Las mociones funcionales son todos aquellos cambios estructurales en la proteína debidos a un evento externo como la interacción con un sustrato o un ligando. Identificar estos cambios es de gran interés puesto que son relevantes para las funciones que realiza una proteína.

Esta metodología es una de las soluciones para extraer las mociones funcionales (Grudin et al., 2020) más relevantes dentro de una dinámica molecular (Sittel et al., 2014). Utiliza las coordenadas colectivas para obtener un subespacio con dimensiones reducidas en los cuales se pueden identificar los movimientos más significativos de un grupo de átomos, en este caso, los $C\alpha$ de μ OR. Se basa en la premisa de que la mayor cantidad de la varianza (fluctuaciones atómicas colectivas) se pueden describir por los primeros *eigenvectors* (vectores propios) de la matriz de covarianza (entendiendo a la varianza como las mociones colectivas) (Daidone & Amadei, 2012). Para conocer más sobre este algoritmo, consultar el **Anexo B**. La optimización y realización de este algoritmo y *clustering* fueron desarrollados en la Universidad de Rochester, Nueva York, bajo la tutela del Dr. Alan Grossfield.

5.4.4 Interacción ligando-proteína

A lo largo de las trayectorias de dinámica molecular se pueden identificar las interacciones que suceden entre el ligando y los residuos más cercanos a él dentro del sitio de unión. Se utilizó parte del código de la rutina de González-Andrade y colaboradores aplicada en el programa VMD (Gonzalez-Andrade et al., 2016). Esta identifica y registra aminoácidos del receptor que se encuentren dentro de un radio de máximo 4.0 Å a cualquier átomo del ligando durante la trayectoria en cada uno de los pasos.

6.1 Docking molecular y selección de poses

6.1.1 Limpieza y verificación

Al verificar el modelo 6DDE, se encontró una serie de residuos que tenían átomos faltantes, enlistados en la **Tabla 4**.

Tabla 4. Residuos con átomos faltantes diferentes a hidrógeno en el modelo PDB: 6DDE, 2018.

M65	V66	T67	I69	T70	I71	L74	C79	V80	L83
I93	R95	K98	K100	N104	T118	S125	L129	M130	T132
I138	S196	L200	V202	M203	M205	T207	K209	Q212	F221
H223	W226	Y227	I238	L246	S268	K269	V291	C292	T294
L305	T311	F313	S317	C321	T327	E341	F343	K344	R345

Los residuos marcados son aquellos que tienen cercanía con el sitio ortostérico.

Debido a la existencia de átomos faltantes en residuos que pueden tener interacción con el ligando, se decidió completarlos mediante modelados por homología con MOE 2019. Debido a que el modelo resultante es teórico, se ilustra su diagrama Ramachandran en la **Figura 11**, en donde no se observan valores atípicos (*outliers*) que indiquen ángulos diedros fuera de los intervalos comúnmente observados. El modelo producido fue utilizado para el acoplamiento molecular de todos los ligandos.

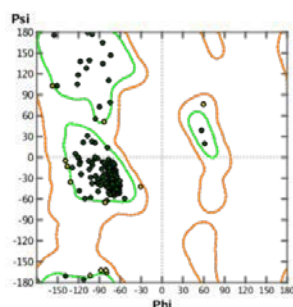
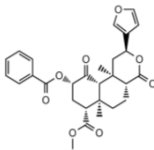
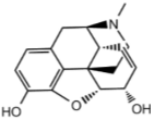
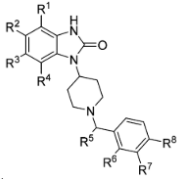
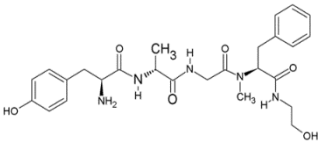
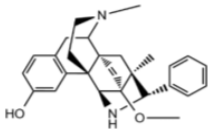


Figura 11. Diagrama de Ramachandran, los puntos en verde y amarillo ilustran los residuos con ángulos permitidos.

Tabla 5. Moléculas de estudio en docking molecular con características de relevancia en el trabajo de tesis.

Nombre	Estructura	Tipo de ligando	Factor de sesgo
Herkinorina		Agonista sesgado	N/A
Morfina		Agonista balanceado*	1.8
Núcleo N-bencil piperidina 4-benzimidazolona		Variable **	
DAMGO		Agonista balanceado* Cristalizado con μ OR PDB:6DDE.2018	1.0
BU72		Agonista balanceado* Cristalizado con μ OR.PDB: 5C1M, 2015	N/A

*Un agonista balanceado no tiene evidencia experimental de poder activar preferentemente una u otra vía de señalización

Datos disponibles en Kennedy et al., 2018 o en la **Tabla 8

En el caso de las moléculas con núcleo NBPB, se evaluaron por separado a los enantiómeros.

Se realizó el docking de morfina, herkinorina, 63 moléculas con núcleo NBPB y como controles DAMGO y BU72, de los cuales se tienen estructuras cristalizadas con el receptor activo. Las estructuras químicas, el tipo de ligando y sus afinidades se encuentran en la **Tabla 5**.

Los estudios de docking se realizaron en el sitio ortostérico y su vecindad dentro de μ OR, los residuos seleccionados por los métodos *ICM Pocket Finder* en ICM-Pro y *Site Finder* en MOE 2019 se muestran en la **Tabla 6**.

Tabla 6. Aminoácidos en μ OR definidos como sitio ortostérico por *Site Finder* e *ICM Pocket Finder*

A117 ^{2.53}	T120 ^{2.56}	F123 ^{2.59}	Q124 ^{2.60}	N127 ^{2.63}	Y128 ^{2.64}	W133 ^{ECL1}
V143 ^{3.28}	I144 ^{3.29}	D147 ^{3.32}	Y148 ^{3.33}	M151 ^{3.36}	R211 ^{ECL2}	D216 ^{ECL2}
C217 ^{ECL2}	T218 ^{ECL2}	L219 ^{ECL2}	E229 ^{5.35}	L232 ^{5.38}	K233 ^{5.39}	V236 ^{5.42}
F237 ^{5.43}	W293 ^{6.48}	I296 ^{6.51}	H297 ^{6.52}	V300 ^{6.55}	K303 ^{6.58}	E310 ^{ECL3}
T315 ^{7.32}	W318 ^{7.35}	H319 ^{7.36}	I322 ^{7.39}	Y326 ^{7.43}	S329 ^{7.46}	

Los residuos marcados en rojo y en verde se encuentran únicamente en MOE e ICM, respectivamente, mientras que los residuos no marcados se encontraban como resultado de ambos softwares.

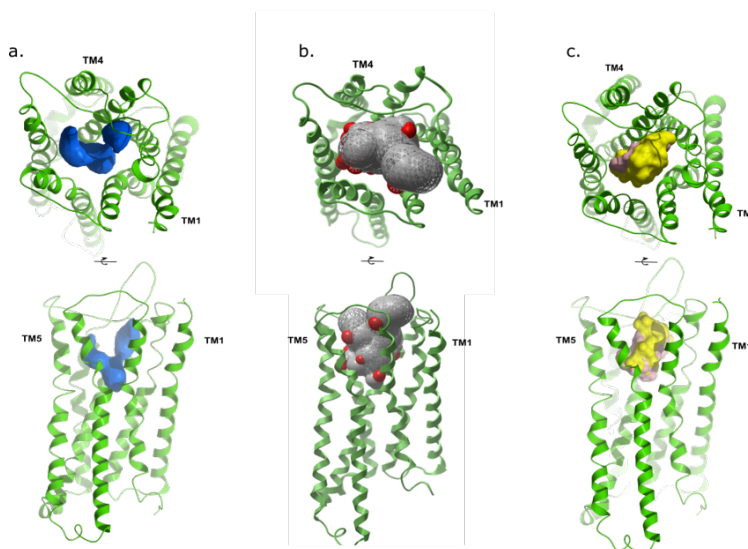


Figura 12. a. Sitio de unión en μ OR definido por *ICM Pocket Finder* en ICM-Pro, representado como superficie azul. b. Sitio de unión en μ OR definido por *Site Finder* en μ OR 2019, representando las esferas alfa en gris y rojo. c. Ligandos co-cristalizados en μ OR, representando a DAMGO en superficie amarilla y a BU72 en rosa.

La **Tabla 6** muestra que el número de aminoácidos que conforman el sitio de unión, de acuerdo con *Site Finder* de MOE es mayor que el encontrado por *ICM Pocket Finder* (30 vs 25). Esto sugiere que el espacio muestreado por *Site Finder* es mayor. Esta información se puede constatar con la **Figura 12**, puesto que el sitio de muestreo fijado por MOE (**Figura 12.b**) tiene contemplado a TM4 y TM1, mientras que en el caso de ICM Pocket Finder, no se presenta una cercanía hacia estas dos hélices transmembranales, patrón que también es observado en los ligandos co-cristalizados de μ OR en su estado activo (**Figura 12.c**).

6.1.2 Controles

Los controles incluidos en los estudios de acoplamiento molecular fueron BU72 (co-cristalizado con μ OR activo, PDB: 5C1M, 2015) y DAMGO (PDB: 6DDE, 2018). La razón de usar un segundo control que no corresponde a la estructura cristalográfica utilizada para el acoplamiento molecular fue que el ligando co-cristalizado con esta estructura (DAMGO), al ser un ligando de tipo peptídico compuesto de cuatro residuos, presenta un gran número de enlaces rotables, aumentando el número de grados de libertad en el muestreo (Erickson et al., 2004), mermando su uso como control. Cabe destacar que el RMSD de $C\alpha$ entre los modelos estructurales 6DDE y 5C1M es de 1.693 Å, mientras que de los residuos completos en el sitio de unión es de 1.465 Å, lo que significa que los residuos del sitio de unión tienen una orientación muy similar en ambos modelos.

A partir de los resultados mostrados en la **Tabla 7** se puede inferir que el ligando BU72 presenta mejores resultados que DAMGO en ambos programas, ya que las desviaciones estándar, tanto de las funciones de puntaje como de los RMSD contra la estructura cristalizada, son más bajas en BU72 a comparación de DAMGO en todos los casos.

Por otra parte, se observa que no siempre el resultado con mejor puntaje será el que tenga más acercamiento al modelo experimental. Esta premisa se cumple sólo en BU72, puesto que el RMSD de menor valor comparado con la estructura co-cristalizada tiene el mayor valor de puntaje de acoplamiento. A pesar de que, a primera instancia, en MOE se hayan obtenido valores más bajos en RMSD y un mejor traslape en los grupos funcionales comparados con el ligando co-cristalizado (**Figura 13**), los resultados de las moléculas diferentes a los controles tienen que ser comparados con información acerca de modelos ya publicados, sean experimentales o computacionales, para seleccionar la orientación más razonada en el receptor.

Tabla 7. Resultados del acoplamiento molecular en los controles empleados BU72 y DAMGO.

	MOE		ICM	
	Puntaje (kcal/mol)	RMSD (Å)*	Puntaje (kcal/mol)	RMSD (Å)*
DAMGO				
Primera réplica	-21.864	2.646	-11.78	9.345
Segunda réplica	-21.862	1.978	-6.435	3.421
Tercera réplica	-20.841	2.059	-5.366	5.082
Promedio, SD	-21.522 ± 0.591	2.228 ± 0.365	-7.860 ± 3.4363	5.949 ± 3.055
BU72				
Primera réplica	-19.893	1.582	-5.139	1.311
Segunda réplica	-19.901	1.546	-5.427	1.320
Tercera réplica	-19.894	1.677	-6.156	1.308
Promedio, SD	-19.896 ± 0.004	1.601 ± 0.067	-5.574 ± 0.524	1.313 ± 0.006

* Se compara contra la estructura cristalizada de cada modelo, siendo 5C1M para BU72 y 6DDE para DAMGO. Se remarcan los resultados con RMSD más bajos de cada triplicado. SD = Desviación estándar

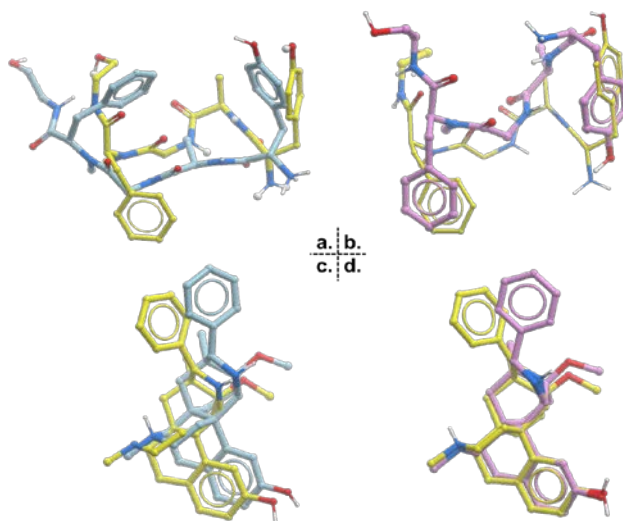


Figura 13. Comparación estructural de ligandos cristalográficos y controles del docking. Se escogieron las orientaciones provenientes del docking con menor valor de RMSD al comparar con el ligando cristalográfico (**Tabla 7**). Los ligandos co-cristalizados se muestran en amarillo, los de ICM en morado y MOE en azul. En representación de *sticks* se muestra a DAMGO (a,b) y a BU72 (c,d). Consultar el Anexo A para ver las interacciones involucradas.

6.1.3 Morfina

Se utilizó a la morfina para este proyecto de tesis por tres principales razones:

- Es una molécula con una gran variedad de literatura disponible para su consulta y análisis.
- Se usó como ligando balanceado, es decir, no tiene preferencia hacia alguna ruta de señalización.
- Se tiene una estructura cristalográfica de un ligando tipo morfinano con μ OR.

Nota:

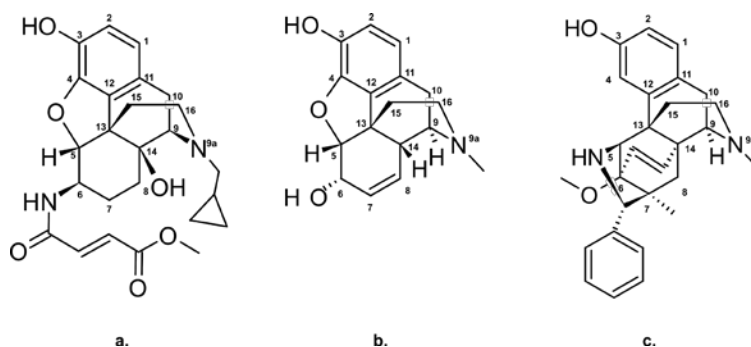
El coeficiente de Tanimoto se define como

$$T(a, b) = \frac{N_c}{N_a + N_b - N_c}$$

Donde N es el acumulado de propiedades contenidas en la molécula, mientras que N_c representa su intersección

En química farmacéutica, el diseño de fármacos basado en ligando (*LBDD*, por sus siglas en inglés) se fundamenta en que ligandos con una estructura similar tendrán modos de unión similares. Esto fue determinante para la selección del modo de unión de morfina, ya que se disponía de dos modelos estructurales publicados en el PDB: 4DKL, 2012 (Manglik et al., 2012) y 5C1M, 2015 (Huang et al., 2015a). Ambos modelos experimentales de μ OR contienen ligandos co-cristalizados característicos del grupo de ligandos tipo morfinanos. El modelo PDB: 4DKL, tiene a β -funaltrexamina (β -FNA) (**Figura 14.a**), un antagonista que se une covalentemente al receptor en el residuo K233^{5,39}(Chen et al., 1996), mientras que el ligando co-cristalizado con μ OR en el PDB: 5C1M es BU72 (**Figura 14.c**), mencionado en la sección 6.1.2. Se calculó el coeficiente de Tanimoto de las moléculas en comparación a morfina (**Figura 14.b**) en *DataWarrior V5.2.1* (Sander et al., 2015) con un descriptor estructural de tipo diccionario, *FragFp*⁴, dando como resultado 0.859 y 0.814 de β -FNA y BU72, respectivamente.

Figura 14. Ligandos con afinidad a μ OR. El antagonista co-cristalizado covalentemente unido a μ OR, β -FNA (a.) morfina (b.) y el agonista co-cristalizado con μ OR en el modelo activo PDB: 5C1M, BU72 (c.). Los tres ligandos poseen un núcleo morfinano, el cual está trazado con números.



⁴ El descriptor *FragFp* se basa en un diccionario de 512 fragmentos estructurales predefinidos

El modelo seleccionado fue aquel que presentó menor RMSD del anillo morfínico hacia ambos ligandos co-cristalizados. Este modelo correspondía a la primera repetición proveniente de MOE (**Figura 15**). Las interacciones entre el modo de unión de morfina y β -FNA no son las mismas, puesto que β -FNA es un antagonista unido covalentemente a μ OR, además de tener mayor volumen permitiendo el contacto con diversas regiones del canal del receptor.

Los modelos experimentales de BU72 y β -FNA, así como el modelo de acoplamiento de morfina se muestran en la **Figura 16**. Se conserva la interacción de puente salino entre la amina cuaternaria y D147^{3.32}, la cual es una de las interacciones más conocidas y presentes en receptores opioides, puesto que también se encuentra en las estructuras de DOR y KOR (Granier et al., 2012; Wu et al., 2012), además de que se ha comprobado su importancia mediante estudios de mutagénesis y afinidad (Mansour et al., 2002). La interacción con D147^{3.32}, así como la de H297^{6.52} (también presente en el modo de unión de morfina seleccionado) son primordiales para la unión de agonistas y antagonistas, puesto que los receptores con mutación H297A y D147A han resultado en una unión indetectable tanto con el agonista [³H]DAMGO como con el antagonista [³H]naloxona.

Debido a que el núcleo morfínico tiene una orientación similar en los tres modelos, gran parte de las interacciones se comparten, salvo excepciones asociadas al tamaño de los ligandos y las redes de agua formadas. Un ejemplo es el residuo K233^{5.39}, el cual se encuentra unido covalentemente a β -FNA en el modelo experimental de μ OR inactivo. Este residuo se encuentra interaccionando mediante una red de agua con el grupo fenol de BU72, sin embargo, no se produce la misma interacción con morfina. Se ha destacado el papel del agua de hidratación en el canal como un factor influyente en la unión de ligandos, así como la activación de μ OR (Yuan et al., 2013), acentuando una vez más su inclusión en estudios hacia este receptor, como en el presente trabajo.

Un contacto por destacar es la interacción hidrofóbica del grupo ciclopropilmetilo de β -FNA con G325^{7.42}, la cual no está presente en los modelos de morfina y BU72. Hasta el momento, no hay estudios publicados que relacionen a G325^{7.42} con el efecto antagonista de algunos ligandos. Sin embargo, existe la hipótesis de que diferentes grupos sustituyentes en el N17 de núcleos morfínicos, los cuales se orientan hacia residuos como G325^{7.42} e Y326^{7.43}, influyen en gran medida en el antagonismo hacia el receptor, particularmente, la incorporación de un grupo ciclopropilmetilo resulta en un cambio de ligando agonista a antagonista (Pasternak, 2014).

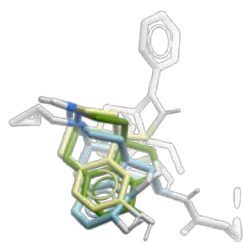


Figura 15. Comparación de modelo de morfina con ligandos co-cristalizados. Se remarca el núcleo morfínico, donde el verde es morfina, amarillo BU72 y en azul β -FNA. Se denota que se alinea en el núcleo morfínico (coloreado)

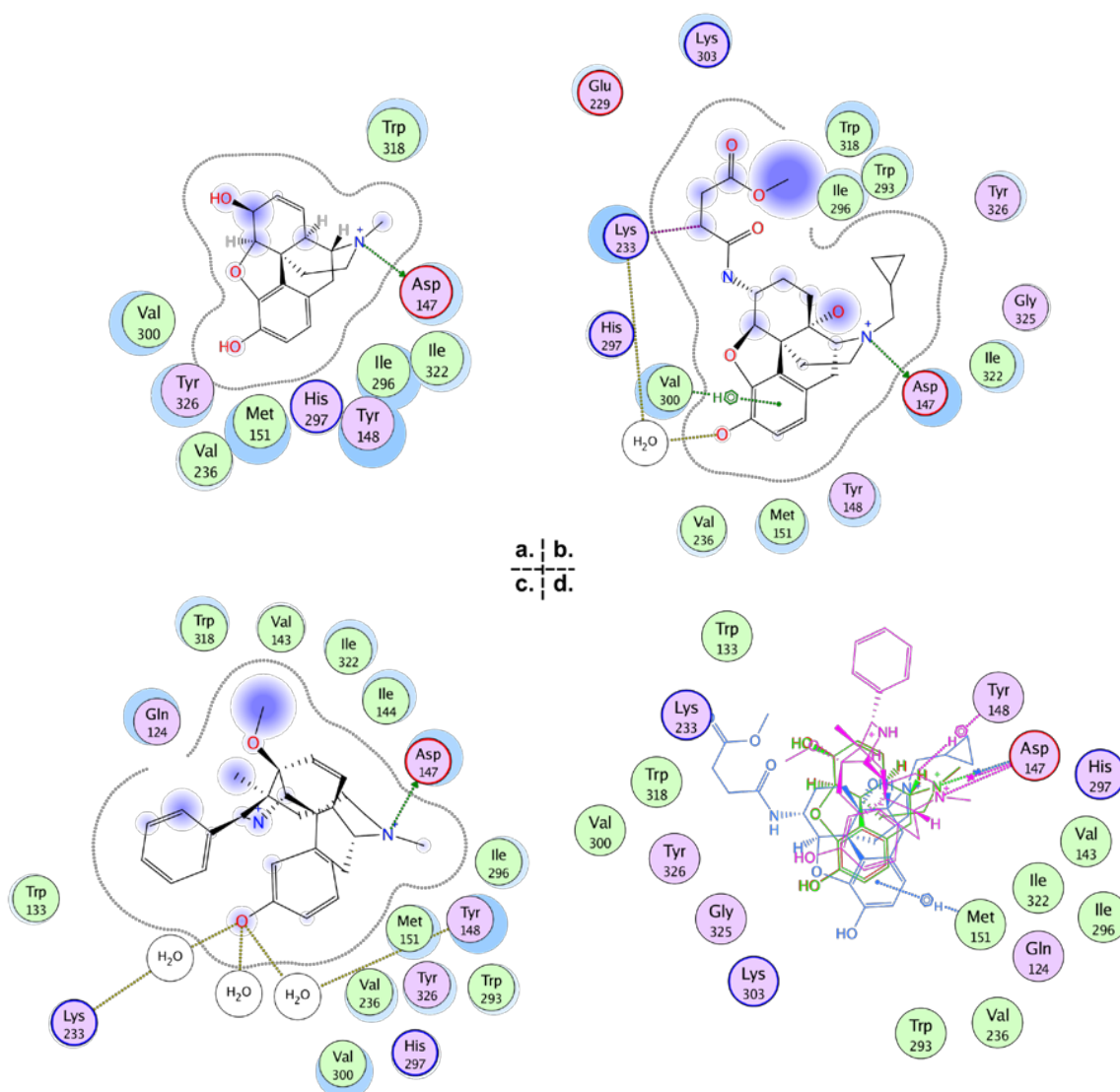


Figura 16. Interacciones proteína-ligando del modo de unión de ligandos de tipo morfínico a μ OR. a. Morfina, modelo teórico con PDB: 6DDE, 2018. b. β -FNA, modelo experimental con 4DKL, 2012. c. BU72, modelo experimental con PDB: 5C1M, 2015., d. Interacciones presentadas en todos los ligandos. La leyenda de la figura puede consultarse en el Anexo A.

6.1.4 Herkinorina

A diferencia del caso anterior, para herkinorina (o análogos) no existe un modelo cristalográfico publicado hasta el momento. Por otra parte, la ausencia de una amina cuaternaria lo cataloga como un ligando totalmente diferente a los agonistas a MOR previamente conocidos. Por tanto, es probable que la unión sea diferente al tener ausencia de esta característica que se presentaba en los modos de unión de ligandos aminérgicos. Bajo estas premisas, en lugar de realizar el acoplamiento molecular, se decidió utilizar la orientación obtenida en trabajos previos en nuestro grupo de investigación. La orientación seleccionada es resultado de una dinámica molecular de todos los átomos de 200 ns en μ OR con herkinorina como agonista (Marmolejo-Valencia & Martínez-Mayorga, 2017), el procedimiento de preparación de esta dinámica molecular puede ser consultado en el **Anexo B**. En este último estudio, herkinorina permaneció con pocas fluctuaciones a lo largo de la dinámica molecular (RMSD=2.094 Å de ligando antes y después de la dinámica molecular), indicando estabilidad del ligando en el sitio de unión, indicativo de una mayor probabilidad de un modo de unión acertado (K. Liu & Kokubo, 2017).

Para corroborar la validez de este modo de unión, se realizó un análisis de la conformación e interacciones de esta orientación. La herkinorina es un ligando semisintético proveniente de la salvinorina A, un producto natural diterpénico aislado de *Salvia divinorum*, el cual tiene una potente afinidad selectiva hacia KOR (Y. Wang et al., 2005). La **Figura 17** muestra las estructuras de herkinorina y salvinorina A, así como sus afinidades hacia receptores opioides. Al remplazar el grupo acetoxi en C-2 por un grupo fenoxi, la herkinorina pierde afinidad por KOR, además de que aumenta significativamente su afinidad hacia μ OR, en comparación de salvinorina A. Ambas moléculas presentan una menor afinidad hacia DOR (Harding et al., 2005).

La similitud entre herkinorina y salvinorina A (coeficiente de Tanimoto = 0.945), así como la identidad de secuencia entre μ OR y KOR (56.44%) permiten asumir que las interacciones de ambos ligandos suceden de una manera similar. Por otra parte, salvinorina A induce internalización del KOR (Y. Wang et al., 2008), mientras que herkinorina se caracteriza por ser el primer agonista selectivo sesgado a proteína G en μ OR (Yudin & Rohacs, 2019), por lo que se puede inferir que hay una diferencia en grupos de residuos relacionados a la selectividad funcional, además de aquellas interacciones relacionadas a la selectividad entre receptores opioides.

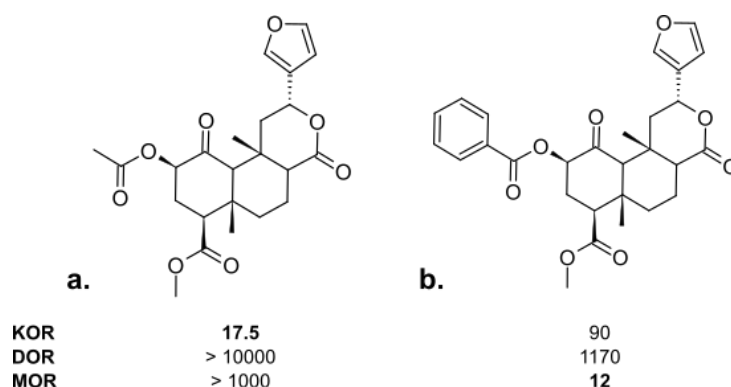


Figura 17. Estructuras moleculares de salvinorina A (a) y herkinorina (b).
 KOR = Receptor opioide κ , DOR = δ , μ OR = μ . Las afinidades hacia cada receptor se presentan en constante de afinidad (K_i) en unidades nM.

Uno de los modelos de unión a μ OR de salvinorina A destaca su potencial como modulador alostérico negativo (Bartuzi et al., 2015) tras analizar su orientación con diferentes ligandos mediante acoplamiento y dinámica molecular. Según Bartuzi y colaboradores, su modelo coloca al grupo 2-arilo de herkinorina en cercanía a W293^{6,48}, que coincide con nuestro modelo. Previamente, se ha mostrado que la presencia de grupos aromáticos en la posición 2 de herkinorina mantienen constantes de afinidad, K_i , menores a 100 nM hacia μ OR (Harding et al., 2005). Por otro lado, W293^{6,48} es un residuo que se ha propuesto como un comunicador entre el sitio ortostérico y zonas hidrofóbicas en el canal del receptor (P. Lipiński et al., 2019) además de verse relacionado con la activación de μ OR y la señalización (Hulme, 2013; Kaiser et al., 2018).

Bartuzi y colaboradores sitúan el grupo furano de herkinorina entre un grupo de aminoácidos aromáticos: H319^{7,36}, W318^{7,35}, Y128^{2,64} en TM7 y TM2 (**Figura 18**) lo que difiere con nuestro modelo, en donde el anillo furano, a pesar de orientarse hacia el lado extracelular, tiene una preferencia hacia TM2 (Q124^{2,60}), TM3 (V143^{3,28} e I144^{3,29}) y lazo extracelular 1 (ECL1) (W133^{ECL1}). Por otra parte, la orientación del furano en nuestro modelo tiene similitud con la orientación de los grupos bencílicos de los dos ligandos co-cristalizados (DAMGO y BU72), permitiendo las interacciones con los residuos mencionados (**Figura 18**). La orientación del furano también concuerda con el modelo computacional propuesto por Polepally y colaboradores en 2014, en los cuales proponen el modo de unión de salvinorina A y algunos análogos sustituidos en C2 hacia KOR (Polepally et al., 2014), aunque los resultados obtenidos por Polepally y colaboradores orientan en mayor medida al grupo furano hacia los residuos del ECL2 como C210^{ECL2} (C217^{ECL2} en μ OR).

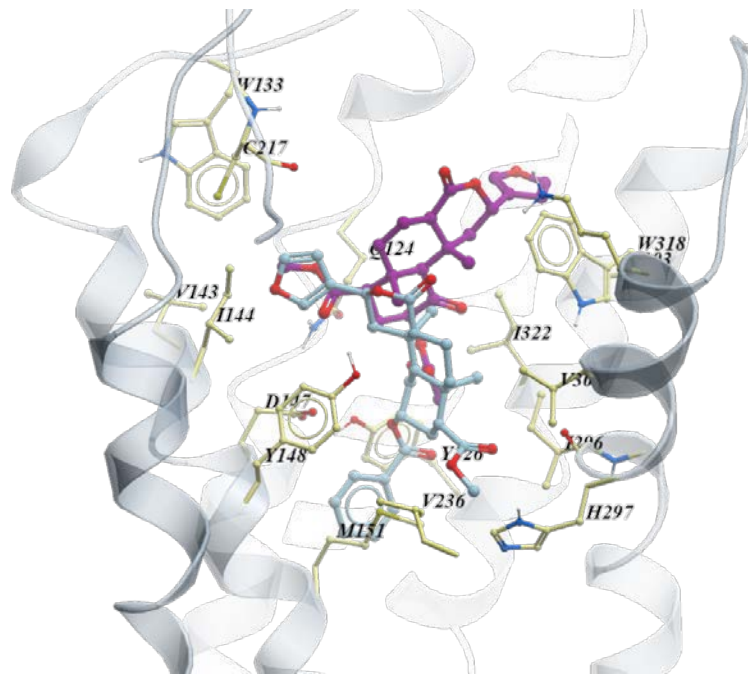


Figura 18. Herkinorina del modelo seleccionado y Salvinorina del modelo de Bartuzi y colaboradores. Se muestra a herkinorina en azul, salvinorina A en púrpura y μ OR en gris (residuos de interacción en amarillo).

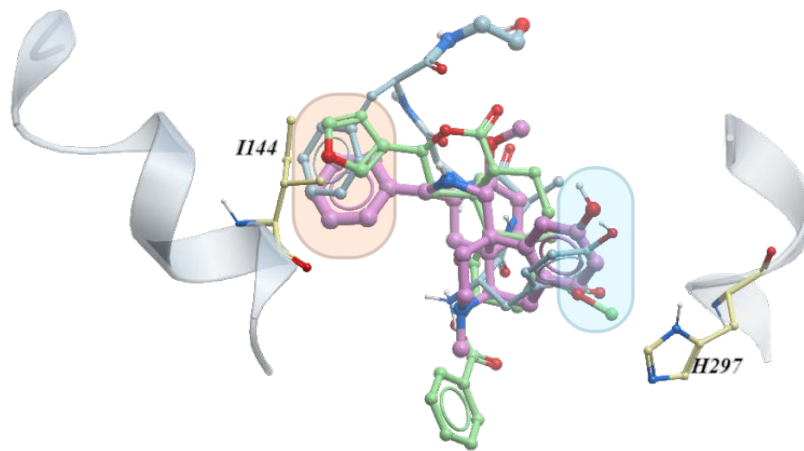


Figura 19. Comparación del modelo seleccionado de herkinorina (verde) con los ligandos co-cristalizados con μ OR (DAMGO en azul, BU72 en morado). Se remarcan zonas de orientación similares en grupos funcionales similares, tales como grupos aromáticos (rosa) y grupos con oxígeno (azul). Algunos residuos de interacción se muestran en amarillo.

Por último, el grupo metil éster en C4 en herkinorina de nuestro modelo seleccionado se orienta hacia TM5 y TM6, mientras que el modelo de Bartuzi lo ubica hacia TM3. Se puede destacar la influencia de un grupo rico en electrones en la disposición que adopta el grupo metil éster de nuestro modelo, puesto que tiene similitud con el oxígeno del grupo fenol de ambos ligandos co-cristalizados (BU72 y DAMGO), además de que estos tres grupos ricos en electrones presentan cercanía con H297^{6.52} (**Figura 19**).

6.1.5 Compuestos N-bencil piperidina4-benzimidazolona (NBPB)

Se realizó el docking a 51 compuestos (37 únicos y 14 enantiómeros) de núcleo NBPB (**Tabla 8**). Este docking tiene dos objetivos específicos:

- Tener mayor evidencia para lograr un modo de unión consenso.
- Identificar, en caso de que exista, un compuesto que obtenga resultados competentes para considerarlo candidato para estudios posteriores, tales como análisis de contactos y dinámica molecular. Para lograr este objetivo también se analizó la evidencia experimental disponible en la literatura.






Cabe resaltar que estos compuestos tienen evaluaciones *in vitro* tanto para determinar su actividad de acoplamiento a proteína G mediante el ensayo de unión ³⁵S-GTPγS (Harrison & Traynor, 2003) como perfil de reclutamiento a β-arrestina2 por ensayo de complementación de fragmentos de proteínas (Remy & Michnick, 2007), ambos en μOR, permitiendo así calcular su factor de sesgo (consultar **Anexo A**).

Se observó que no existe una relación aparente entre el factor de sesgo (**Tabla 8**) y el puntaje obtenido tanto en MOE como en ICM, al menos en las condiciones del estudio de acoplamiento molecular (**Figura 20**).

Uno de los objetivos del docking a los compuestos de núcleo NBPB fue identificar uno o más compuestos con características sobresalientes en cuanto a su afinidad experimental, factor de sesgo y resultados del acoplamiento molecular para considerarlo candidato a la dinámica molecular. El compuesto identificado como compuesto 44 (**C44**), cumple con las características estipuladas, puesto que presenta un factor de sesgo de 56, siendo el valor más alto del grupo de moléculas NBPB, un puntaje de docking de -14.002 ± 0.021 y -16.913 ± 0.411 kcal/mol en MOE e ICM, respectivamente. Se consideró al compuesto 46 por tener un factor de sesgo de 45 y valores de puntaje por encima de la media de los resultados en todos los compuestos NBPB (**Figura 20.b**). Sin embargo, al evaluar los recursos computacionales que se contemplaban previos a realizar la dinámica molecular, se optó por descartarlo y solo evaluar a C44 en estudios posteriores.

Tabla 8. Factor de sesgo y grupos funcionales de derivados de N-Bencil Piperidina 4-Benzimidazonas

Agonista	R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7	R8	X	Factor de sesgo*
DAMGO										1
Morfina										1.8
Herkinorina										N/A
1										0.9
2						Cl			"	2.5
3							Cl		"	1.6
4								Cl	"	1.2
5								Me	"	1.0
6								Br	"	1.1
7								OME	"	0.91
8								NHC(O)Me	"	1.1
9								CN	"	/
10								C(O)NH ₂	"	/
11							OMe		"	2.0
12							OCF ₃		"	1.1
13							Cl	Cl	"	/
14						Me		Cl	"	3.8
15						F		Br	"	2.5
16					Me				"	1.7
17					Me	Cl			"	1.0
18					Me			Cl	"	2.1
19					Et			Cl	"	0.81
20					Me			F	"	0.56
21					Me			Br	"	4.1
22					Me			OMe	"	0.86
23					Me			OEt	"	0.90
24					Me			OiPr	"	3.6

25					Me		-OCH ₂ CH ₂ O-	"	0.47
26					Me		OCF ₃	"	8.3
27					Me	F	Br	"	3.3
28					Me	F	Cl	"	2.9
29	Cl					Cl		"	5.8
30		Cl				Cl		"	7.1
31			Cl			Cl		"	6.9
32				Cl		Cl		"	/
33		Me				Cl		"	4.5
34		Br				Cl		"	1.3
35		F				Cl		"	1.3
36		OMe				Cl		"	1.9
37		OCF ₃				Cl		"	/
38		SO ₂ Me				Cl		"	1.0
39		CN				Cl		"	/
40	Cl					F	Br	"	3.9
41		Cl				F	Br	"	23
42			Cl			F	Br	"	4.2
43	Cl		Cl			F	Br	"	2.5
44		Cl	Cl			F	Br	"	56
45	Cl	Cl		Cl		F	Br	"	5.2
46		Cl	Cl				Br	"	45
47		Cl	Cl				Br		8.5
48		Cl	Cl				Br		6.2
49		Cl	Cl				Br		5.3
50		Cl	Cl				Br		/
51		Cl	Cl				Br		/

Los compuestos enantioméricos son aquellos que tengan sustituyente en R5. * Factor de sesgo comparado con DAMGO como referencia.

Una vez decidido el compuesto NBPB a evaluar, se procedió a seleccionar la orientación de este compuesto como pose inicial para la dinámica molecular. A diferencia de los casos de morfina y herkinorina mencionados previamente en las secciones **6.1.3** y **6.1.4**, en este caso no se tenía una estructura cristalizada o modelos publicados de un ligando con alta similitud estructural (núcleo morfinano para morfina o modelo de salvinorina A para herkinorina). Sin embargo, podemos respaldarnos de información disponible que relaciona interacciones importantes, así como orientaciones de grupos funcionales comunes en los ligandos co-cristalizados junto con otros receptores opioides. Por otra parte, otro de los objetivos de realizar el docking molecular al grupo de moléculas NBPB era hallar un modo de unión consenso para facilitar la selección de una orientación en las moléculas selectas, en este caso, C44.

Las tres poses obtenidas de C44 a partir de las réplicas del docking en ICM son muy similares puesto que difieren en menos de 0.1 Å de RMSD. Sucede lo mismo para las poses obtenidas de MOE, aunque entre las poses de ICM y MOE, si hay diferencias, tal como se ilustra en la **Figura 21**. En ambos casos, se observa una orientación del grupo benzimidazol hacia la fracción extracelular de μ OR, mientras que el grupo bencilo tiene preferencia hacia la fracción intracelular, además de que en ambos modos de unión se observa la interacción de D147^{3.32} con el grupo amino de la piperidina en C44, interacción antes mencionada.

Una característica por destacar es la orientación hacia el lado intracelular del grupo benceno dihalogenado. En el resultado obtenido por MOE (**Figura 21.a**), este grupo tiene una orientación tal que le permite interactuar con residuos como V236^{5.42} en TM5, H297^{6.52}, V300^{6.55} en TM6. Dichas interacciones concuerdan con los modelos de unión de dos ligandos sesgados con un mismo núcleo estructural; TRV130 y SHR9352 (X. Li et al., 2017). La unión del anillo de piridina y tiofeno, tanto de TRV130 como de SHR9352, se orientan de un modo similar hacia estos residuos aledaños de TM5 y TM6. Los movimientos de estas dos hélices transmembranales han sido reportadas relevantes en el estudio del agonismo sesgado (Vaidehi & Kenakin, 2010). Otra característica que respalda a este modelo es el solapamiento de grupos bencílicos de ligandos co-cristalizados con μ OR. Tal es el caso tanto de DAMGO (PDB:6DDE) como de BU72 (PDB: 5C1M), ya que ambos modelos estructurales orientan un grupo bencílico de manera muy similar al presentado en el modelo obtenido del docking con MOE. En el caso del resultado de ICM (**Figura 21.b**), el grupo benceno posa con una vertiente inclinada, lo que permite mayor cercanía hacia el sitio alostérico del ion sodio, pero lo priva de la interacción con residuos de TM5 y algunos residuos en TM6. Algunos contactos que destacar son los G325^{7.42}, A117^{2.53} y W293^{6.48}, que a pesar de no ser residuos de la primera capa de interacción con el ion sodio (N150^{3.35}, S154^{3.39}, D114^{2.50}), colocan a esta orientación como un buen candidato a estudios posteriores de dinámica molecular. Algunas hipótesis

indican que la interacción de una fracción del ligando sesgado con los residuos del sitio alostérico que aloja al ion sodio, puede ser indicativo de una señalización sesgada (Marmolejo-Valencia & Martínez-Mayorga, 2017), particularmente del residuo N150^{3.35}, del cual existe evidencia experimental de que la mutación N131A o N131V (homólogo a N150^{3.35} en μ OR) promueve la señalización vía β -arrestina2 comparado con μ OR *wild-type* (Fenalti et al., 2014). Por otra parte, la orientación del mismo grupo benceno de C44 muestra una interacción de apilamiento $\pi\pi$ - $\pi\pi$ con el grupo bencilo de Y326^{7.43}. Esta interacción resulta interesante debido a que la mutación Y326F disminuye la afinidad de DAMGO hacia μ OR (Pil & Tytgat, 2003). Sin embargo, en el modelo experimental de μ OR co-cristalizado con DAMGO, se observa que la interacción con Y326^{7.43} es mediante un puente de hidrógeno con el grupo amino del N terminal de DAMGO. El grupo benceno de la tirosina de DAMGO tiene una similitud con el modelo de MOE.

Respecto a la orientación del grupo benzimidazol en C44 para ambos modelos, se pueden destacar algunas diferencias. En ambos modelos, este grupo se orienta hacia la fracción extracelular de μ OR, pero los sustituyentes de cloro y el grupo carbonilo difieren en su cercanía a residuos que pueden estar involucrados al agonismo sesgado. Tal es el caso de los residuos en la “región de vestíbulo” (Granier & Kobilka, 2012; Schneider et al., 2016), la cual es una zona entre el sitio ortostérico y la fracción extracelular de μ OR, la cual comprende principalmente a residuos en TM2, ECL1 y ECL2. En nuestros dos modelos de unión teóricos se observa la interacción con Q124^{2.60}, N127^{2.63} y C217^{ECL2}, que comprenden residuos de la región de vestíbulo. De primera instancia, en el modelo de MOE se aprecia un mayor adentramiento de la sección bencílica del benzimidazol de C44 hacia TM2, TM3, ECL1 y ECL2, lo que coincide con resultados obtenidos previamente en nuestro grupo de trabajo de patrones de común interacción teóricos comunes en ligandos sesgados contra no sesgados en μ OR (Madariaga-Mazón et al., 2017b). Además, se reconoce un contacto próximo entre el grupo carbonilo de C44 y el indol de W318^{7.35}. La mutación en KOR Y312^{7.35}W le confirió actividad sesgada hacia proteína G al evaluar un ligando de tipo morfina (IBNtxA) mientras que con KOR tipo silvestre se comportaba como un agonista no sesgado (Che et al., 2018). Estos resultados sugieren que el residuo en la posición X^{7.35} está relacionado con la actividad sesgada hacia proteína G en KOR y μ OR. En el caso del modelo de ICM, a pesar de que la fracción bencílica tenga proximidad con diversos residuos en TM2 y TM3, no presenta un grado de penetración hacia la zona de vestíbulo. Por otra parte, el carbonilo realiza un puente de hidrógeno con Y148^{3.33}, el cual fue propuesto por Kapoor como un buen conector entre la interacción de TRV-130 y el receptor, mientras que con morfina no se presentaba una respuesta similar (Kapoor et al., 2017).

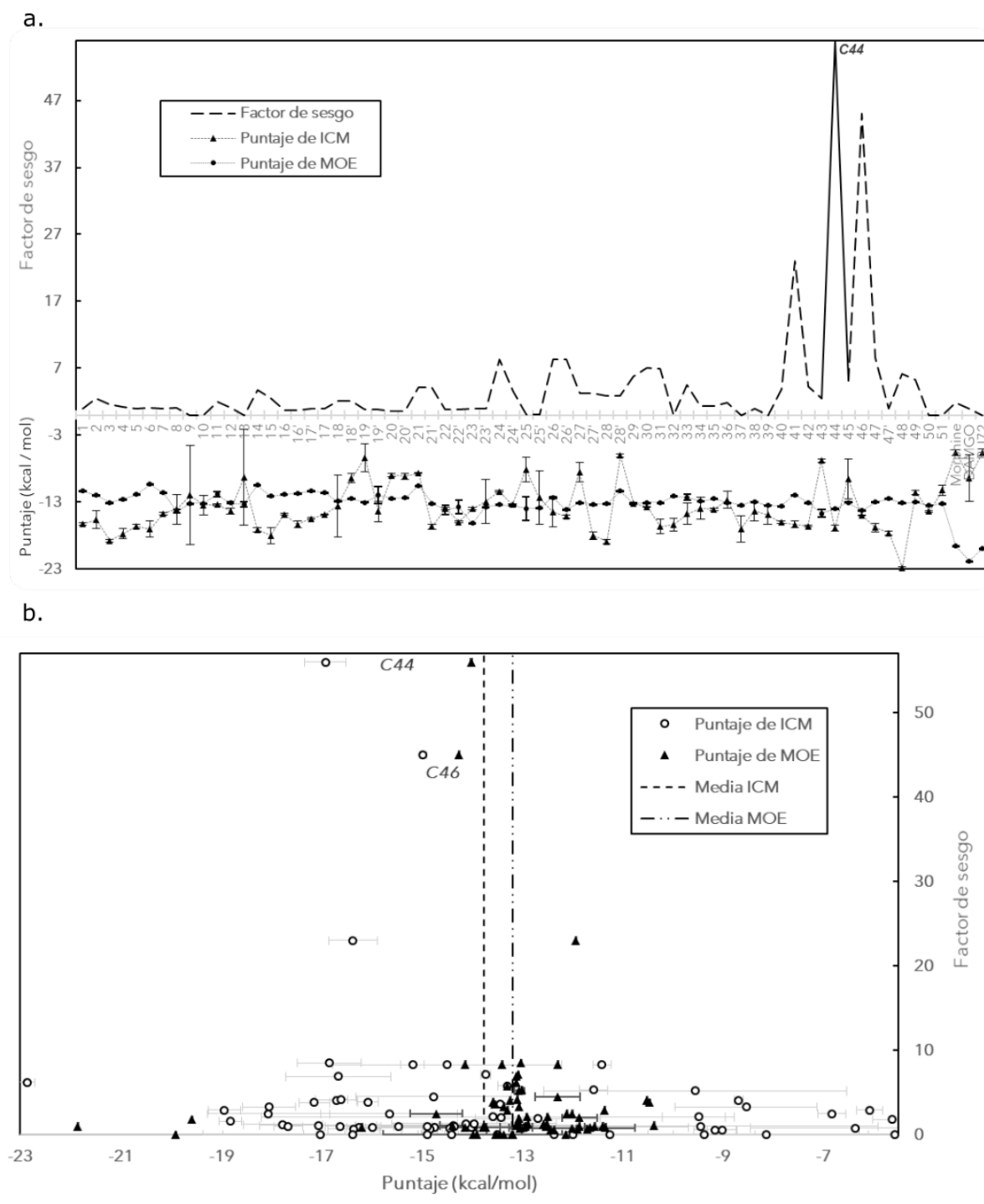


Figura 20. Puntajes de docking de los compuestos de tipo NBPB. a. Relación entre el factor de sesgo y los puntajes obtenidos del docking. Eje vertical superior contempla los datos de factor de sesgo (Tabla 8) mientras que el inferior contempla los puntajes de ambos softwares en el docking con su desviación estándar de las tres réplicas. b. Dispersión de los resultados obtenidos en el docking molecular, se hace la comparación del factor de sesgo contra el puntaje del grupo de ligandos sometidos al docking. Se destaca al compuesto 44 en ambos gráficos, mientras que el compuesto 46 solo en el gráfico b.

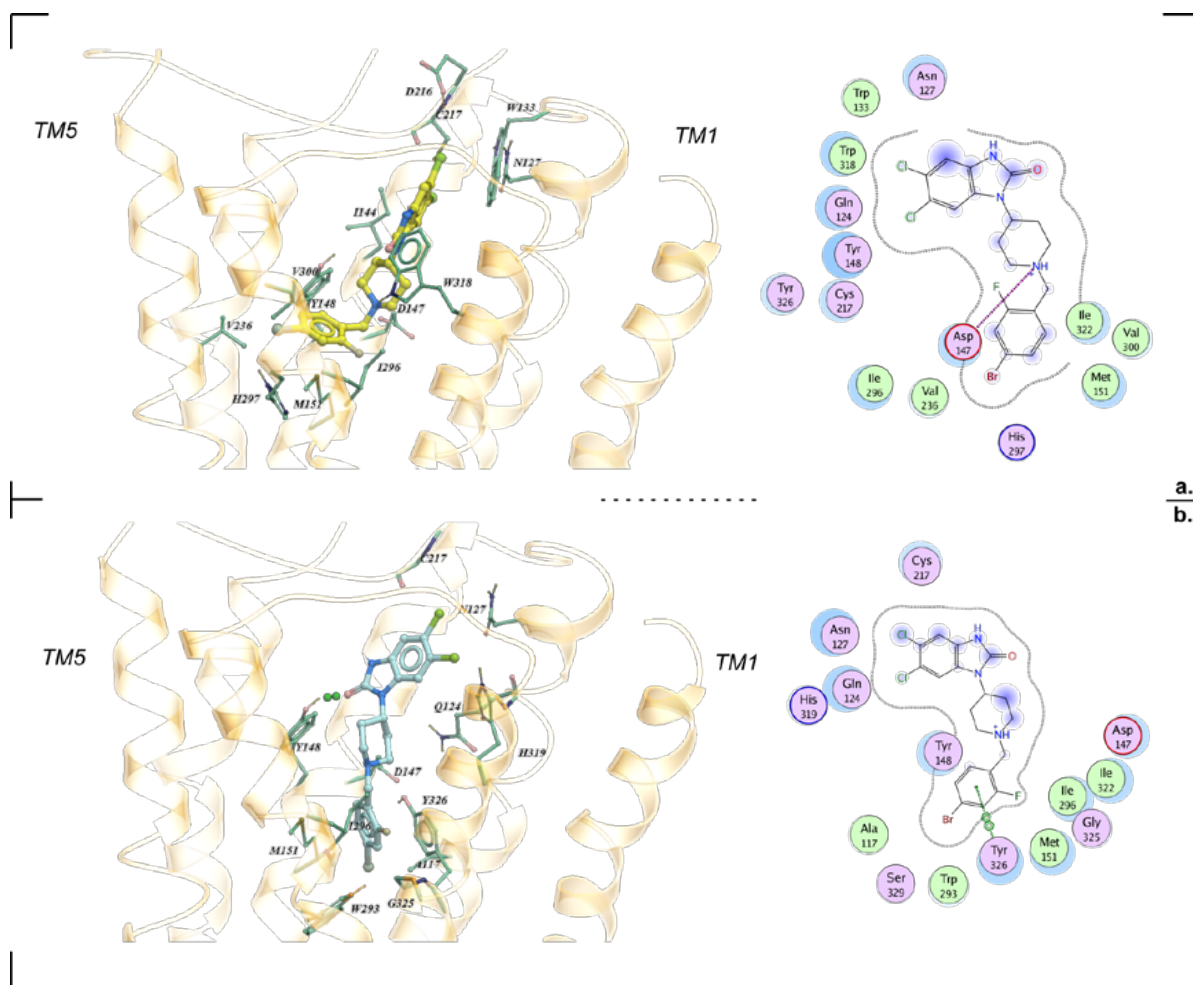


Figura 21. Resultados de docking para C44. Los resultados de las tres réplicas en un mismo software (MOE [a.] e ICM [b.]) resultaron muy similares, únicamente se muestra la pose que obtuvo un mejor puntaje. En la representación tridimensional, se grafica a C44 con amarillo en el resultado de MOE y con azul para ICM. Se muestran también los residuos con mayor cercanía al ligando. En la representación 2-D, el mapa de residuos fue fijado a un *cutoff* de 4.5 Å.

Los argumentos expuestos de los modelos de C44 en MOE e ICM los postularon a ambos como buenos candidatos para estudios posteriores en los trabajos de esta tesis. Sin embargo, se eligió el modelo de ICM, puesto que una de las incógnitas desarrolladas en nuestro grupo de investigación es la de evaluar la interacción y estabilidad del ligando al tener cercanía con el sitio alostérico del ion sodio. Por otra parte, el modelo de ICM tiene proximidad a residuos de TM2, TM3, ECL2 y ECL3, que, a pesar de no ser tan pronunciada como en el modelo de MOE, se puede evaluar la cercanía y estabilidad hacia estos residuos gracias a los estudios de dinámica molecular.

6.2 Dinámica molecular

De los estudios de docking molecular se obtuvieron las poses iniciales de los ligandos para estudiarlos mediante dinámica molecular. Este estudio se justifica en que las estructuras depositadas en el PDB han recibido un tratamiento que las coloca en un estado lo suficientemente estable como para poder registrar una estructura molecular “fija”. Sin embargo, diversos autores han destacado la importancia de los diferentes estados conformacionales de las proteínas, es decir, cómo la dinámica conformacional de estos es gran partidario a su función (mociones funcionales).

Para el sistema con morfina, fue seleccionado el modelo que tenía mayor similitud en el grupo morfínico hacia los ligandos de los que se tenía datos estructurales. Para herkinorina, se seleccionó la orientación a partir de trabajos previos en nuestro grupo de investigación en donde se estudiaba a este compuesto dentro del sitio activo de μ OR. Para C44, se seleccionó el modelo con las mejores características para indagar sobre el fenómeno de interacción con el sitio alostérico del ion sodio y con las fracciones extracelulares de μ OR.

En todos los sistemas se utilizó el receptor en su estado activo con el modelo estructural publicado en 2018 con PDB: 6DDE. Además, tuvieron el mismo sistema de coordenadas iniciales (receptor, membrana lipídica POPC/CHL, agua de hidratación, solvente y iones K^+Cl^-). Por otra parte, se evaluaron dos sistemas de C44, en donde difieren la presencia o ausencia de un ion Na^+ en las cercanías de D114^{2,50}. Este Na^+ ha sido descrito en diversos GPCRs de clase A con alta resolución al determinar su estructura, incluyendo el receptor a adenosina A_{2A} (W. Liu et al., 2012) y en DOR (Fenalti et al., 2014). Además, la interacción de un ligando sesgado con los residuos de este sitio alostérico ha sido propuesta como un factor relacionado con la selectividad funcional (Marmolejo-Valencia & Martínez-Mayorga, 2017). Para mayor descripción sobre la función del sodio y su sitio alostérico, consultar la sección **3.1.1.1**

6.2.1 Análisis de energía y RMSD

Se realizaron una serie de análisis para monitorear el proceso de la dinámica molecular. Las **Figuras 22-25** muestran el análisis de temperatura, presión, RMSD y energía cinética, potencial y total. Estos análisis son de utilidad para verificar una estabilidad linealidad en las variables de estado de la dinámica molecular, es decir, que no presenten fluctuaciones abruptas, lo que puede traducirse en desestabilización o pérdida de la ergodicidad. Se observa una estabilidad en las condiciones de muestreo establecidas. Por otra parte, el gráfico de RMSD muestra sobre la movilidad del esqueleto del receptor en comparación a una referencia, es importante verificar la ausencia de fluctuaciones bruscas y valores atípicos a lo largo de la dinámica molecular (Z. Zhang et al., 2003). Cabe destacar que la variabilidad de los valores de RMSD

disminuye al avanzar la dinámica molecular, traducido en que el espacio fase tiene menores desviaciones en las posiciones atómicas al avanzar hacia los 500 ns de simulación en la localidad de cada sistema.

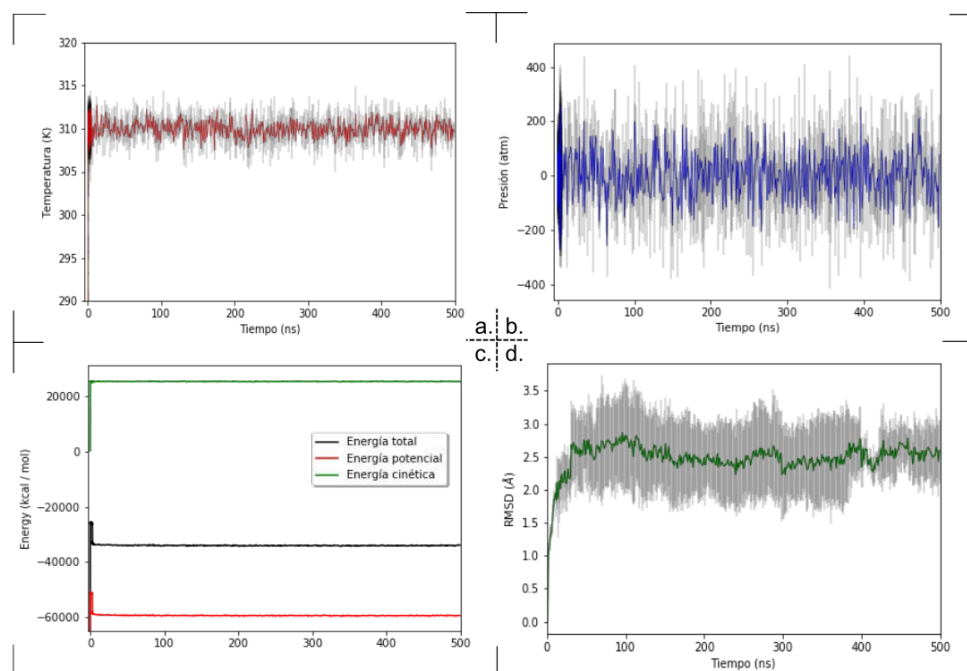


Figura 22. Gráficos de validación del sistema μ OR - Herkinorina. Los gráficos representativos corresponden a temperatura (a.), presión (b.), energía total, potencial y cinética (c.) y RMSD (d.) de los átomos del esqueleto de μ OR ($C\alpha$, N y C carbonilo), comparado con el primer *frame* de la dinámica molecular.

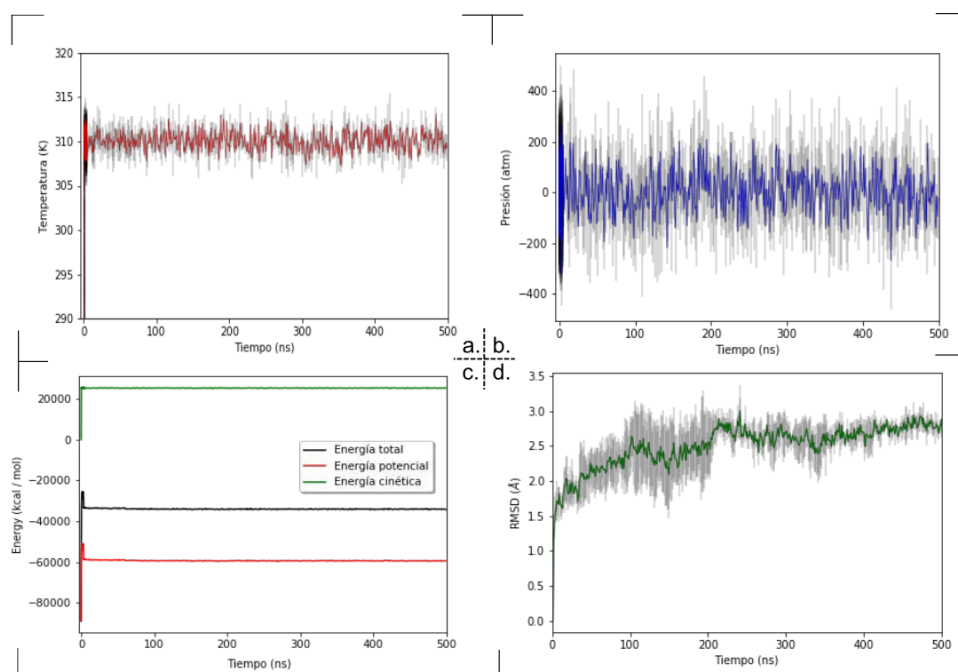


Figura 23. Gráficos de validación del sistema μ OR - Morfina. Los gráficos representativos corresponden a temperatura (a.), presión (b.), energía total, potencial y cinética (c.) y RMSD (d.) de los átomos del esqueleto de μ OR ($C\alpha$, N y C carbonilo), comparado con el primer *frame* de la dinámica molecular.

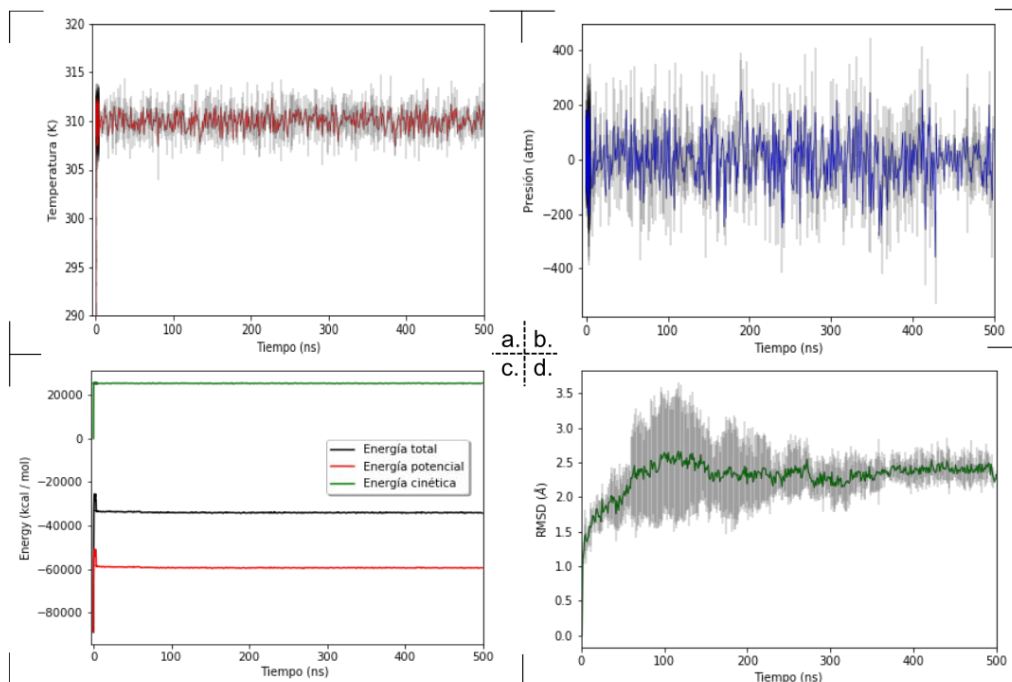


Figura 24. Gráficos de validación del sistema $\mu\text{OR} - \text{C44}$. Los gráficos representativos corresponden a temperatura (a.), presión (b.), energía total, potencial y cinética (c.) y RMSD (d.) de los átomos del esqueleto de μOR ($\text{C}\alpha$, N y C carbonilo), comparado con el primer *frame* de la dinámica molecular.

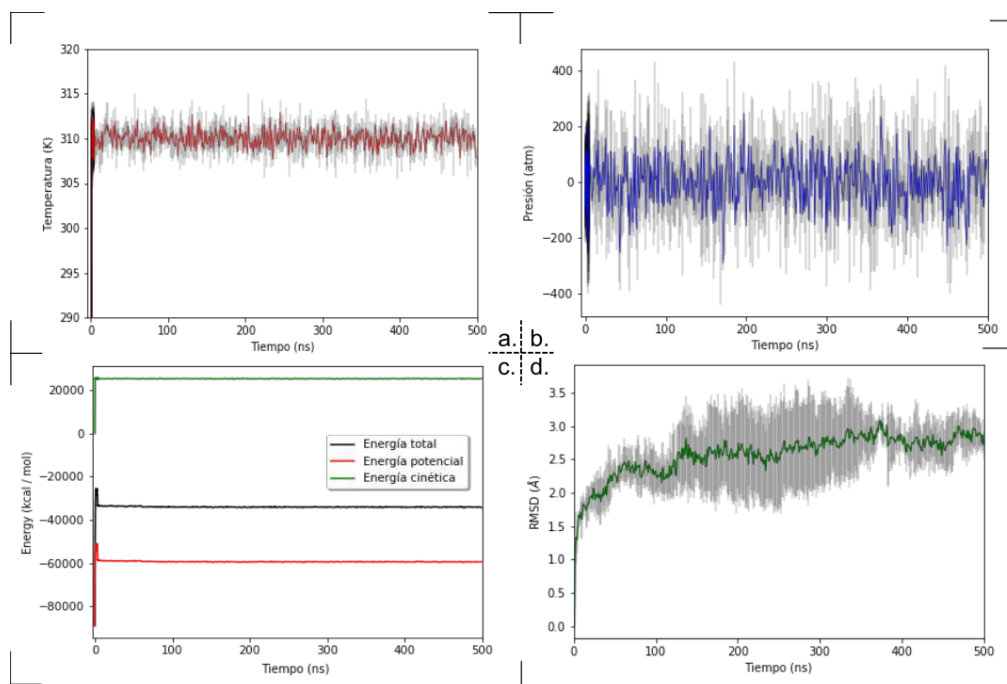


Figura 25. Gráficos de validación del sistema $\mu\text{OR} - \text{C44-Na}^+$. Los gráficos representativos corresponden a temperatura (a.), presión (b.), energía total, potencial y cinética (c.) y RMSD (d.) de los átomos del esqueleto de μOR ($\text{C}\alpha$, N y C carbonilo), comparado con el primer *frame* de la dinámica molecular.

6.2.2 Análisis temporal del complejo μ OR-ligando

Se calculó el RMSD de los ligandos, tomando en cuenta todos sus átomos, respecto a las coordenadas iniciales obtenidas del docking. La variación del RMSD de cada uno de los sistemas, así como las comparaciones de las estructuras se muestran en la **Figura 26**, además de que se ilustran las orientaciones del ligando antes y al finalizar la dinámica. A pesar de no encontrar casos donde el ligando haya dado un giro completo en sus ejes x , y o z , se puede observar que algunos grupos funcionales, tanto en las fracciones extra como intracelulares de μ OR, han hecho un cambio en su disposición hacia el receptor.

Se observó que el ligando con valores más pequeños de RMSD a lo largo de la dinámica es morfina, con un valor medio de 0.25 Å y fluctuaciones de 0.1 Å aproximadamente (**Figura 26.2.a**), mientras la que tuvo mayores valores fue C44 - Na⁺ (**Figura 26.4.a**) (Pert et al., 1973). Por otra parte, en el sistema de herkinorina, dos de las tres repeticiones mantuvieron, en general, el grupo C2-benzoiloxi en el lugar donde se emplazó el sodio en la dinámica molecular de C44 - Na⁺. En la sección **3.1.1.1**, se hace mención sobre la función del sodio alostérico y el posible papel del sitio de unión dentro de la señalización sesgada en GPCRs. Particularmente, el rol de N131^{3.35} en DOR (N150^{3.35} en μ OR), el cual participa en la coordinación del Na⁺ (Fenalti et al., 2014). La sustitución de este residuo resulta en, ya sea disminución (N^{3.35V}) o pérdida (N^{3.35A}) del efecto alostérico del sodio en la unión al ligando, mientras la actividad constitutiva del receptor hacia β -arrestina se veía aumentada. Un efecto similar se observó en la conversión de agonistas débiles/antagonistas a agonistas a la vía de β -arrestina al evaluarlos con la mutante D95^{2.50A} en DOR (D114^{2.50} en μ OR). Estos estudios apuntan a que una completa disrupción de interacción entre N131^{3.35} y D95^{2.50} con Na⁺ puede inducir altos niveles, ya sea constitutivos o dependientes de agonista, hacia la vía de las β -arrestina. Estudios previos en nuestro grupo de investigación (Marmolejo-Valencia & Martínez-Mayorga, 2017) y el presente trabajo, localizan al grupo C2-benzoiloxi de herkinorina cercano a estos residuos del sitio alostérico del sodio (**Figura 27**), lo que sugiere la interacción con estos residuos, en ausencia de sodio, como un posible mecanismo determinante para la señalización sesgada a proteína G. Se comentará más sobre el Na⁺ y su sitio alostérico en secciones posteriores.

Las dinámicas moleculares con morfina mostraron pequeños cambios del ligando dentro del sitio de unión (**Figura 27**). Esto puede indicar que el modelo de unión del docking molecular en este sistema tiene estabilidad, al menos para el ligando, puesto que (**Figura 23**) se observa un aumento ligeramente progresivo a partir de los 300 ns en el RMSD del esqueleto proteico. La estabilidad de morfina dentro del sitio de unión en estudios de dinámica molecular se ha descrito previamente (P. F. J. Lipiński et al.,

2019; Sader et al., 2018). Sin embargo, cabe destacar que se observó que los cambios sutiles que la morfina tenía eran hacia adentro de la cavidad del receptor, permitiendo la interacción con residuos como W293^{6.48} y Y326^{7.43}. Estudios previos donde se simulaba a morfina sin el sodio alostérico presentó la misma tendencia (Marmolejo-Valencia & Martínez-Mayorga, 2017) lo que implica una preferencia de la morfina a interactuar con residuos en posiciones profundas dentro de la cavidad del receptor. La exploración de diferentes espacios conformacionales del ligando en el sitio de unión podría conllevar a otros estados de activación del receptor, sin embargo, estos análisis quedan fuera del alcance de este trabajo.

Se observa que el RMSD de C44 en presencia de sodio (**Figura 26.4.a**) adopta valores mayores a partir de los 250 ns aproximadamente, en comparación con el sistema sin sodio (**Figura 26.3.a**). Además, se observa una mayor variabilidad al comparar las tres repeticiones, especialmente en un lapso de muestreo entre los 300 y 400 ns. Esto refleja una pobre estabilidad del ligando dentro del sitio de unión. Por otra parte, cabe destacar la orientación del grupo *N*-bencil dihalogenado en ambos sistemas. En el caso del sistema con sodio, desde el inicio de la simulación de dinámica molecular se observó una tendencia del grupo *N*-bencil dihalogenado a interactuar con residuos lejanos al sitio alostérico del sodio, mostrando orientaciones similares a las observadas a las mostradas en **Figura 26.4.c**. Caso contrario en el sistema sin sodio, el cual denota mayor estabilidad durante lapsos más largos dentro de la dinámica molecular, además de emplazar el grupo *N*-bencil dihalogenado con mayor cercanía al sitio alostérico del sodio. La cercanía hacia dicho sitio alostérico no es tan frecuente como con herkinorina, puesto que presenta pocos periodos de contacto con los residuos N^{3.35}, D^{3.39}, o S^{3.39} (**Figura 28**), siendo la primera capa de interacción del sodio alostérico en receptores opioides.

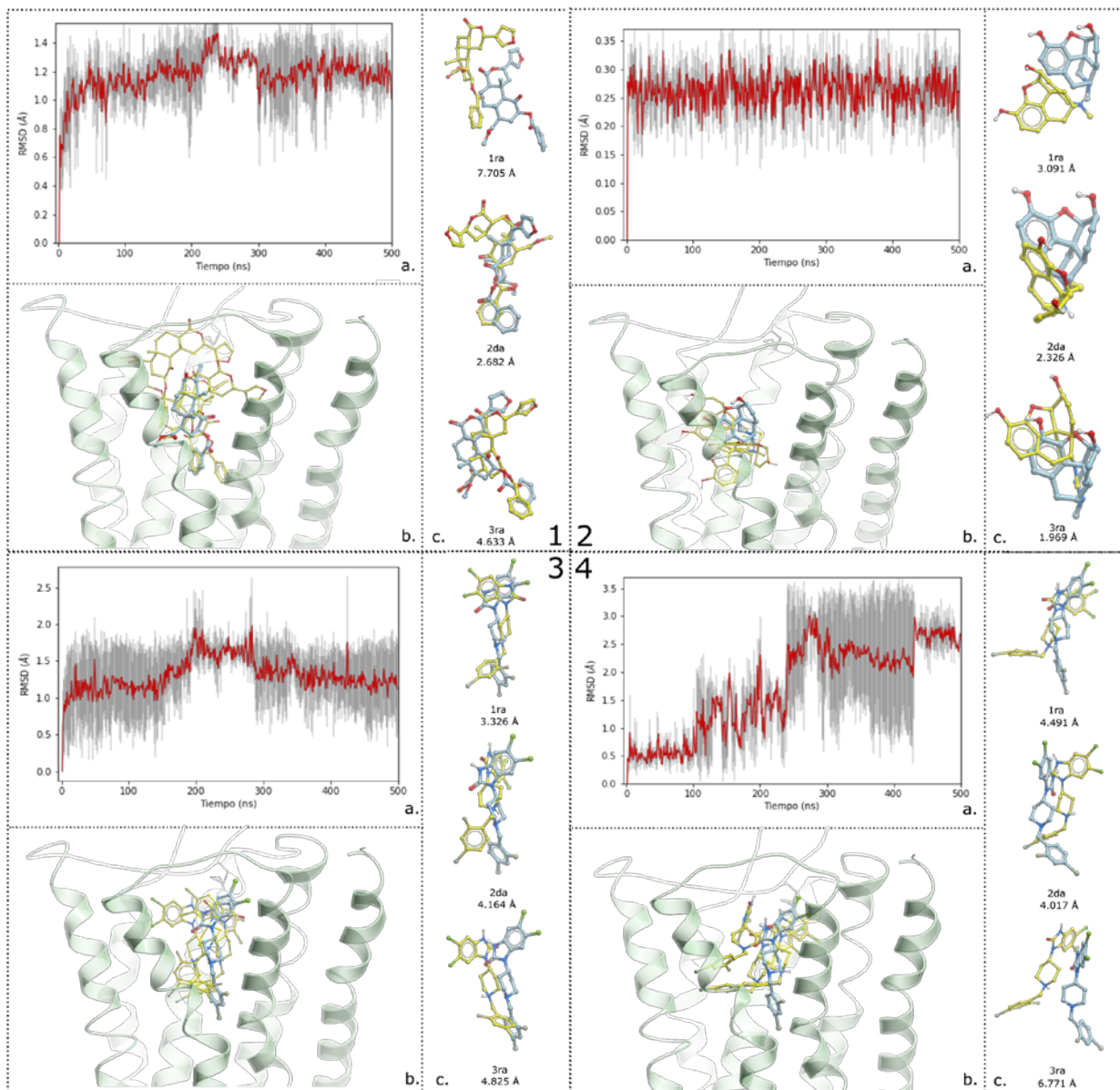


Figura 26. Evolución temporal de ligandos en el sitio de unión de μ OR. Herkinorina, Morfina, C44 y C44-Na⁺ (1, 2, 3 y 4, respectivamente). Se ilustra el RMSD (a.) en el tiempo referidos con el punto inicial de los 500 ns de la dinámica molecular, después de las diez etapas de equilibrio. Además, se muestran las estructuras finales de cada repetición (b., c.) de la posición elegida del docking (azul) contra la orientación tras 500 ns de simulación de cada repetición (amarillo) y RMSD en Angstroms debajo de cada comparación.

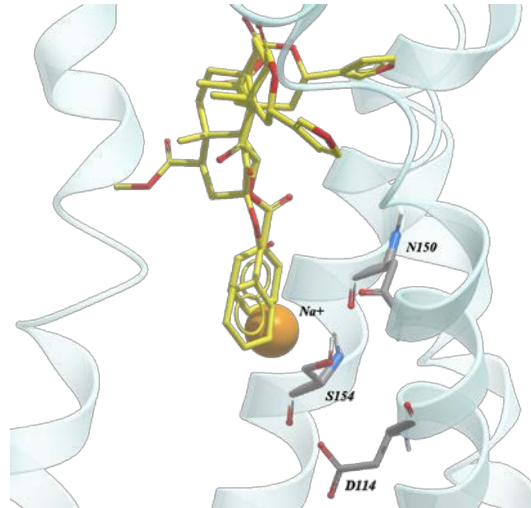


Figura 27. Disposición del ion Na^+ (naranja) de la dinámica de C44 con sodio. Se ilustra a las dos repeticiones de herkinorina (amarillo) con permanencia en el sitio alostérico del sodio y a los residuos de la primera capa de interacción del sodio alostérico (gris)

6.2.3 Análisis de interacción proteína-ligando

Para analizar los cambios conformacionales de los diferentes ligandos que se evaluaron dentro del sitio de unión, se realizaron una serie de análisis de interacción ligando-proteína. Este tipo de análisis son una de las principales ventajas que otorgan los estudios teóricos de modelado molecular y tienen uso común dentro del estudio computacional de biomacromoléculas (Kaye et al., 2006; W. Li, 2020).

Como parte de la búsqueda de un perfil de interacción que nos permita diferenciar el comportamiento de ligandos sesgados (herkinorina y C44) en comparación de ligandos balanceados (morfina), se desarrollaron una serie de algoritmos, además de incorporar código previamente producido en el grupo del Dr. Rogelio Rodríguez-Sotres, con el objetivo de trazar las interacciones que pudieran tener los ligandos dentro de un límite de distancia predefinido a lo largo de la dinámica molecular. En la **Figura 28** se resume el análisis de contactos con un enfoque acumulativo, donde el alto de la barra indica la probabilidad de que el ligando estuvo a menos de 4.0 \AA de distancia de alguno de los residuos trazados en el gráfico a lo largo de toda la simulación.

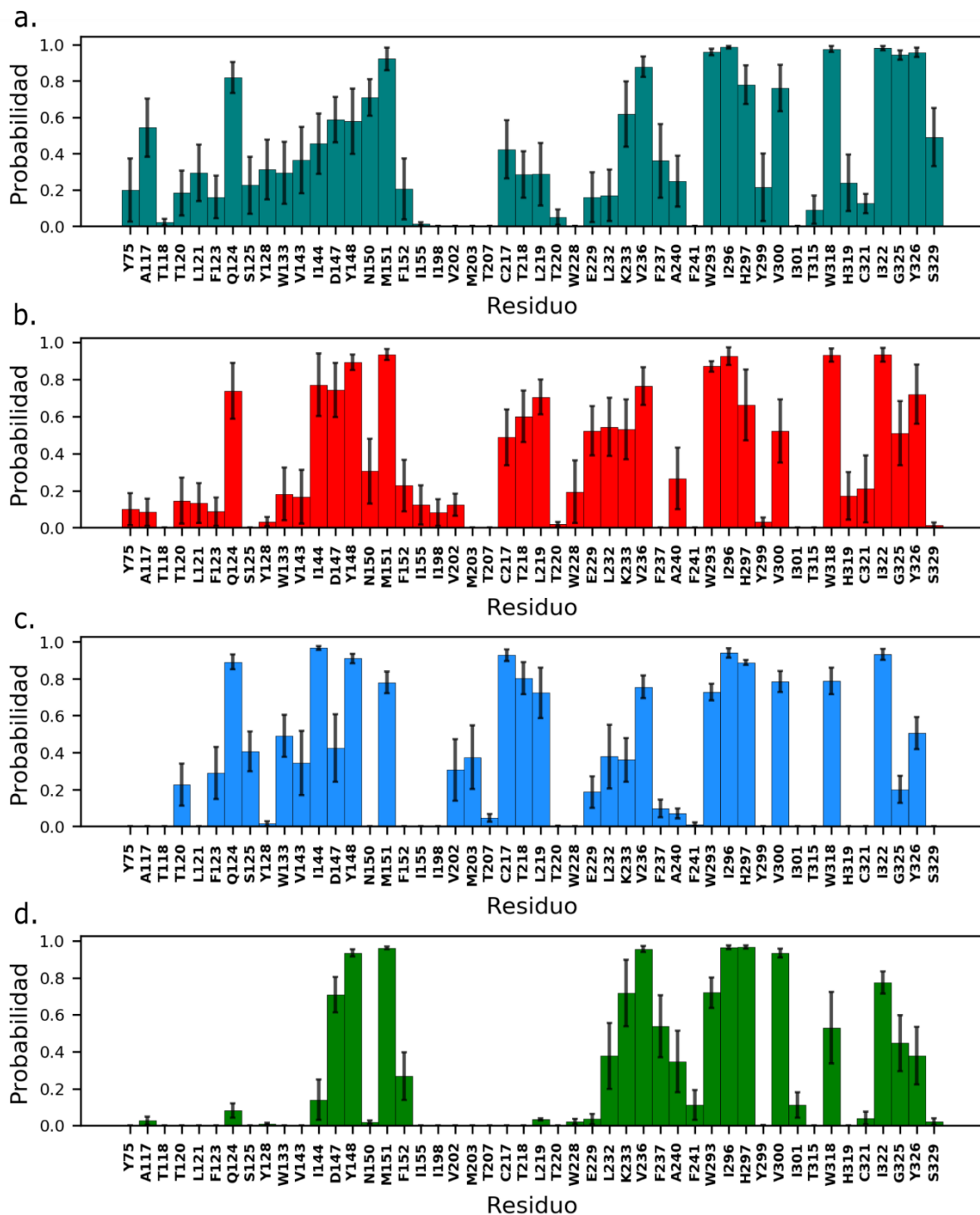


Figura 28. Probabilidad de contacto del ligando a residuos de μ OR a una distancia de menos de 4.0 Å. a. Herkinorina, b. C44, c. C44-Na+, d. Morfina. El 100% es considerado el total de la dinámica. El límite de 4.0 Å es señalado hacia cualquier átomo del ligando.

Un hallazgo a destacar de la **Figura 28** es que el número de barras es mayor en los sistemas de agonistas sesgados (**Figura 28**, incisos a, b, c), en comparación con

agonista balanceado (**Figura 28.d**). Esto refuerza la idea de que los agonistas sesgados tienen un perfil de interacción diferente al compararlos con agonistas balanceados, o al menos, como se ilustra en este caso, con morfina.

Podemos destacar a los residuos previos a V143 (Y75^{1.39}, A117^{2.53}, T120^{2.56}, L121^{2.57}, F123^{2.59}, Q124^{2.60}, S125^{2.61}, Y128^{2.64}, W133^{ECL1}, V143^{3.28}). Dichos residuos presentan una probabilidad de contacto promedio diferenciable de los ligandos sesgados al balanceado (morfina). Este grupo abarca desde la región transmembranal de TM2 hasta residuos de la región extracelular de TM3, pasando por el ECL1 (**Figura 29**).

Nota:

La metadinámica forma parte de las herramientas de muestreo acelerado, las cuales buscan explorar la mayor cantidad de mínimos de energía locales de un sistema.

Del residuo Y75^{1.39}, existen evaluaciones mediante el uso de simulaciones de metadinámica donde derivados de salvinorina A presentan interacciones con dicho residuo (Crowley et al., 2016). Sin embargo, este último estudio difiere en la orientación de casi todas las poses propuestas para los derivados de salvinorina A en comparación con las obtenidas en este trabajo. Se encuentra una ligera similitud entre una de las poses de herkinorina (llamado compuesto **2** en el estudio referenciado) y las obtenidas en este trabajo. Esta similitud se describe por las orientaciones del grupo furano y fenil, aunque algunas diferencias producen que el compuesto **2** (herkinorina), privándose de la interacción con W293^{6.48}, mientras que, en nuestro modelo, la probabilidad de contacto con este residuo es de 0.961 ± 0.038 (**Figura 28.a**).

En el caso de los residuos W318^{7.35} y H319^{7.36}, aunque no parecen tener una diferencia contundente con ligandos sesgados y balanceados, podrían ser buenos candidatos a evaluación de sus mutantes en ensayos de señalización sesgada, toda vez que existe evidencia de su participación en la afinidad frente a distintos ligandos de tipo morfínico y no-morfínicos (Bonner et al., 2000; Cong et al., 2015b; H. Xu et al., 1999).

Respecto al residuo N150^{3.35}, se observa que es el único residuo del sitio alostérico del sodio que presenta interacción con los ligandos herkinorina y C44 sin sodio (**Figura 28.a y b**) con una probabilidad de 0.709 ± 0.199 y 0.304 ± 0.349 , respectivamente. Los residuos de este sitio (N150^{3.35}, D114^{2.50} y S154^{3.39}) resultan de interés para el agonismo sesgado en receptores opioides puesto que se ha hipotetizado que su interacción, una vez traslocado el sodio alostérico, puede propiciar una señalización sesgada. Esta hipótesis se basa en los estudios en DOR donde los mutantes N^{3.35}V y N^{3.35}A disminuyen o anulan (respectivamente) la actividad constitutiva del receptor hacia β -arrestina2. En la simulación de C44 - Na⁺ no se hallaron contactos del ligando con el sitio de sodio alostérico, puesto que el sodio ocupa este sitio durante la simulación, además de presentar una constante interacción con los residuos N150^{3.35}, S154^{3.39} y D114^{2.50}. Un siguiente paso

podría ser la mutación de estos dos residuos del sitio alostérico del sodio en μ OR y evaluar su actividad frente a los ensayos de señalización a proteína G (cAMP o $[S^{35}]GTP$) y a β -arrestina2.

Prosiguiendo con el análisis, los residuos C217^{ECL2}, T218^{ECL2} y L219^{ECL2}, son otro grupo que destaca en las interacciones presentes en agonistas sesgados y ausentes en morfina. En general, las simulaciones que tienen a C44 como ligando (**Figura 28.b y 28.c**) tienen mayor probabilidad de contacto, además de menor variación entre las simulaciones, en comparación con herkinorina. Estos hallazgos coinciden con la previamente mencionada “región de vestíbulo” y con los estudios de docking molecular realizados por Madariaga y colaboradores en 2017 (Madariaga-Mazón et al., 2017a), los cuales identifican regiones extracelulares del receptor, que involucran a TM2 (Q124^{2.60}), ECL1 (W133) y ECL2 (D217, T218 y L219) como zonas de preferencia de agonistas sesgados, y no observadas en agonistas clásicos. Uno de los posibles pasos a seguir puede enfocarse en la evaluación de una mayor cantidad de agonistas sesgados y balanceados para comprobar si esta hipótesis se cumple para la mayor parte de ellos.

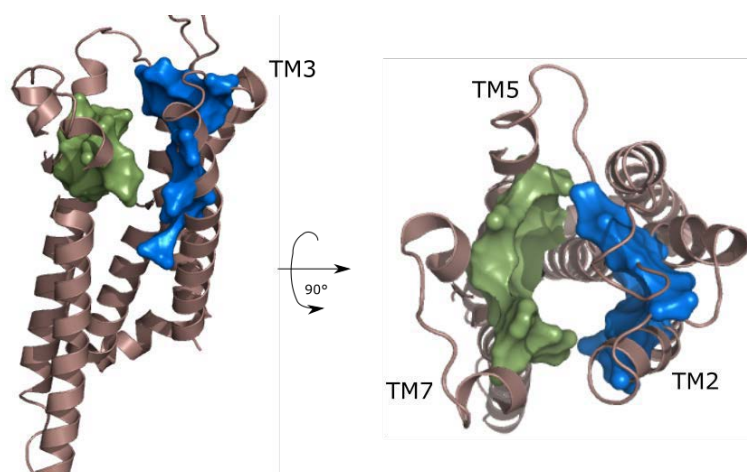


Figura 29. Modo de unión de ligandos sesgados (herkinorina y C44) (azul) y morfina (verde). TM1 y parte de TM7 fueron omitidos con propósitos ilustrativos. Cabe destacar que los agonistas sesgados también realizaron interacciones con los residuos representados en la superficie verde.

6.2.4 Análisis de agrupamiento (*clustering*) y componentes principales

En la sección de 2.1, se discute el fenómeno de interacción entre un GPCR y las proteínas efectoras. Resulta importante destacar que el concepto de que un agonista desencadena una sola vía de señalización (y posterior efecto biológico) se vuelve insuficiente, puesto que la información sobre flexibilidad conformacional (Kobilka & Deupi, 2007) y el espectro de estados energéticos de los GPCRs (Vaidehi & Kenakin,

2010) abre un panorama mucho más amplio sobre su funcionalidad (Wingler et al., 2019).

Dentro de las múltiples conformaciones que adopta un receptor, pueden existir algunas que presentan mayor afinidad hacia una proteína efectora (lo que enriquece el concepto de agonismo sesgado, al involucrar la interacción proteína-ligando). Para el caso de μ OR, escasa literatura aporta información que haga referencia a un estado conformacional del receptor con una subsecuente señalización (ya sea a proteína G o a β -arrestina2). Por tanto, se desarrolló un algoritmo basado en agrupamiento por *k-means*, que permitió obtener estructuras promedio de los carbonos α como centroides y así, identificar si los sistemas con agonistas sesgados adoptan una mayor similitud estructural en conjunto, en comparación del sistema con morfina, que es un agonista balanceado (**Figura 30**).

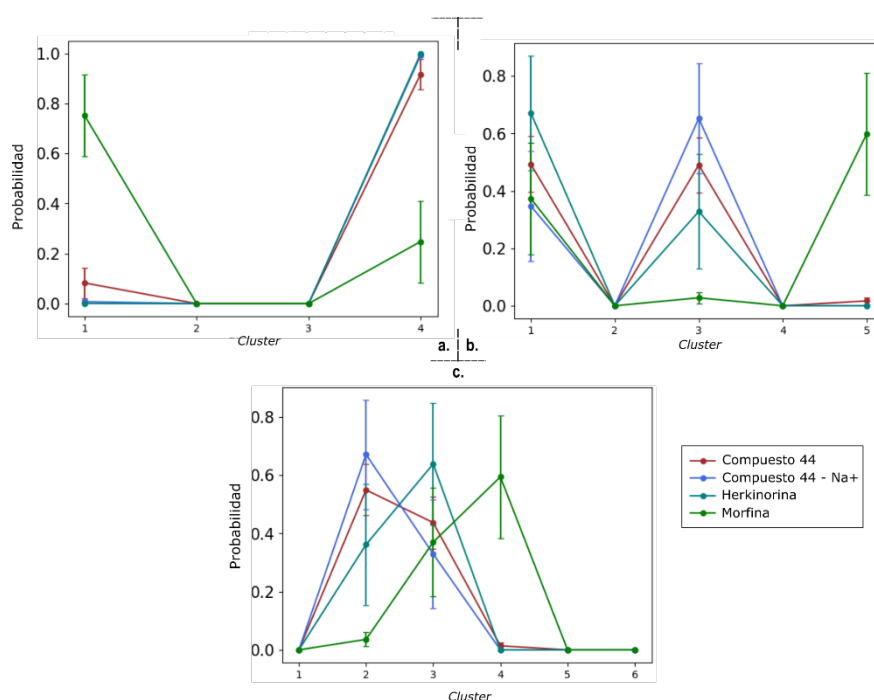


Figura 30. Clustering de las conformaciones de los carbonos α en los diferentes sistemas. Se muestran resultados con cuatro(a.), cinco(b.) y seis(c.) centroides. El algoritmo utilizado fue *k-means*. Se realizó el análisis con diferentes números de centroides para no sesgar el resultado hacia un número limitado de grupos.

En la **Figura 30**, se resume el análisis de agrupamiento. Se puede observar un patrón común en los diferentes gráficos, el cual ubica a las conformaciones de morfina en un grupo distinto al de los ligandos sesgados herkinorina, C44 y C44 con sodio. Esto es, en el análisis con cuatro centroides (**Figura 30.a**), se observa una predominancia de conformaciones del sistema de morfina en el grupo uno, mientras que los sistemas con ligandos sesgados (inclusive con ion sodio alostérico) se ubican mayoritariamente

en cercanía al grupo cuatro. Se puede observar un comportamiento parecido en los análisis con cinco y seis centroides (**Figura 30.b, 30.c**, respectivamente). Esto indica que el sistema de morfina está adquiriendo conformaciones del esqueleto proteico que difieren de las halladas en los sistemas de ligandos sesgados. Cabe destacar que el centroide no es como tal una estructura física (J.-H. Peng et al., 2018), si no un promedio geométrico de cada grupo o *cluster*. El algoritmo desarrollado permite obtener esta estructura promedio geométrica permitiendo conocer la estructura conformacional más cercana al centroide. El análisis y comparación de estas diferentes estructuras más cercanas a cada centroide queda fuera del alcance de esta tesis. Sin embargo, existen algunos estudios en el receptor de angiotensina 2 tipo 1 (AT₁R) (Suomivuori et al., 2020) que realizan un análisis similar, adentrándose en las diferencias de residuos control y su comportamiento frente a agonistas sesgados mediante simulación de dinámica molecular.

Para poder dar una idea inicial sobre qué tan distantes son los movimientos colectivos de los diferentes sistemas, se realizó un análisis de componentes principales en los carbonos α dando como entrada el conjunto de todas las trayectorias de nuestros sistemas (**Figura 31**). Este análisis permite capturar la mayor variación de movilidad en una selección de átomos, lo que permite identificar mociones conjuntas, además de poder tratar de llegar a una misma conclusión con el apoyo de técnicas de *clustering* (Wolf & Kirschner, 2013).

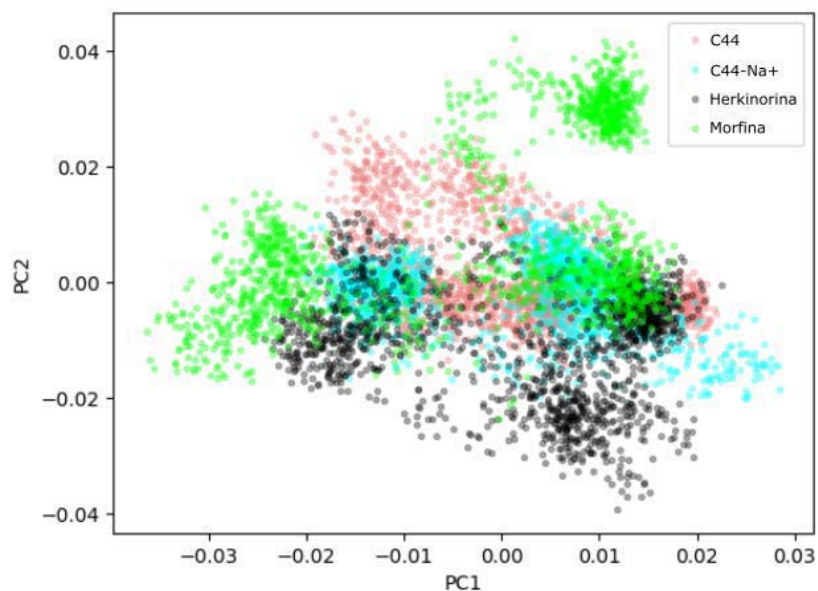


Figura 31. Análisis de componentes principales de los carbonos α en las simulaciones de dinámica molecular de μ OR.

El análisis de componentes principales (**Figura 31**) toma las tres repeticiones de cada sistema para poder hallar una estructura promedio, para después trazar cada una de las conformaciones del esqueleto proteico a través de su proyección en los primeros dos componentes principales. Dicho esto, se observa que dos de las dinámicas moleculares de morfina se ubican en zonas de proyección diferentes, lo que se traduce en movimientos conjuntos diferentes del esqueleto proteico. En este caso, se llega a una conclusión similar en comparación con la **Figura 30**, el cual apunta hacia la diferenciación estructural del esqueleto proteico del receptor al interactuar con agonistas sesgados y no sesgados, estos resultados pueden ser de apoyo para futuros análisis estructurales de μ OR.

CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

En este trabajo se lograron identificar patrones de interacción ligando-receptor característicos para agonistas balanceados y sesgados en MOR. La morfina, fue estudiada como prototipo de ligando balanceado, y las moléculas herkinorina y C44, fueron estudiadas por su marcado agonismo sesgado. Las metodologías empleadas fueron acoplamiento molecular y simulaciones de dinámica molecular.

Los aminoácidos que caracterizan las interacciones con los ligandos sesgados en este estudio, están distribuidos principalmente en las hélices transmembranales TM2 (Q124^{2.60}), TM3 (N150^{3.35}), y TM7 (W318^{7.35}, H319^{7.36}) así como en el asa extracelular 2 (C217^{ECL2}, T218^{ECL2}, L219^{ECL2}). A excepción de los residuos en TM7, la participación de estos residuos se ha descrito previamente en la señalización sesgada. Por lo tanto, este estudio permitió proponer por primera vez a los residuos W318^{7.35} y H319^{7.36} como parte del grupo de aminoácidos involucrados en esta señalización. Además, los residuos Q124^{2.60}, C217^{ECL2}, T218^{ECL2} y L219^{ECL2} se encuentran en la “región de vestíbulo”, una región extracelular de MOR que se ha propuesto como una zona de alta incidencia en agonistas sesgados y de nula estadía para agonistas balanceados.

Adicionalmente, los resultados obtenidos en este trabajo evidenciaron la participación de N150^{3.35} en la señalización sesgada, la cual ha sido reportada previamente en nuestro grupo de investigación y en estudios de mutagénesis de DOR.

El agonista sesgado C44 mostró claramente interacciones con aminoácidos asociados a la señalización sesgada, identificados previamente en estudios experimentales, validando así nuestros resultados teóricos. Las diferencias entre los núcleos estructurales de herkinorina y C44 permiten, a priori, sugerir puntos farmacofóricos que pudieran influenciar la activación sesgada. Esto podrá ser abordado mediante análisis de relaciones estructura-actividad de análogos de herkinorina y C44.

El análisis de agrupamiento mostró que existen diferencias en las conformaciones del MOR adoptadas entre los sistemas con agonistas sesgados y con agonistas balanceados. Dicha conclusión fue apoyada mediante análisis de componentes principales. Estos resultados destacan la propuesta de que los GPCRs adoptan diferentes conformaciones

cuando son activados, y que, cuando un ligando es capaz de dirigir al receptor a una cierta conformación, produce una señalización sesgada. De lo anterior, se desprende la propuesta de una conformación común presente en los sistemas ligando-receptor con agonistas sesgados.

El presente trabajo contribuye al conocimiento estructural de MOR y de su interacción con ligandos que activan al receptor. Esta información es útil para establecer las bases estructurales que gobiernan la activación sesgada de este receptor. Los agonistas sesgados de MOR están cobrando gran relevancia farmacológica, ya que están mostrando efecto analgésico con menores efectos adversos.

La información aquí presentada permitirá dirigir estudios enfocados en relaciones estructura-actividad, búsqueda del farmacóforo en el agonismo sesgado en MOR y la evaluación experimental del mecanismo de activación sesgada. Además, partiendo de las ideas presentadas sobre los análisis de agrupamiento y PCA, estudios posteriores pueden orientarse a la proposición de una conformación común presente en los sistemas con agonistas sesgados.

Bibliografía

- Abagyan, R., Totrov, M., & Kuznetsov, D. (1994). ICM—A new method for protein modeling and design: Applications to docking and structure prediction from the distorted native conformation. *Journal of Computational Chemistry*, *15*(5), 488–506. <https://doi.org/10.1002/jcc.540150503>
- Allouche, S., Noble, F., & Marie, N. (2014). Opioid receptor desensitization: Mechanisms and its link to tolerance. In *Frontiers in Pharmacology* (Vol. 5, Issue DEC, p. 280). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fphar.2014.00280>
- An, J., Totrov, M., & Abagyan, R. (2005). Pocketome via comprehensive identification and classification of ligand binding envelopes. *Molecular and Cellular Proteomics*, *4*(6), 752–761. <https://doi.org/10.1074/mcp.M400159-MCP200>
- Bajorath, J. (2002). Integration of virtual and high-throughput screening. In *Nature Reviews Drug Discovery* (Vol. 1, Issue 11, pp. 882–894). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nrd941>
- Ballesteros, J. A., & Weinstein, H. (1995). Integrated methods for the construction of three-dimensional models and computational probing of structure-function relations in G protein-coupled receptors. *Methods in Neurosciences*, *25*(C), 366–428. [https://doi.org/10.1016/S1043-9471\(05\)80049-7](https://doi.org/10.1016/S1043-9471(05)80049-7)
- Bartuzi, D., Kaczor, A. A., & Matosiuk, D. (2015). Activation and Allosteric Modulation of Human μ Opioid Receptor in Molecular Dynamics. *Journal of Chemical Information and Modeling*, *55*(11), 2421–2434. <https://doi.org/10.1021/acs.jcim.5b00280>
- Bermudez, M., Bock, A., Krebs, F., Holzgrabe, U., Mohr, K., Lohse, M. J., & Wolber, G. (2017). Ligand-Specific Restriction of Extracellular Conformational Dynamics Constrains Signaling of the M2 Muscarinic Receptor. *ACS Chemical Biology*, *12*(7), 1743–1748. <https://doi.org/10.1021/acscchembio.7b00275>
- Bermudez, M., Nguyen, N., Omieczynski, C., & Wolber, G. (2019). Strategies for the discovery of biased GPCR ligands. *Drug Discovery Today*, *24*(4). <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2019.02.010>
- Black, J. W., & Leff, P. (1983). Operational models of pharmacological agonism. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B. Biological Sciences*, *220*(1219), 141–162. <https://doi.org/10.1098/rspb.1983.0093>
- Böhm, H. J. (1994). The development of a simple empirical scoring function to estimate the binding constant for a protein-ligand complex of known three-dimensional structure. *Journal of Computer-Aided Molecular Design*, *8*(3), 243–256. <https://doi.org/10.1007/BF00126743>
- Bohn, L. M., Lefkowitz, R. J., Gainetdinov, R. R., Peppel, K., Caron, M. G., & Lin, F. T. (1999). Enhanced morphine analgesia in mice lacking β -arrestin 2. *Science*, *286*(5449), 2495–2498. <https://doi.org/10.1126/science.286.5449.2495>
- Bolcato, G., Cuzzolin, A., Bissaro, M., Moro, S., & Sturlese, M. (2019). Can We Still Trust Docking Results? An Extension of the Applicability of DockBench on PDBbind Database. *International Journal of Molecular Sciences*, *20*(14), 3558. <https://doi.org/10.3390/ijms20143558>
- Bonner, G., Meng, F., & Akil, H. (2000). Selectivity of μ -opioid receptor determined by interfacial residues near third extracellular loop. *European Journal of Pharmacology*, *403*(1–2), 37–44. [https://doi.org/10.1016/S0014-2999\(00\)00578-1](https://doi.org/10.1016/S0014-2999(00)00578-1)
- Capper, M. J., & Wacker, D. (2018). Structural Biology: A complex story of receptor signalling. In *Nature* (Vol. 558, Issue 7711, pp. 529–530). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/d41586-018-05503-4>
- Che, T., Majumdar, S., Zaidi, S. A., Katritch, V., Wacker, D., & Correspondence, B. L. R. (2018). *Structure*

- of the Nanobody-Stabilized Active State of the Kappa Opioid Receptor In Brief Data Resources 6B73. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.12.011>
- Chen, C., Yin, J., Kim de Riel, J., DesJarlais, R. L., Raveglia, L. F., Zhu, J., & Liu-Chen, L. Y. (1996). Determination of the amino acid residue involved in [^3H] β -funaltrexamine covalent binding in the cloned rat μ opioid receptor. *Journal of Biological Chemistry*, *271*(35), 21422–21429. <https://doi.org/10.1074/jbc.271.35.21422>
- Cheng, J. X., Cheng, T., Li, W. H., Liu, G. X., Zhu, W. L., & Tang, Y. (2018). Computational insights into the G-protein-biased activation and inactivation mechanisms of the μ opioid receptor. *Acta Pharmacologica Sinica*, *39*(1), 154–164. <https://doi.org/10.1038/aps.2017.158>
- Ciancetta, A., Cuzzolin, A., & Moro, S. (2014). Alternative quality assessment strategy to compare performances of GPCR-ligand docking protocols: The human adenosine A2A receptor as a case study. *Journal of Chemical Information and Modeling*, *54*(8), 2243–2254. <https://doi.org/10.1021/ci5002857>
- Cong, X., Campomanes, P., Kless, A., Schapitz, I., Wagener, M., Koch, T., & Carloni, P. (2015a). Structural determinants for the binding of morphinan agonists to the μ -opioid receptor. *PLoS ONE*, *10*(8), 1–15. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0135998>
- Cong, X., Campomanes, P., Kless, A., Schapitz, I., Wagener, M., Koch, T., & Carloni, P. (2015b). Structural Determinants for the Binding of Morphinan Agonists to the μ -Opioid Receptor. *PLOS ONE*, *10*(8), e0135998. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0135998>
- Connor, M., Bagley, E. E., Chieng, B. C., & Christie, M. J. (2015). β -Arrestin-2 knockout prevents development of cellular μ -opioid receptor tolerance but does not affect opioid-withdrawal-related adaptations in single PAG neurons. *British Journal of Pharmacology*, *172*(2), 492–500. <https://doi.org/10.1111/bph.12673>
- Crowley, R. S., Riley, A. P., Sherwood, A. M., Groer, C. E., Shivaperumal, N., Biscaia, M., Paton, K., Schneider, S., Provasi, D., Kivell, B. M., Filizola, M., & Prisinzano, T. E. (2016). Synthetic Studies of Neoclerodane Diterpenes from *Salvia divinorum*: Identification of a Potent and Centrally Acting μ Opioid Analgesic with Reduced Abuse Liability. *Journal of Medicinal Chemistry*, *59*(24), 11027–11038. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.6b01235>
- Daidone, I., & Amadei, A. (2012). Essential dynamics: foundation and applications. *WIREs Comput Mol Sci*. <https://doi.org/10.1002/wcms.1099>
- Devree, B. T., Mahoney, J. P., Vélez-Ruiz, G. A., Rasmussen, S. G. F., Kuszak, A. J., Edwald, E., Fung, J. J., Manglik, A., Masureel, M., Du, Y., Matt, R. A., Pardon, E., Steyaert, J., Kobilka, B. K., & Sunahara, R. K. (2016). Allosteric coupling from G protein to the agonist-binding pocket in GPCRs. *Nature*, *535*(7610), 182–186. <https://doi.org/10.1038/nature18324>
- DeWire, S. M., Yamashita, D. S., Rominger, D. H., Liu, G., Cowan, C. L., Graczyk, T. M., Chen, X. T., Pitis, P. M., Gotchev, D., Yuan, C., Koblisch, M., Lark, M. W., & Violin, J. D. (2013). A G protein-biased ligand at the μ -opioid receptor is potently analgesic with reduced gastrointestinal and respiratory dysfunction compared with morphines. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, *344*(3), 708–717. <https://doi.org/10.1124/jpet.112.201616>
- Domazet, I., Holleran, B. J., Richard, A., Vandenberghe, C., Lavigne, P., Escher, E., Leduc, R., & Guillemette, G. (2015). Characterization of Angiotensin II Molecular Determinants Involved in AT 1 Receptor Functional Selectivity. *MOLECULAR PHARMACOLOGY Mol Pharmacol*, *87*, 982–995. <https://doi.org/10.1124/mol.114.097337>
- Drie, J. H. (2007). Computer-aided drug design: The next 20 years. *Journal of Computer-Aided Molecular Design*, *21*(10–11), 591–601. <https://doi.org/10.1007/s10822-007-9142-y>
- Dror, R. O., Dirks, R. M., Grossman, J. P., Xu, H., & Shaw, D. E. (2012). Biomolecular simulation: A computational microscope for molecular biology. In *Annual Review of Biophysics* (Vol. 41, Issue 1,

- pp. 429–452). Annual Reviews Inc. <https://doi.org/10.1146/annurev-biophys-042910-155245>
- Eguchi, M. (2004). Recent advances in selective opioid receptor agonists and antagonists. *Medicinal Research Reviews*, *24*(2), 182–212. <https://doi.org/10.1002/med.10059>
- Erickson, J. A., Jalaie, M., Robertson, D. H., Lewis, R. A., & Vieth, M. (2004). Lessons in Molecular Recognition: The Effects of Ligand and Protein Flexibility on Molecular Docking Accuracy. *Journal of Medicinal Chemistry*, *47*(1), 45–55. <https://doi.org/10.1021/jm030209y>
- Fenalti, G., Giguere, P. M., Katritch, V., Huang, X. P., Thompson, A. A., Cherezov, V., Roth, B. L., & Stevens, R. C. (2014). Molecular control of δ -opioid receptor signalling. *Nature*, *506*(7487), 191–196. <https://doi.org/10.1038/nature12944>
- Fredriksson, R., Lagerström, M. C., Lundin, L. G., & Schiöth, H. B. (2003). The G-protein-coupled receptors in the human genome form five main families. Phylogenetic analysis, paralogon groups, and fingerprints. *Molecular Pharmacology*, *63*(6), 1256–1272. <https://doi.org/10.1124/mol.63.6.1256>
- Galés, C., Van Durm, J. J. J., Schaak, S., Pontier, S., Percherancier, Y., Audet, M., Paris, H., & Bouvier, M. (2006). Probing the activation-promoted structural rearrangements in preassembled receptor-G protein complexes. *Nature Structural and Molecular Biology*, *13*(9), 778–786. <https://doi.org/10.1038/nsmb1134>
- García-Nafria, J., & Tate, C. G. (2020). Cryo-Electron Microscopy: Moving Beyond X-Ray Crystal Structures for Drug Receptors and Drug Development. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, *60*(1), 51–71. <https://doi.org/10.1146/annurev-pharmtox-010919-023545>
- Gesty-Palmer, D., Chen, M., Reiter, E., Ahn, S., Nelson, C. D., Wang, S., Eckhardt, A. E., Cowan, C. L., Spurney, R. F., Luttrell, L. M., & Lefkowitz, R. J. (2006). Distinct β -arrestin- and G protein-dependent pathways for parathyroid hormone receptor-stimulated ERK1/2 activation. *Journal of Biological Chemistry*, *281*(16), 10856–10864. <https://doi.org/10.1074/jbc.M513380200>
- Gonzalez-Andrade, M., Rodriguez-Sotres, R., Madariaga-Mazon, A., Rivera-Chavez, J., Mata, R., Sosa-Peinado, A., Pozo-Yauner, L. Del, & Arias-Olguin, I. I. (2016). Insights into molecular interactions between CaM and its inhibitors from molecular dynamics simulations and experimental data. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, *34*(1), 78–91. <https://doi.org/10.1080/07391102.2015.1022225>
- Granier, S., & Kobilka, B. (2012). A new era of GPCR structural and chemical biology. In *Nature Chemical Biology* (Vol. 8, Issue 8, pp. 670–673). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nchembio.1025>
- Granier, S., Manglik, A., Kruse, A. C., Kobilka, T. S., Thian, F. S., Weis, W. I., & Kobilka, B. K. (2012). Structure of the δ -opioid receptor bound to naltrindole. *Nature*, *485*(7398), 400–404. <https://doi.org/10.1038/nature11111>
- Groer, C. E., Tidgewell, K., Moyer, R. A., Harding, W. W., Rothman, R. B., Prisinzano, T. E., & Bohn, L. M. (2007). An opioid agonist that does not induce μ -opioid receptor - Arrestin interactions or receptor internalization. *Molecular Pharmacology*, *71*(2), 549–557. <https://doi.org/10.1124/mol.106.028258>
- Grudinin, S., Laine, E., & Hoffmann, A. (2020). Predicting Protein Functional Motions: an Old Recipe with a New Twist. *Biophysical Journal*, *118*(10), 2513–2525. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2020.03.020>
- Harding, W. W., Tidgewell, K., Byrd, N., Cobb, H., Dersch, C. M., Butelman, E. R., Rothman, R. B., & Prisinzano, T. E. (2005). Neoclerodane diterpenes as a novel scaffold for μ opioid receptor ligands. *Journal of Medicinal Chemistry*, *48*(15), 4765–4771. <https://doi.org/10.1021/jm048963m>
- Harrison, C., & Traynor, J. R. (2003). The [³⁵S]GTP γ S binding assay: Approaches and applications in pharmacology. *Life Sciences*, *74*(4), 489–508. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2003.07.005>
- Hollingsworth, S. A., & Dror, R. O. (2018). Molecular Dynamics Simulation for All. In *Neuron* (Vol. 99, Issue 6, pp. 1129–1143). Cell Press. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2018.08.011>

- Hospital, A., Goñi, J. R., Orozco, M., & Gelpí, J. L. (2015). Molecular dynamics simulations: Advances and applications. In *Advances and Applications in Bioinformatics and Chemistry* (Vol. 8, Issue 1, pp. 37–47). Dove Medical Press Ltd. <https://doi.org/10.2147/AABC.S70333>
- Hothersall, J. D., Torella, R., Humphreys, S., Hooley, M., Brown, A., McMurray, G., & Nickolls, S. A. (2017). Residues W320 and Y328 within the binding site of the μ -opioid receptor influence opiate ligand bias. *Neuropharmacology*, *118*, 46–58. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2017.03.007>
- Hu, J., Wang, Y., Zhang, X., Lloyd, J. R., Li, J. H., Karpiak, J., Costanzi, S., & Wess, J. (2010). Structural basis of G proteing-coupled receptorg-G protein interactions. *Nature Chemical Biology*, *6*(7), 541–548. <https://doi.org/10.1038/nchembio.385>
- Hu, X., Wang, Y., Hunkele, A., Provasi, D., Pasternak, G. W., & Filizola, M. (2019). Kinetic and thermodynamic insights into sodium ion translocation through the μ -opioid receptor from molecular dynamics and machine learning analysis. *PLOS Computational Biology*, *15*(1), e1006689. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1006689>
- Huang, W., Manglik, A., Venkatakrisnan, A. J., Laeremans, T., Feinberg, E. N., Sanborn, A. L., Kato, H. E., Livingston, K. E., Thorsen, T. S., Kling, R. C., Granier, S., Gmeiner, P., Husbands, S. M., Traynor, J. R., Weis, W. I., Steyaert, J., Dror, R. O., & Kobilka, B. K. (2015a). Structural insights into μ -opioid receptor activation. *Nature*, *524*(7565), 315–321. <https://doi.org/10.1038/nature14886>
- Huang, W., Manglik, A., Venkatakrisnan, A. J., Laeremans, T., Feinberg, E. N., Sanborn, A. L., Kato, H. E., Livingston, K. E., Thorsen, T. S., Kling, R. C., Granier, S., Gmeiner, P., Husbands, S. M., Traynor, J. R., Weis, W. I., Steyaert, J., Dror, R. O., & Kobilka, B. K. (2015b). Structural insights into μ -opioid receptor activation. *Nature*, *524*(7565), 315–321. <https://doi.org/10.1038/nature14886>
- Hulme, E. C. (2013). GPCR activation: A mutagenic spotlight on crystal structures. In *Trends in Pharmacological Sciences* (Vol. 34, Issue 1, pp. 67–84). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2012.11.002>
- Husain, S., Abdul, Y., & E. Potter, D. (2012). Non-Analgesic Effects of Opioids: Neuroprotection in the Retina. *Current Pharmaceutical Design*, *18*(37), 6101–6108. <https://doi.org/10.2174/138161212803582441>
- Jacobson, K. A., & Costanzi, S. (2012). New insights for drug design from the X-ray crystallographic structures of G-protein-coupled receptors. In *Molecular Pharmacology* (Vol. 82, Issue 3, pp. 361–371). American Society for Pharmacology and Experimental Therapeutics. <https://doi.org/10.1124/mol.112.079335>
- Kaiser, A., Hempel, C., Wanka, L., Schubert, M., Hamm, H. E., & Beck-Sickinger, A. G. (2018). G protein preassembly rescues efficacy of W 6.48 toggle mutations in neuropeptide Y 2 receptor. *Molecular Pharmacology*, *93*(4), 387–401. <https://doi.org/10.1124/mol.117.110544>
- Kane, B. E., Nieto, M. J., McCurdy, C. R., & Ferguson, D. M. (2006). A unique binding epitope for salvinorin A, a non-nitrogenous kappa opioid receptor agonist. *FEBS Journal*, *273*(9), 1966–1974. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2006.05212.x>
- Kapoor, A., Martinez-Rosell, G., Provasi, D., De Fabritiis, G., & Filizola, M. (2017). Dynamic and Kinetic Elements of μ -Opioid Receptor Functional Selectivity. *Scientific Reports*, *7*(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-017-11483-8>
- Katritch, V., Fenalti, G., Abola, E. E., Roth, B. L., Cherezov, V., & Stevens, R. C. (2014). Allosteric sodium in class A GPCR signaling. In *Trends in Biochemical Sciences* (Vol. 39, Issue 5, pp. 233–244). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2014.03.002>
- Kaye, S. L., Sansom, M. S. P., & Biggin, P. C. (2006). Molecular dynamics simulations of the ligand-binding domain of an N-methyl-D-aspartate receptor. *Journal of Biological Chemistry*, *281*(18), 12736–12742. <https://doi.org/10.1074/jbc.M512728200>

- Kenakin, T. (2011). Functional selectivity and biased receptor signaling. In *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* (Vol. 336, Issue 2, pp. 296–302). American Society for Pharmacology and Experimental Therapeutics. <https://doi.org/10.1124/jpet.110.173948>
- Kenakin, T., Watson, C., Muniz-Medina, V., Christopoulos, A., & Novick, S. (2011). *A Simple Method for Quantifying Functional Selectivity and Agonist Bias*. <https://doi.org/10.1021/cn200111m>
- Kenakin, T., Watson, C., Muniz-Medina, V., Christopoulos, A., & Novick, S. (2012). A simple method for quantifying functional selectivity and agonist bias. *ACS Chemical Neuroscience*, *3*(3), 193–203. <https://doi.org/10.1021/cn200111m>
- Kitchen, D. B., Decornez, H., Furr, J. R., & Bajorath, J. (2004). Docking and scoring in virtual screening for drug discovery: Methods and applications. In *Nature Reviews Drug Discovery* (Vol. 3, Issue 11, pp. 935–949). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nrd1549>
- Kobilka, B. K., & Deupi, X. (2007). Conformational complexity of G-protein-coupled receptors. In *Trends in Pharmacological Sciences* (Vol. 28, Issue 8, pp. 397–406). Elsevier Current Trends. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2007.06.003>
- Koehl, A., Hu, H., Maeda, S., Zhang, Y., Qu, Q., Paggi, J. M., Latorraca, N. R., Hilger, D., Dawson, R., Matile, H., Schertler, G. F. X., Granier, S., Weis, W. I., Dror, R. O., Manglik, A., Skiniotis, G., & Kobilka, B. K. (2018). Structure of the μ -opioid receptor-Giprotein complex. *Nature*. <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0219-7>
- Koshland, D. E. (1963). Correlation of structure and function in enzyme action. *Science*, *142*(3599), 1533–1541. <https://doi.org/10.1126/science.142.3599.1533>
- Kruegel, A. C., Gassaway, M. M., Kapoor, A., Váradi, A., Majumdar, S., Filizola, M., Javitch, J. A., & Sames, D. (2016). Synthetic and Receptor Signaling Explorations of the Mitragyna Alkaloids: Mitragynine as an Atypical Molecular Framework for Opioid Receptor Modulators. *Journal of the American Chemical Society*, *138*(21), 6754–6764. <https://doi.org/10.1021/jacs.6b00360>
- Kuntz, I. D., Blaney, J. M., Oatley, S. J., Langridge, R., & Ferrin, T. E. (1982). A geometric approach to macromolecule-ligand interactions. *Journal of Molecular Biology*, *161*(2), 269–288. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(82\)90153-X](https://doi.org/10.1016/0022-2836(82)90153-X)
- Le Cour Grandmaison, R., Morris, N., & Smith, B. (2019). *The Last Harvest? From the US Fentanyl Boom to the Mexican Opium Crisis*. <https://doi.org/10.31389/jied.45>
- Li, W. (2020). Residue-Residue Mutual Work Analysis of Retinal-Opsin Interaction in Rhodopsin: Implications for Protein-Ligand Binding. *Journal of Chemical Theory and Computation*, *16*(3), 1834–1842. <https://doi.org/10.1021/acs.jctc.9b01035>
- Li, X., He, W., Chen, Y., Yang, G., Wan, H., Zhang, L., Hu, Q., Feng, J., Zhang, Z., He, F., Bai, C., Zhang, L., You, L., & Tao, W. (2017). Discovery of SHR9352: A Highly Potent G Protein-Biased μ -Opioid Receptor Agonist. *ACS Omega*, *2*(12), 9261–9267. <https://doi.org/10.1021/acsomega.7b01452>
- Liang, B., & Tamm, L. K. (2016). NMR as a tool to investigate the structure, dynamics and function of membrane proteins. In *Nature Structural and Molecular Biology* (Vol. 23, Issue 6, pp. 468–474). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nsmb.3226>
- Lipiński, P. F. J., Jarończyk, M., Dobrowolski, J. C., & Sadlej, J. (2019). Molecular dynamics of fentanyl bound to μ -opioid receptor. *Journal of Molecular Modeling*, *25*(5), 1–17. <https://doi.org/10.1007/s00894-019-3999-2>
- Lipiński, P., Kosson, P., Matalińska, J., Roszkowski, P., Czarnocki, Z., Jarończyk, M., Misicka, A., Dobrowolski, J., & Sadlej, J. (2019). Fentanyl Family at the Mu-Opioid Receptor: Uniform Assessment of Binding and Computational Analysis. *Molecules*, *24*(4), 740. <https://doi.org/10.3390/molecules24040740>
- Listos, J., Łupina, M., Talarek, S., Mazur, A., Orzelska-Górka, J., & Kotlińska, J. (2019). The mechanisms

- involved in morphine addiction: An overview. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 20, Issue 17, p. 4302). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/ijms20174302>
- Liu, K., & Kokubo, H. (2017). *Exploring the Stability of Ligand Binding Modes to Proteins by Molecular Dynamics Simulations: A Cross-docking Study*. <https://doi.org/10.1021/acs.jcim.7b00412>
- Liu, W., Chun, E., Thompson, A. A., Chubukov, P., Xu, F., Katritch, V., Han, G. W., Roth, C. B., Heitman, L. H., IJzerman, A. P., Cherezov, V., & Stevens, R. C. (2012). Structural basis for allosteric regulation of GPCRS by sodium ions. *Science*, *337*(6091), 232–236. <https://doi.org/10.1126/science.1219218>
- Lomize, M. A., Pogozheva, I. D., Joo, H., Mosberg, H. I., & Lomize, A. L. (2012). OPM database and PPM web server: Resources for positioning of proteins in membranes. *Nucleic Acids Research*, *40*(D1), D370–D376. <https://doi.org/10.1093/nar/gkr703>
- Madariaga-Mazón, A., Marmolejo-Valencia, A. F., Li, Y., Toll, L., Houghten, R. A., & Martínez-Mayorga, K. (2017a). Mu-Opioid receptor biased ligands: A safer and painless discovery of analgesics? *Drug Discovery Today*, *22*. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2017.07.002>
- Madariaga-Mazón, A., Marmolejo-Valencia, A. F., Li, Y., Toll, L., Houghten, R. A., & Martínez-Mayorga, K. (2017b). Mu-Opioid receptor biased ligands: A safer and painless discovery of analgesics? *Drug Discovery Today*, *22*(11), 1719–1729. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2017.07.002>
- Manglik, A., Kruse, A. C., Kobilka, T. S., Thian, F. S., Mathiesen, J. M., Sunahara, R. K., Pardo, L., Weis, W. I., Kobilka, B. K., & Granier, S. (2012). *Crystal structure of the m-opioid receptor bound to a morphinan antagonist*. <https://doi.org/10.1038/nature10954>
- Manglik, A., Lin, H., Aryal, D. K., McCorvy, J. D., Dengler, D., Corder, G., Levit, A., Kling, R. C., Bernat, V., Hübner, H., Huang, X. P., Sassano, M. F., Giguère, P. M., Löber, S., Duan, D., Scherrer, G., Kobilka, B. K., Gmeiner, P., Roth, B. L., & Shoichet, B. K. (2016). Structure-based discovery of opioid analgesics with reduced side effects. *Nature*, *537*(7619), 185–190. <https://doi.org/10.1038/nature19112>
- Mansour, A., Taylor, L. P., Fine, J. L., Thompson, R. C., Hoversten, M. T., Mosberg, H. I., Watson, S. J., & Akil, H. (2002). Key Residues Defining the μ -Opioid Receptor Binding Pocket: A Site-Directed Mutagenesis Study. *Journal of Neurochemistry*, *68*(1), 344–353. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.1997.68010344.x>
- Marmolejo-Valencia, A. F., & Martínez-Mayorga, K. (2017). Allosteric modulation model of the mu opioid receptor by herkinorin, a potent not alkaloidal agonist. *Journal of Computer-Aided Molecular Design*, *31*(5), 467–482. <https://doi.org/10.1007/s10822-017-0016-7>
- McCammon, J. A., Gelin, B. R., & Karplus, M. (1977). Dynamics of folded proteins. *Nature*, *267*(5612), 585–590. <https://doi.org/10.1038/267585a0>
- McCorvy, J. D., Wacker, D., Wang, S., Agegnehu, B., Liu, J., Lansu, K., Tribo, A. R., Olsen, R. H. J., Che, T., Jin, J., & Roth, B. L. (2018). Structural determinants of 5-HT_{2B} receptor activation and biased agonism. *Nature Structural and Molecular Biology*, *25*(9), 787–796. <https://doi.org/10.1038/s41594-018-0116-7>
- Meng, X.-Y., Zhang, H.-X., Mezei, M., & Cui, M. (2012). Molecular Docking: A Powerful Approach for Structure-Based Drug Discovery. *Current Computer Aided-Drug Design*, *7*(2), 146–157. <https://doi.org/10.2174/157340911795677602>
- Miller-Gallacher, J. L., Nehmé, R., Warne, T., Edwards, P. C., Schertler, G. F. X., Leslie, A. G. W., & Tate, C. G. (2014). The 2.1 Å Resolution Structure of Cyanopindolol-Bound β 1-Adrenoceptor Identifies an Intramembrane Na⁺ Ion that Stabilises the Ligand-Free Receptor. *PLoS ONE*, *9*(3), e92727. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0092727>
- Miszta, P., Pasznik, P., Jakowiecki, J., Szttyler, A., Latek, D., & Filipek, S. (2018). GPCRM: A homology

- modeling web service with triple membrane-fitted quality assessment of GPCR models. *Nucleic Acids Research*, 46(W1), W387–W395. <https://doi.org/10.1093/nar/gky429>
- Neves, M. A. C., Totrov, M., & Abagyan, R. (2012). Docking and scoring with ICM: The benchmarking results and strategies for improvement. *Journal of Computer-Aided Molecular Design*, 26(6), 675–686. <https://doi.org/10.1007/s10822-012-9547-0>
- Oakley, R. H., Laporte, S. A., Holt, J. A., Caron, M. G., & Barak, L. S. (2000). Differential affinities of visual arrestin, β arrestin1, and β arrestin2 for G protein-coupled receptors delineate two major classes of receptors. *Journal of Biological Chemistry*, 275(22), 17201–17210. <https://doi.org/10.1074/jbc.M910348199>
- Ortega, A., Blount, J. F., & Manchand, P. S. (1982). Salvinorin, a new trans-neoclerodane diterpene from *Salvia divinorum* (Labiatae). *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1*, 0, 2505–2508. <https://doi.org/10.1039/p19820002505>
- P. Headrick, J., Pepe, S., & N. Peart, J. (2012). Non-Analgesic Effects of Opioids: Cardiovascular Effects of Opioids and their Receptor Systems. *Current Pharmaceutical Design*, 18(37), 6090–6100. <https://doi.org/10.2174/138161212803582360>
- Park, S. H., Lee, S. S., & Kim, J. H. (2006). A surface reconstruction algorithm using weighted alpha shapes. *Lecture Notes in Computer Science (Including Subseries Lecture Notes in Artificial Intelligence and Lecture Notes in Bioinformatics)*, 3613 LNAI, 1141–1150. https://doi.org/10.1007/11539506_143
- Pasternak, G. W. (2014). Opioids and their receptors: Are we there yet? In *Neuropharmacology* (Vol. 76, Issue PART B, pp. 198–203). Pergamon. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2013.03.039>
- Pasternak, G. W., & Pan, Y. X. (2013). Mu opioids and their receptors: Evolution of a concept. In *Pharmacological Reviews* (Vol. 65, Issue 4, pp. 1257–1317). American Society for Pharmacology and Experimental Therapeutics. <https://doi.org/10.1124/pr.112.007138>
- Peng, J.-H., Wang, W., Yu, Y.-Q., Gu, H.-L., & Huang, X. (2018). Clustering Algorithms to Analyze Molecular Dynamics Simulation Trajectories for Complex Chemical and Biological Systems †. *CHINESE JOURNAL OF CHEMICAL PHYSICS*, 31(4). <https://doi.org/10.1063/1674-0068/31/ejcp1806147>
- Peng, J., Sarkar, S., & Chang, S. L. (2012). Opioid receptor expression in human brain and peripheral tissues using absolute quantitative real-time RT-PCR. *Drug and Alcohol Dependence*, 124(3), 223–228. <https://doi.org/10.1016/j.drugalcdep.2012.01.013>
- Pert, C. B., Pasternak, G., & Snyder, S. H. (1973). Opiate agonists and antagonists discriminated by receptor binding in brain. *Science*, 182(4119), 1359–1361. <https://doi.org/10.1126/science.182.4119.1359>
- Pil, J., & Tytgat, J. (2003). Serine 329 of the μ -opioid receptor interacts differently with agonists. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 304(3), 924–930. <https://doi.org/10.1124/jpet.102.040113>
- Polepally, P. R., Huben, K., Vardy, E., Setola, V., Mosier, P. D., Roth, B. L., & Zjawiony, J. K. (2014). Michael acceptor approach to the design of new salvinorin A-based high affinity ligands for the kappa-opioid receptor. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 85, 818–829. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2014.07.077>
- Presley, C. C., & Lindsley, C. W. (2018). DARK Classics in Chemical Neuroscience: Opium, a Historical Perspective. *ACS Chemical Neuroscience*, 9(10), 2503–2518. <https://doi.org/10.1021/acschemneuro.8b00459>
- Raehal, K. M., Walker, J. K. L., & Bohn, L. M. (2005). Morphine side effects in β -arrestin 2 knockout mice. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 314(3), 1195–1201. <https://doi.org/10.1124/jpet.105.087254>

- Remy, I., & Michnick, S. W. (2007). Application of protein-fragment complementation assays in cell biology. *BioTechniques*, *42*(2), 137–145. <https://doi.org/10.2144/000112396>
- Ring, A. M., Manglik, A., Kruse, A. C., Enos, M. D., Weis, W. I., Garcia, K. C., & Kobilka, B. K. (2013). Adrenaline-activated structure of β 2-adrenoceptor stabilized by an engineered nanobody. *Nature*, *502*(7472), 575–579. <https://doi.org/10.1038/nature12572>
- Roe, D. R., & Cheatham, T. E. (2013). PTRAJ and CPPTRAJ: Software for processing and analysis of molecular dynamics trajectory data. *Journal of Chemical Theory and Computation*, *9*(7), 3084–3095. <https://doi.org/10.1021/ct400341p>
- Sader, S., Anant, K., & Wu, C. (2018). To probe interaction of morphine and IBNtxA with 7TM and 6TM variants of the human μ -opioid receptor using all-atom molecular dynamics simulations with an explicit membrane. *Physical Chemistry Chemical Physics*, *20*(3), 1724–1741. <https://doi.org/10.1039/c7cp06745c>
- Salmaso, V., & Moro, S. (2018). Bridging molecular docking to molecular dynamics in exploring ligand-protein recognition process: An overview. In *Frontiers in Pharmacology* (Vol. 9, Issue AUG, p. 923). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fphar.2018.00923>
- Salomon-Ferrer, R., Götz, A. W., Poole, D., Le Grand, S., & Walker, R. C. (2013). Routine microsecond molecular dynamics simulations with AMBER on GPUs. 2. Explicit solvent particle mesh ewald. *Journal of Chemical Theory and Computation*, *9*(9), 3878–3888. <https://doi.org/10.1021/ct400314y>
- Sander, T., Freyss, J., Von Korff, M., & Rufener, C. (2015). DataWarrior: An open-source program for chemistry aware data visualization and analysis. *Journal of Chemical Information and Modeling*, *55*(2), 460–473. <https://doi.org/10.1021/ci500588j>
- Santana Azevedo, L., Pretto Moraes, F., Morrone Xavier, M., Ozorio Pantoja, E., Villavicencio, B., Aline Finck, J., Menegaz Proenca, A., Beiestorf Rocha, K., & Filgueira de Azevedo, W. (2013). Recent Progress of Molecular Docking Simulations Applied to Development of Drugs. *Current Bioinformatics*, *7*(4), 352–365. <https://doi.org/10.2174/157489312803901063>
- Santos, L. H. S., Ferreira, R. S., & Caffarena, E. R. (2019). Integrating molecular docking and molecular dynamics simulations. In *Methods in Molecular Biology* (Vol. 2053, pp. 13–34). Humana Press Inc. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9752-7_2
- Santos, R., Ursu, O., Gaulton, A., Bento, A. P., Donadi, R. S., Bologa, C. G., Karlsson, A., Al-Lazikani, B., Hersey, A., Oprea, T. I., & Overington, J. P. (2016). A comprehensive map of molecular drug targets. *Nature Reviews Drug Discovery*, *16*(1), 19–34. <https://doi.org/10.1038/nrd.2016.230>
- Schilling, J. M., Deussen, D. N., Roth, D. M., & Patel, H. H. (2015). Delta opioids in protection of the heart and brain. In *Neural Functions of the Delta-Opioid Receptor* (pp. 607–630). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-25495-1_17
- Schmid, C. L., Kennedy, N. M., Ross, N. C., Lovell, K. M., Yue, Z., Morgenweck, J., Cameron, M. D., Bannister, T. D., & Bohn, L. M. (2017). Bias Factor and Therapeutic Window Correlate to Predict Safer Opioid Analgesics. *Cell*. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.10.035>
- Schneider, S., Provasi, D., & Filizola, M. (2016). *How Oliceridine (TRV-130) Binds and Stabilizes a μ -Opioid Receptor Conformational State That Selectively Triggers G Protein Signaling Pathways*. <https://doi.org/10.1021/acs.biochem.6b00948>
- Sheridan, R. P., Maiorov, V. N., Holloway, M. K., Cornell, W. D., & Gao, Y. D. (2010). Drug-like density: A method of quantifying the “bindability” of a protein target based on a very large set of pockets and drug-like ligands from the protein data bank. *Journal of Chemical Information and Modeling*, *50*(11), 2029–2040. <https://doi.org/10.1021/ci100312t>
- Silva, D. A., Weiss, D. R., Avila, F. P., Da, L. T., Levitt, M., Wang, D., & Huang, X. (2014). Millisecond dynamics of RNA polymerase II translocation at atomic resolution. *Proceedings of the National*

- Academy of Sciences of the United States of America*, 111(21), 7665–7670.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1315751111>
- Sittel, F., Jain, A., & Stock, G. (2014). Principal component analysis of molecular dynamics: On the use of Cartesian vs. internal coordinates. *Journal of Chemical Physics*, 141(1), 014111.
<https://doi.org/10.1063/1.4885338>
- Suomivuori, C. M., Latorraca, N. R., Wingler, L. M., Eismann, S., King, M. C., Kleinhenz, A. L. W., Skiba, M. A., Staus, D. P., Kruse, A. C., Lefkowitz, R. J., & Dror, R. O. (2020). Molecular mechanism of biased signaling in a prototypical G protein-coupled receptor. *Science*, 367(6480), 881–887.
<https://doi.org/10.1126/science.aaz0326>
- Tian, X., Kang, D. S., & Benovic, J. L. (2014). β -Arrestins and G protein-coupled receptor trafficking. In *Handbook of Experimental Pharmacology* (Vol. 219, pp. 173–186). Springer New York LLC.
https://doi.org/10.1007/978-3-642-41199-1_9
- Totrov, M., & Abagyan, R. (1999). Derivation of sensitive discrimination potential for virtual ligand screening. *Proceedings of the Third Annual International Conference on Computational Molecular Biology - RECOMB '99*, 312–320. <https://doi.org/10.1145/299432.299509>
- United Nations. (2019). *World Drug Report 2019* (19th ed.). www.unodc.org/wdr2019
- Vaidehi, N., & Kenakin, T. (2010). The role of conformational ensembles of seven transmembrane receptors in functional selectivity. In *Current Opinion in Pharmacology* (Vol. 10, Issue 6, pp. 775–781). Elsevier.
<https://doi.org/10.1016/j.coph.2010.09.004>
- Van Aalten, D. M. F. (1996). PRODRG, a program for generating molecular topologies and unique molecular descriptors from coordinates of small molecules. *Journal of Computer-Aided Molecular Design*, 10(3), 255–262. <https://doi.org/10.1007/BF00355047>
- Vanommeslaeghe, K., Guvench, O., & MacKerell, A. D. (2014). Molecular Mechanics. *Current Pharmaceutical Design*, 20(20), 3281–3292. <https://doi.org/10.2174/13816128113199990600>
- Verkhivker, G. M., Bouzida, D., Gehlhaar, D. K., Rejto, P. A., Arthurs, S., Colson, A. B., Freer, S. T., Larson, V., Luty, B. A., Marrone, T., & Rose, P. W. (2000). Deciphering common failures in molecular docking of ligand-protein complexes. *Journal of Computer-Aided Molecular Design*, 14(8), 731–751.
<https://doi.org/10.1023/A:1008158231558>
- Vincent J. Hilser, *,†, Bertrand García-Moreno E., ‡, Terrence G. Oas, §, Greg Kapp, § and, & Whitten†, S. T. (2006). *A Statistical Thermodynamic Model of the Protein Ensemble*.
<https://doi.org/10.1021/CR040423+>
- Wang, J., Wolf, R. M., Caldwell, J. W., Kollman, P. A., & Case, D. A. (2004). Development and testing of a general Amber force field. *Journal of Computational Chemistry*, 25(9), 1157–1174.
<https://doi.org/10.1002/jcc.20035>
- Wang, L., Yuan, Y., Chen, X., Chen, J., Guo, Y., Li, M., Li, C., & Pu, X. (2018). Probing the cooperative mechanism of the μ - δ Opioid receptor heterodimer by multiscale simulation. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 20(47), 29969–29982. <https://doi.org/10.1039/c8cp06652c>
- Wang, Y., Chen, Y., Xu, W., Lee, D. Y. W., Ma, Z., Rawls, S. M., Cowan, A., & Liu-Chen, L. Y. (2008). 2-Methoxymethyl-salvinorin B is a potent κ opioid receptor agonist with longer lasting action in vivo than salvinorin A. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 324(3), 1073–1083.
<https://doi.org/10.1124/jpet.107.132142>
- Wang, Y., Tang, K., Inan, S., Siebert, D., Holzgrabe, U., Lee, D. Y. W., Huang, P., Li, J. G., Cowan, A., & Liu-Chen, L. Y. (2005). Comparison of pharmacological activities of three distinct κ ligands (Salvinorin A, TRK-820 and 3FLB) on κ opioid receptors in vitro and their antipruritic and antinociceptive activities in vivo. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 312(1), 220–230. <https://doi.org/10.1124/jpet.104.073668>

- Wei, G., Xi, W., Nussinov, R., & Ma, B. (2016). Protein Ensembles: How Does Nature Harness Thermodynamic Fluctuations for Life? the Diverse Functional Roles of Conformational Ensembles in the Cell. In *Chemical Reviews* (Vol. 116, Issue 11, pp. 6516–6551). American Chemical Society. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.5b00562>
- Wingler, L. M., Elgeti, M., Hilger, D., Latorraca, N. R., Lerch, M. T., Staus, D. P., Dror, R. O., Kobilka, B. K., Hubbell, W. L., & Lefkowitz, R. J. (2019). Angiotensin Analogs with Divergent Bias Stabilize Distinct Receptor Conformations. *Cell*, *176*(3), 468–478.e11. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.12.005>
- Wolf, A., & Kirschner, K. N. (2013). Principal component and clustering analysis on molecular dynamics data of the ribosomal L11 · 23S subdomain. *Journal of Molecular Modeling*, *19*(2), 539–549. <https://doi.org/10.1007/s00894-012-1563-4>
- Wu, H., Wacker, D., Mileni, M., Katritch, V., Han, G. W., Vardy, E., Liu, W., Thompson, A. A., Huang, X. P., Carroll, F. I., Mascarella, S. W., Westkaemper, R. B., Mosier, P. D., Roth, B. L., Cherezov, V., & Stevens, R. C. (2012). Structure of the human κ -opioid receptor in complex with JD(Tic). *Nature*, *485*(7398), 327–332. <https://doi.org/10.1038/nature10939>
- Xu, H., Lu, Y. F., Partilla, J. S., Zheng, Q. X., Wang, J. B., Brine, G. A., Carroll, F. I., Rice, K. C., Chen, K. X., Chi, Z. Q., & Rothman, R. B. (1999). Opioid peptide receptor studies, 11: Involvement of Tyr148, Trp318, and His319 of the rat μ -opioid receptor in binding of μ -selective ligands. *Synapse*, *32*(1), 23–28. [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)
- Xu, W., Ozdener, F., Li, J.-G., Chen, C., de Riel, J. K., Weinstein, H., & Liu-Chen, L.-Y. (1999). Functional role of the spatial proximity of Asp114(2.50) in TMH 2 and Asn332(7.49) in TMH 7 of the μ opioid receptor. *FEBS Letters*, *447*(2–3), 318–324. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(99\)00316-6](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(99)00316-6)
- Yabaluri, N., & Medzihradsky, F. (2002). Regulation of μ -Opioid Receptor in Neural Cells by Extracellular Sodium. *Journal of Neurochemistry*, *68*(3), 1053–1061. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.1997.68031053.x>
- Yuan, S., Vogel, H., & Filipek, S. (2013). The Role of Water and Sodium Ions in the Activation of the μ -Opioid Receptor. *Angewandte Chemie International Edition*, *52*(38), 10112–10115. <https://doi.org/10.1002/anie.201302244>
- Yudin, Y., & Rohacs, T. (2019). The G-protein-biased agents PZM21 and TRV130 are partial agonists of μ -opioid receptor-mediated signalling to ion channels. *British Journal of Pharmacology*, *176*(17), bph.14702. <https://doi.org/10.1111/bph.14702>
- Zhang, C., Srinivasan, Y., Arlow, D. H., Fung, J. J., Palmer, D., Zheng, Y., Green, H. F., Pandey, A., Dror, R. O., Shaw, D. E., Weis, W. I., Coughlin, S. R., & Kobilka, B. K. (2012). High-resolution crystal structure of human protease-activated receptor 1. *Nature*, *492*(7429), 387–392. <https://doi.org/10.1038/nature11701>
- Zhang, H., Unal, H., Desnoyer, R., Won Han, G., Patel, N., Katritch, V., Karnik, S. S., Cherezov, V., & Stevens, R. C. (2015). *Structural Basis for Ligand Recognition and Functional Selectivity at Angiotensin Receptor* *. <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.689000>
- Zhang, J., Yang, J., Jang, R., & Zhang, Y. (2015). GPCR-I-TASSER: A Hybrid Approach to G Protein-Coupled Receptor Structure Modeling and the Application to the Human Genome. *Structure*, *23*(8), 1538–1549. <https://doi.org/10.1016/j.str.2015.06.007>
- Zhang, Z., Shi, Y., & Liu, H. (2003). Molecular dynamics simulations of peptides and proteins with amplified collective motions. *Biophysical Journal*, *84*(6), 3583–3593. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(03\)75090-5](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(03)75090-5)

Anexos

Anexo A. De los términos biológicos y farmacológicos

Posible mecanismo de la trayectoria del ion sodio dentro de la activación de GPCRs

Las características estructurales del ion Na^+ dentro de las estructuras inactivas de diversos GPCRs, la gran conservación del sitio alostérico de este ion y los cambios que existen dentro del sitio alostérico del sodio al activarse el receptor han llevado a indagar sobre el mecanismo que se lleva a cabo de la incorporación y traslocación de este ion (Katritch et al., 2014). Diversos autores han destacado algunas posibilidades, pero aquí se presenta el propuesto por Katritch y colaboradores, que se resume en la Figura 32.

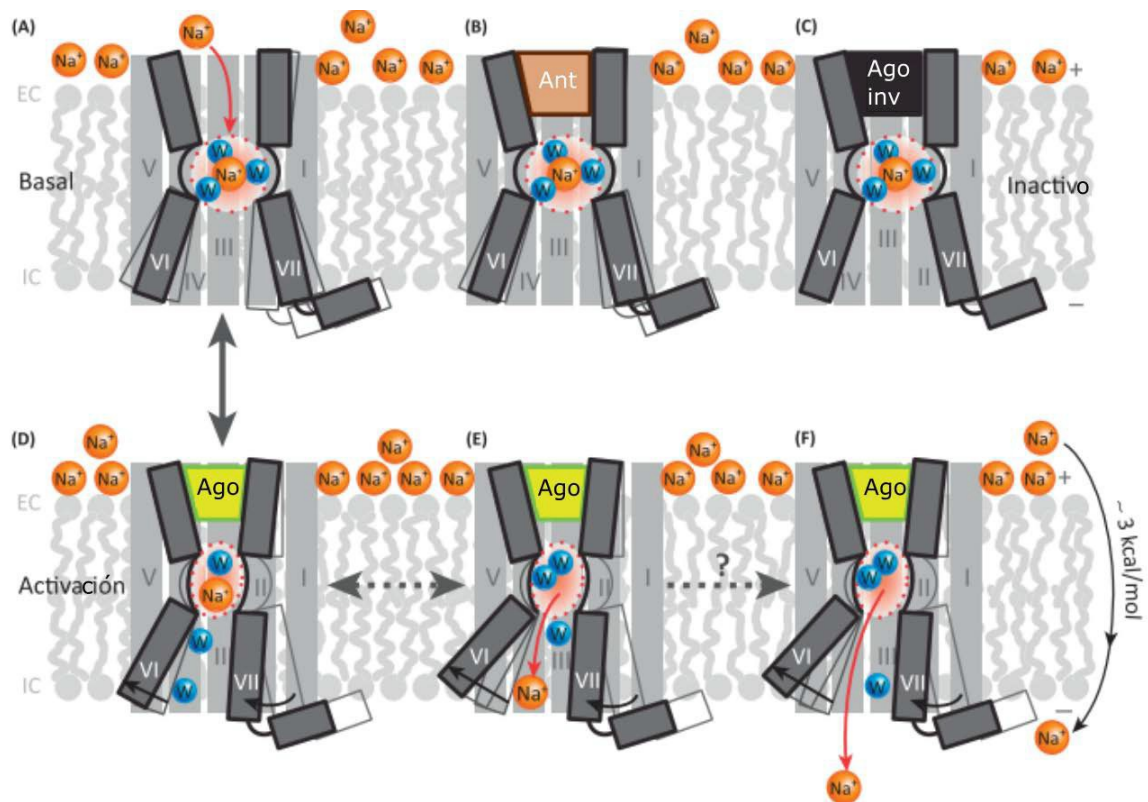


Figura 32. Mecanismo hipotético de la trayectoria del ion sodio dentro de fenómenos de interacción entre GPCR- ligando (modificada de Katritch et al., 2014) (A) En la forma apo del receptor, el ion sodio obtiene el acceso del lado extracelular dentro del sitio alostérico, donde forma una red de interacciones polares y agrupamiento con agua. (B) un antagonista (C) o un agonista inverso se unen en el sitio ortostérico del receptor, lo que es compatible con la unión del ion sodio, estabilizando el estado inactivo. (D) Activación del GPCR por un agonista, que involucra un movimiento de la hélice VII hacia adentro y un movimiento de hélice VI hacia afuera, produciendo un colapso parcial del sitio alostérico del sodio. Este colapso produce un desplazamiento del ión sodio hacia el lado intracelular de la membrana, lo que puede producir su interacción con otros residuos del receptor (E) o desplazarse fuera de las cercanías de la proteína (F).

Interacciones de los ligandos co-cristalizados en MOR de DAMGO y BU72

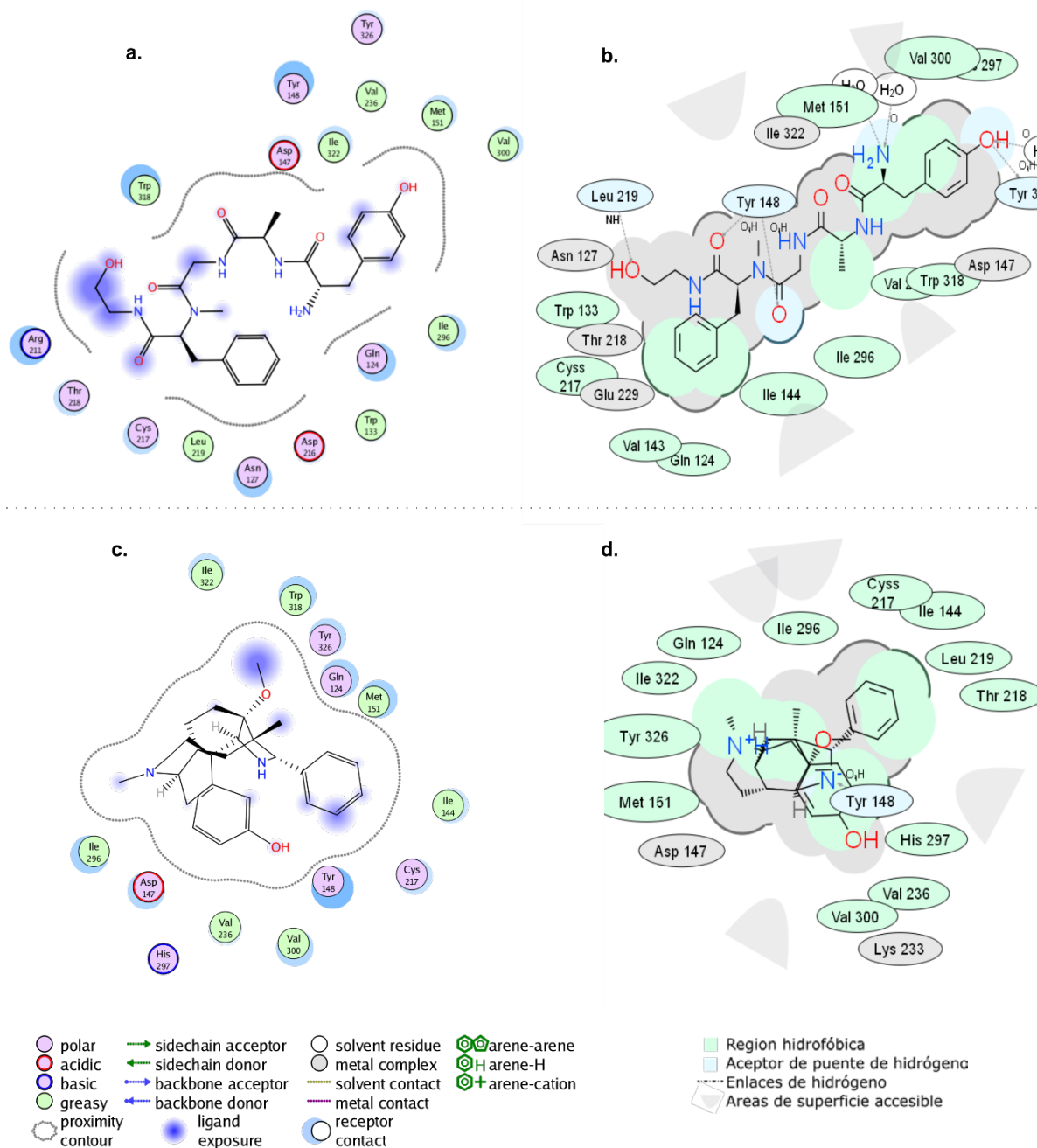


Figura 33. Diagrama de interacciones de los controles en el acoplamiento y leyenda. Graficando los modelos de DAMGO (a, c) y BU72 (b, c) con el menor valor en RMSD comparado con el ligando co-cristalizado. El umbral de interacción para interacciones no hidrofóbicas corresponde a 4.5 Å. Los resultados de MOE a la izquierda e ICM a la derecha.

Factor de sesgo y modelo operacional

Como medida cuantitativa del sesgo, una curva de dosis-respuesta puede ser adecuada al modelo operacional de Black y Leff (Kenakin et al., 2012). (**Ecuación 5**)

$$= \frac{E_{MAX}}{1 + \left(\frac{1 + \frac{A}{10^{\log(K_A)}}}{A \times 10^{\log(\tau/K_A)}} \right)^n}$$

Ecuación 5. Modelo operacional. Donde E_{MAX} es la respuesta máxima, A es la concentración molar del ligando, K_A es la constante de disociación al equilibrio, τ es la eficacia del agonista y $\log(\tau/K_A)$ es definido como el coeficiente de transducción.

En la formulación del modelo, se considera la respuesta experimental como una secuencia de pasos que involucran la ocupación del receptor por el agonista (representado por la constante de disociación al equilibrio, K_A), la comunicación del estímulo farmacológico al sistema y el procesamiento del estímulo por el sistema que produce una respuesta. Estos últimos se representan por el radio de el monto acumulado de receptores en el sistema ($[R_{tot}]$) y el parámetro posicional de una función (K_E) que representa la habilidad del sistema de traducir el estímulo farmacológico en una respuesta. El cociente $[R_{tot}]/K_E$ se denomina Tau (τ). La conceptualización del modelo operacional incorporando la fracción de respuesta de un ligando en específico tiene la forma de la **Ecuación 6**.

$$E/E_{max} = \tau^n \times [A]^n / (K_A + [A])^n + \tau^n \times [A]^n$$

Ecuación 6. Modelo operacional y su relación con la fracción de respuesta de un ligando a concentración $[A]$.

Así, ambos parámetros (τ y K_A) se pueden obtener de los datos experimentales ajustados al modelo operacional. Dentro de cada ensayo realizado, el $\log(\tau/K_A)$ es calculado para el agonista de referencia (DAMGO) y el agonista de prueba, lo que permite normalizar el resultado del coeficiente de transducción al calcular $\Delta\log(\tau/K_A)$.

$$= \log\left(\frac{\tau}{K_A}\right)_{(prueba)} - \log\left(\frac{\tau}{K_A}\right)_{(DAMGO)}$$

Ecuación 7. Coeficiente de transducción normalizado.

La Ecuación 7 nos hace una comparación de la eficacia y la afinidad entre dos ligandos, pero para involucrar la comparación de dos rutas diferentes (en este caso señalización a proteína G y reclutamiento de β -arrestina2), se obtiene $\Delta\Delta\log(\tau/K_A)$, un cálculo sencillo que compara los resultados experimentales de evaluaciones a proteínas efectoras. Al final, se obtiene el factor de sesgo que se muestra en la **Ecuación 8**.

$$= 10^{\Delta \log\left(\frac{\tau}{KA}\right)_{(Ensayo1)} - \Delta \log\left(\frac{\tau}{KA}\right)_{(Ensayo2)}}$$

Ecuación 8. Factor de sesgo.

Sistema de clasificación GRAFS

Sistema de clasificación que nace a principios de los años 2000, tras un análisis filogenético de los GPCRs y en búsqueda de clasificar GPCRs que no estuvieran clasificados en el sistema A-F (Fredriksson et al., 2003), establecido en 1994.

El sistema GRAF se compone de cinco familias: Glutamato (G), Rodopsina (R), Adhesión (A), *Frizzled/Taste2* (F) y Secretina (S). Además, la familia rodopsina fue dividida en 13 subgrupos.

Grupo de Secretina: tienen un N-terminal largo, entre 60 y 80 residuos, los cuales contienen puentes de cisteína conservados. El N-terminal se involucra en la unión a ligandos, los ligandos que se unen suelen ser péptidos largos.

Grupo de Adhesión: su N-terminal es rico en serina y treonina que pueden servir para glicosilarse. La mayoría de los receptores en este grupo tienen un dominio proteolítico en su N-terminal.

Grupo de Glutamato: incluyen a los receptores metabotrópicos de glutamato, ácido gamma aminobutírico (GABA), entre otros. Estos receptores tienen un dominio de reconocimiento de ligando en el N-terminal.

Grupo *Frizzled/taste 2*: estos receptores están involucrados en la proliferación celular. Tienen aproximadamente 200 aminoácidos de longitud con un N-terminal largo y con cisteínas conservadas.

Grupo de Rodopsina: es el grupo más grande de GPCRs. Comparte el motivo NSxxNPxxY en TM7, el motivo DRY en TM3. Tienen un N-terminal corto

Anexo B. De los términos metodológicos y computacionales

Método de búsqueda de poses MOE *Triangle Matcher*

Este es un método de emplazamiento, es decir, búsqueda de conformaciones del ligando. Las poses son generadas mediante la superposición de tripletes de átomos del ligando con tripletes de puntos en el receptor. Los puntos en el receptor son *esferas alfa* centradas que representan locaciones de empaquetamiento. En cada iteración, una conformación al azar es seleccionada, es decir, un triplete de átomos en el ligando y un triplete de esferas alfa centradas son usadas para determinar la pose.

Función de puntaje London dG

La función de puntaje London dG estima la energía libre de unión de una pose dada. La forma de la función es una suma de términos:

$$\Delta G = c + E_{(flex)} + \sum_{\text{enlaces H}} c_{(HB)} f_{(HB)} + \sum_{\text{átomos}} \Delta D_i + \sum_{\text{m-lig}} c_M f_M$$

donde c representa el promedio de la ganancia/pérdida de la entropía rotacional y traslacional. E_{flex} es la energía debida a la pérdida de flexibilidad del ligando (calculada de la topología del ligando únicamente). f_{HB} califica la imperfección geométrica de los enlaces de hidrógeno, pudiendo tomar valores entre 0 y 1. c_{HB} es la energía de un enlace de hidrógeno ideal. f_M mide la imperfección geométrica de interacciones con ligandos pudiendo tomar valores entre 0 y 1. C_M es la energía de un ligamiento a metal ideal y D_i es la energía de desolvatación del átomo i . La energía de desolvatación se calcula de acuerdo con la siguiente fórmula.

$$\Delta D_i = c_{(i)} R_i^3 \left\{ \iiint_{u \in A \cup B} |u|^{-6} du - \iiint_{u \in B} |u|^{-6} du \right\}$$

donde A y B son los volúmenes de la proteína y/o el ligando con el átomo i que le corresponde un volumen B ; R_i es el radio de solvatación del átomo i y c_i es el coeficiente de desolvatación del átomo i . Las triples integrales son aproximadas usando las fórmulas de integración de Born generalizado.

Agrupamiento y Análisis de Componentes Principales (PCA)

Un análisis de agrupamiento es un método no supervisado para encontrar patrones en diversos tipos de datos. Esta rama del análisis no supervisado agrupa objetos similares en grupos minimizando diferencias dentro de cada grupo y maximizando las diferencias entre grupos. Dentro del rubro de agrupamiento, existen los métodos de centroide, que usan la distancia entre centroides de grupos para definir la proximidad entre grupo. Los análisis de centroide son los más empleados en dinámica molecular. Un ejemplo de la funcionalidad del algoritmo puede ser vista en: <https://www.youtube.com/watch?v=4b5d3muPQmA>. Este análisis puede tener similitud con PCA, sin embargo, el PCA permite realizar una reducción de dimensionalidad e indagar en las variables que realizan un mayor aporte a la variabilidad de los datos. Cuando es aplicado a datos de trayectoria de dinámica molecular, los componentes principales muestran desplazamientos atómicos conjuntos, permitiendo remarcar cambios conformacionales en las estructuras. Matemáticamente, los componentes principales se obtienen al diagonalizar la matriz de covarianza \mathbf{C} .

$$\mathbf{C} = \mathbf{V}\mathbf{\Lambda}\mathbf{V}^T$$

Donde $\mathbf{\Lambda}$ es la matriz diagonal que contiene los valores propios y \mathbf{V} contiene los vectores propios correspondientes. La matriz de covarianza describe las correlaciones de las mociones internas de una molécula con N número de átomos.

$$\sigma_{(ij)} = \langle (r_i - \langle r_i \rangle)(r_j - \langle r_j \rangle) \rangle$$

Donde r_1, \dots, r_{3N} , son las coordenadas cartesianas de cada átomo sobre todas las conformaciones muestreadas. Al ordenar los vectores propios de manera que sus valores propios estén en orden decreciente, entonces los primeros vectores propios (primeros componentes principales) tendrán la mayor varianza de los datos (Sittel et al., 2014).

Metodología de simulación de dinámica molecular de MOR- Herkinorina previa a este trabajo

GROMACS v5.0.4, con una minimización por *steepest descent*, Luego se realizaron etapas de equilibrio comenzando con dos simulaciones de ensamble NVT de 25 ps con intervalos de integración de 1 fs, ambas a 310 K usando el termostato de Berendsen cada 1 ps. Seguido por cuatro simulaciones NPT, la primera de 25 ps con paso de 1 fs y las tres últimas de 100 ps con pasos de 2 fs, todas a una temperatura de 310 K controlado por el termostato de Berendsen con tiempo constante de 1 ps y 1 Bar de presión usando el basóstato de Berendsen semi isotrópico cada 5 ps y una compresibilidad de $4 \times 10^{-5} \text{ Bar}^{-1}$. La etapa de equilibrio terminó con una etapa de simulación NPT sin restricciones de 10 ns con pasos de integración de 2 fs a una con un termostato y un baróstato más precisos,

termostato de Nose-Hoover a una temperatura de 317 K cada 1 ps y el baróstato de Parinello-Rahman semi isotrópico a 1 Bar de presión cada 5 ps y una compresibilidad de $4 \times 10^{-5} \text{ Bar}^{-1}$. Las dinámicas moleculares de producción se realizaron con los mismos parámetros de la última etapa de equilibrio y con tiempos de 2 ns cada una. Todas las dinámicas se integraron con el algoritmo *leap-frog*, e mantuvieron las distancias de los hidrógenos usando el algoritmo LINCS, tres grupos de enlaces fueron finalizadas con un radio de 12 Å desde el esquema de *Verlet*, las interacciones electrostáticas de larga distancia fueron computadas con el método *Particle Mesh Ewald* (PME) y se terminó suavemente al potencial de Lennard-Jones hasta un valor de cero, entre distancias de 10 Å de radio hasta el corte de finalización de 12 Å.

DARK Classics in Chemical Neuroscience: Salvinorin A

R. Bruno Hernández-Alvarado, Abraham Madariaga-Mazón, Alfredo Ortega,
and Karina Martínez-Mayorga*Cite This: <https://dx.doi.org/10.1021/acchemneuro.0c00608>

Read Online

ACCESS |

Metrics & More

Article Recommendations

Supporting Information

ABSTRACT: Salvinorin A is the main bioactive compound in *Salvia divinorum*, an endemic plant with ancestral use by the inhabitants of the Mazateca mountain range (Sierra Mazateca) in Oaxaca, México. The main use of *la pastora*, as locally known, is in spiritual rites due to its extraordinary hallucinogenic effects. Being the first known nonalkaloidal opioid-mediated psychotropic molecule, salvinorin A set new research areas in neuroscience. The absence of a protonated amine group, common to all previously known opioids, results in a fast metabolism with the concomitant fast elimination and swift loss of activity. The worldwide spread and psychotropic effects of salvinorin A account for its misuse and classification as a drug of abuse. Consequently, salvinorin A and *Salvia divinorum* are now banned in many countries. Several synthetic efforts have been focused on the improvement of physicochemical and biological properties of salvinorin A: from total synthesis to hundreds of analogues. In this Review, we discuss the impact of salvinorin A in chemistry and neuroscience covering the historical relevance, isolation from natural sources, synthetic efforts, and pharmacological and safety profiles. Altogether, the chemistry behind and the taboo that encloses salvinorin A makes it one of the most exquisite naturally occurring drugs.

KEYWORDS: Salvinorin A, *Salvia divinorum*, opioid, hallucinogen, kappa-opioid receptor, natural products



INTRODUCTION AND HISTORICAL RELEVANCE

Salvinorin A is the main active diterpene present on *Salvia divinorum*,¹ a plant from the mint family (*Labiatae*). This plant is endemic from Sierra Mazateca, a vastly wooded mountainous area in Oaxaca, Mexico, shown in Figure 1. Early reports of *Salvia divinorum* described preparations of a green tea of well-beaten leaves, as part of a shamanic-guided ritual, made by Mazatecs.^{2,3} During expeditions seeking hallucinogenic mushrooms in 1957, Gómez-Pompa went to a village called Huautla de Jiménez (Oaxaca, Mexico). Along their way, Mazatecs let him know about a stimulant plant called *Ŝka Pastora* (pronounced as *shka*), commonly used when hallucinogenic mushrooms were unavailable. Thus, Gómez-Pompa made the first collection of the unknown plant and classified it among the *Salvia* genus (the flowers on the sample were unavailable, so he could not assign a particular species). Later, Gordon-Wasson and Hofmann obtained enough flowered herbarium material at San José Tenango⁴ and sent the material to the *Salvia* genus expert, Epling, arriving to the complete description and classification of the plant.⁵

Salvia divinorum Epling and Játiva-M, described as a perennial herb, grows in large clones to over one meter in height. Nonetheless, several mistakes were made in the first description of the plant (e.g., assigning wrong flower color and misclassified in the *Dusenostachys* section); thereby, the official description was corrected by Reisfield⁶ based on his exhaustive fieldwork on Sierra Mazateca between 1983 and 1984. The

species *divinorum* was attributed due to the divinatory purposes given by Mazatec shamans to identify an illness or even to find out a guilty person of a robbery.^{3,4} In turn, Mazatecs refer to the plant as *Ŝka Pastora*, which refers to Virgin Mary's herb or the Shepherdess's Leaves. Little is known about the indigenous name; nonetheless, Ott stated different arguments regarding the introduction of *Salvia divinorum* as a post-Colonial event or the possible Christian influence on the original Mazatec name.⁷

During the search of novel terpenoids in the *Salvia* species, salvinorin A was isolated and chemically characterized for the first time by Ortega et al. from dried leaves of *Salvia divinorum*.⁸ Two years later, Valdés attributed the plant's psychoactive properties to the major component contained in the leaves, divinorin A (same as salvinorin A).⁹ Since then, different therapeutic and psychotropic effects of salvinorin A have been studied, including psychedelic, antinociceptive, and antidepressant. A remarkable feature of salvinorin A was discovered in 2002 by Roth et al. They found that salvinorin A

Special Issue: DARK Classics in Chemical Neuroscience II

Received: September 18, 2020

Accepted: October 26, 2020

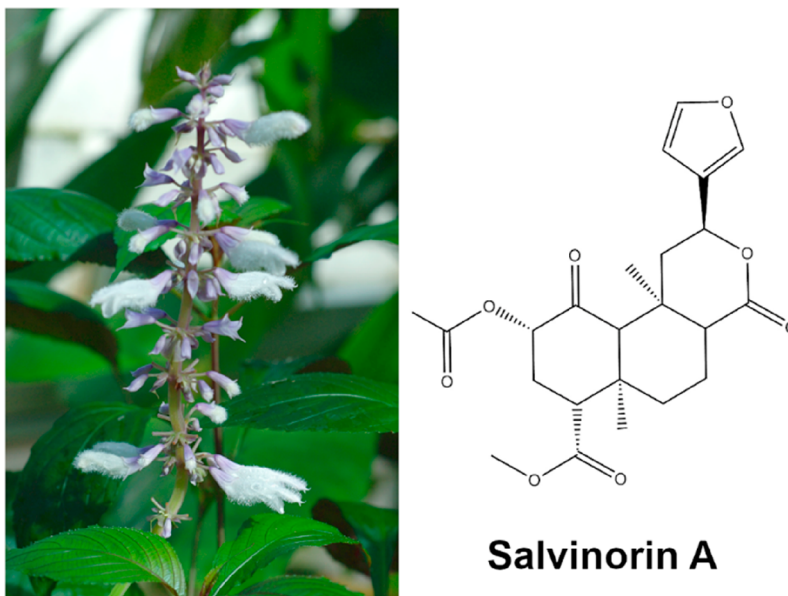


Figure 1. *Salvia divinorum* (left panel) and chemical structure of salvinorin A (right panel). Picture by Eric Hunt published under free GNU licensing.

activates kappa opioid receptors (KOR) and not serotonin-2A (5-HT_{2A}) receptors like classic hallucinogenic molecules do (e.g., LSD, psilocin, DMT, mescaline, etc.).¹⁰ KOR is a member of the G-protein coupled receptor (GPCR) superfamily. The activation of GPCRs conducts to signaling pathways involving G_{i/o} proteins and β -arrestins, among others. Preferred activation to one over the other is called biased agonism. In opioid receptors, the recruitment of β -arrestins has been associated with adverse effects¹¹ like sedation, anxiety, aversion, and dysphoria. Recently, oliceridine became the first biased opioid receptor agonist to reach FDA approval for human use.¹² Furthermore, salvinorin A lacks an aminergic functional group, which brings about a paradigm shift in opioid receptor research, stating it as the first naturally occurring, nonaminergic, selective KOR agonist.¹³

Traditional use is commonly described as manifestations of divinities and well-feeling states to establish energy balance and to foster internal peace.¹⁴ The consumption of leaves depends on the purpose (ceremonies, illness treatment, etc.),¹⁵ and it is accompanied by fasting and abstinence of sexual activity and of alcohol consumption. Several fieldwork researchers have documented their experience under salvinorin A at a psychoactive dose at shamanic ceremonies. The number of leaves used varies from 50 to 100, depending on the alcohol dependence level of the consumer.¹⁶ Thus, leaves can be chewed and swallowed, or crushed for a water beverage.¹⁴ Noteworthy, salvinorin A has poor solubility in water; thus, softer effects are perceived with this method. After 30 min, consumers experience different sensations such as dysphoria, a sense of depersonalization, and out-of-body experiences,¹⁵ followed by colorful visions, proprioceptive sensations, and hallucinations lasting up to an hour.

The dark side of salvinorin A became notable once *Salvia divinorum* spread worldwide. Its short hallucinogenic effect, relatively easy plant growth, and legal status make salvinorin A a preferable choice over classical hallucinogens, such as LSD or ketamine. However, self-producers frequently find three main problems while growing *Salvia divinorum*: a low seed set, a low germination rate, and a low survival rate.¹⁷

According to Mazatec practices and based on the fact that the plant grows scarcely in the wild, it was thought, until 1980, that the reproduction of the plant depended on cuttings. Nonetheless, several researchers (and consumers) have achieved effective reproduction by germinating new plants from seeds. Nowadays, *Salvia divinorum* dried leaves are sold on the internet or even as extracts at different concentrations.¹⁸ Some street names refer to salvinorin A or *Salvia divinorum* as Shepherdess's Herb, Diviner's Sage, Sally-D, and Magic Mint. The recreational community has achieved more effective ways to get stronger and vivid hits. Leaving apart the traditional use, current *Salvia divinorum* consumers vaporize or smoke the leaves, which produces a rapid and intense subjective effect that lasts up to 15 min¹⁹ with subtle effects lasting approximately 24 h. Different human survey-based and physiological evaluations have been conducted after an acute *Salvia divinorum* administration. The surveys resemble that most of the experiences are pleasant and unique, including calmness and well-being feelings. Participants also reported a significant loss of awareness of their surroundings, dreamlike experiences, synesthesia, and depersonalization.^{19–21} Salvinorin A effects through inhalation have been assessed with the Hallucinogenic Rating Scale²² and the Mysticism Scale.²³ These scales were employed in a double-blind placebo-controlled evaluation on four healthy volunteers.²⁴ In that study, the hallucinogen and mystical effects of salvinorin A seemed similar to oral administration of psilocybin and high-dose intravenous DMT. No significant changes were observed on the blood pressure and heart rate, suggesting a safe drug profile. Still, the authors highlighted the limitations of their conclusions due to the small sample size. Further information about safety and toxicology will be discussed in the **Pharmacokinetics of Salvinorin A** section of this work.

Interestingly, Currie et al. reported a survey on Canadian 12–17 year old subjects ($N = 42\ 179$), showing that 6.2% have used *Salvia divinorum* at least once in their life.²⁵ An independent survey in the United States ($N = 24\ 638$, 18–34 years old; $N = 17\ 705$, 12–17 years old) showed that 5.08% of adults and 1.66% of the young have used the plant.²⁶ Lastly,

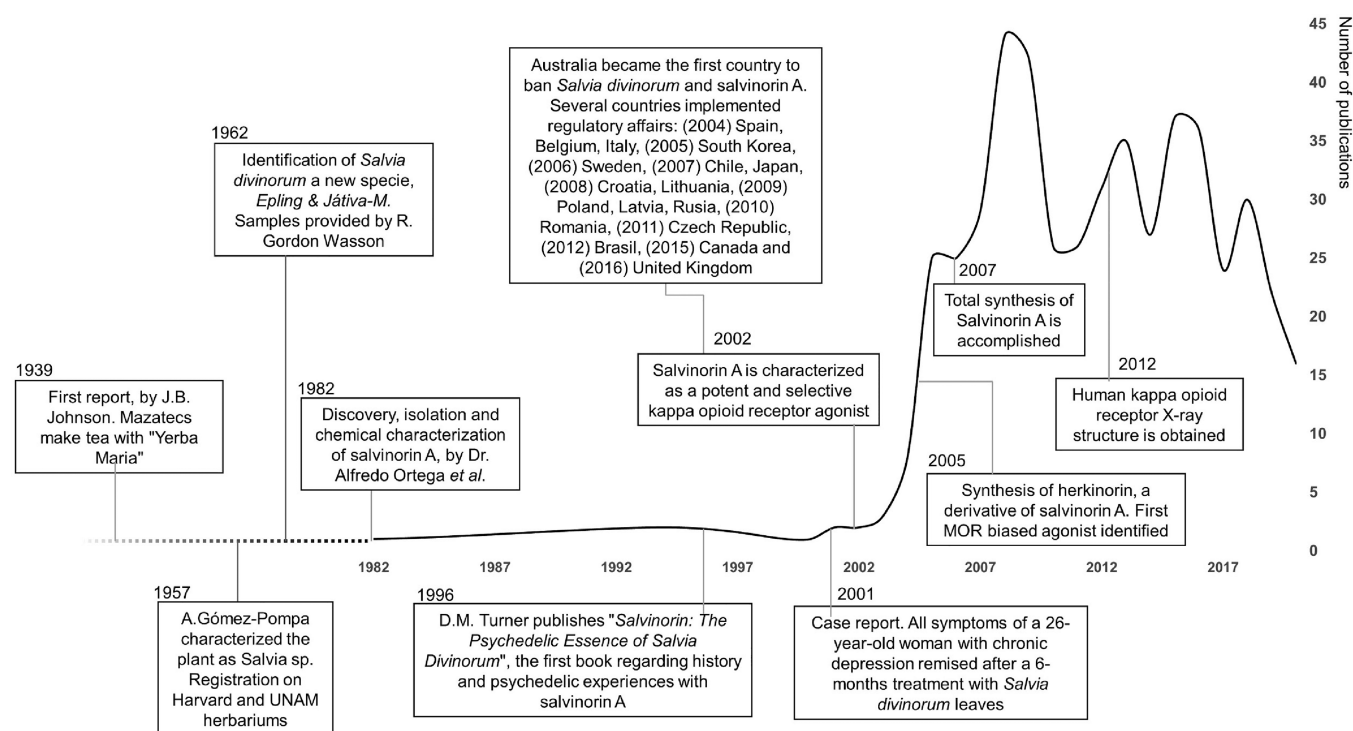


Figure 2. Milestones in the history of *Salvia divinorum* and salvinorin A. Y-axis shows the number of new publications over the years. Source: scopus (www.scopus.com), keyword “salvinorin A”.

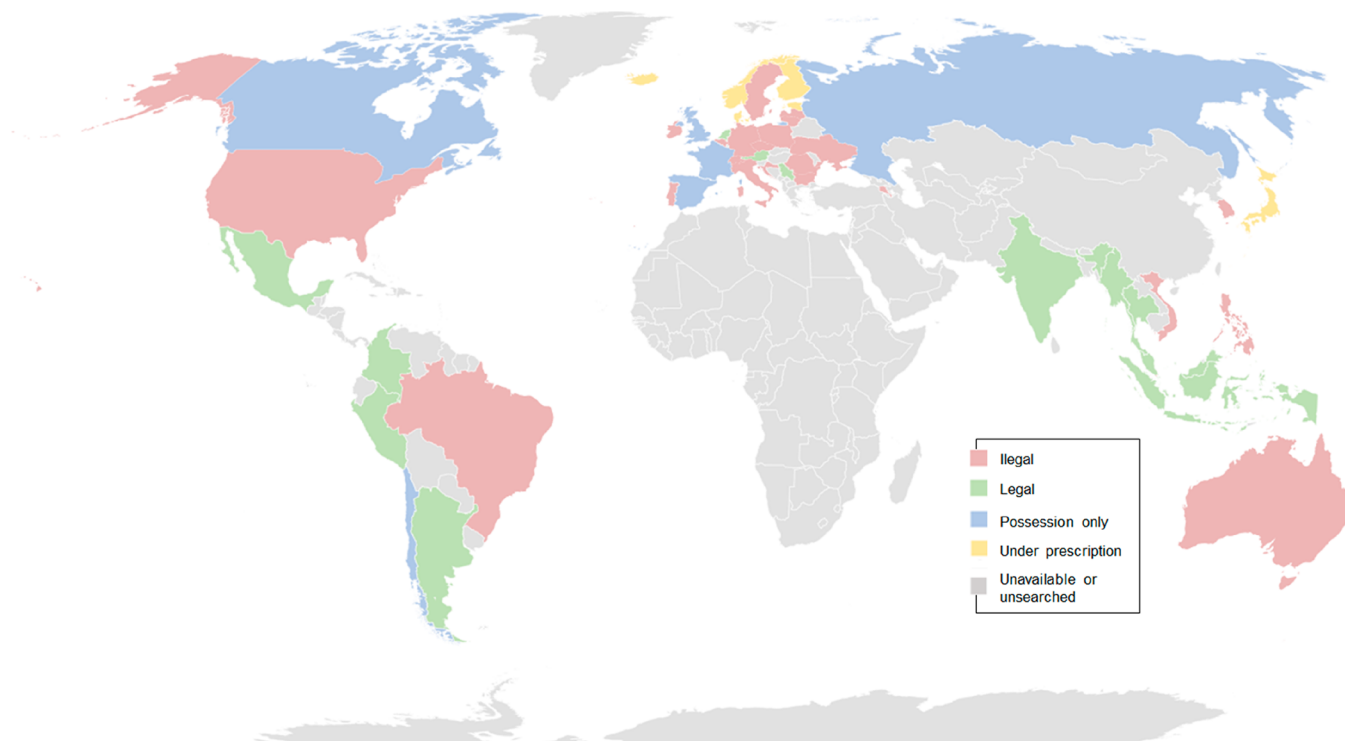


Figure 3. Distribution of the legal status of salvinorin A and/or *Salvia divinorum* around the world. A list of sources of information is provided as Supporting Information.

in 2011, an analysis of *Salvia divinorum* YouTube videos revealed that 65% reported good experiences and 12% reported negative ones.²⁷

Many users have stated not to use salvinorin A again after their first experience, mainly because the effects are too intense and short-lasting.^{28,29} Also, adverse effects (most common,

anxiety) are notable causes that led to considering salvinorin A as a nonfrequently used recreational drug. Researchers and experienced consumers have produced different documents and audiovisual content directed to nonexperienced *Salvia divinorum* consumers. For example, the Daniel Siebert nonlucrative webpage (www.sagewisdom.org) summarizes his

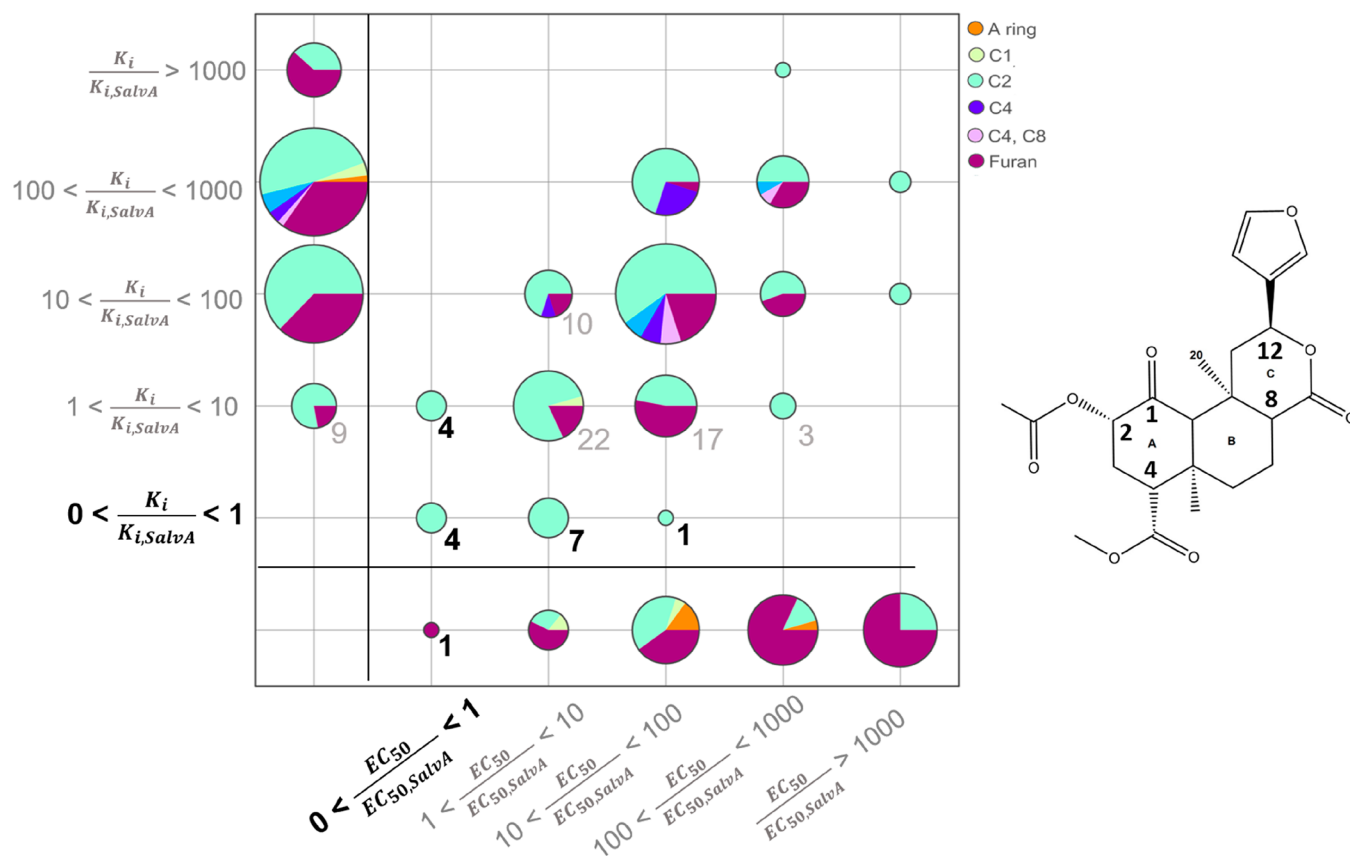


Figure 4. Categorical change of relative EC_{50} and K_i across salvinorin A analogues. The size of the circles represents the number of analogues on each category and are color-coded by substitution sites listed at the right. Only substitution sites with more than five analogues are included in this graph; the full list of analogues can be found in the paper by Roach and Shenvi.³² The number of analogues with potency or affinity better than (black) or equipotent (gray) to those of salvinorin A are labeled.

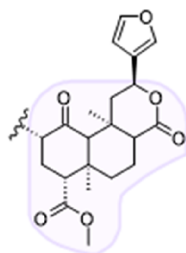
subjective experience and survey data for nonexperienced users, including dose calculation and important details prior to, during, and after a salvinorin A session. A summary of historical events of salvinorin A is shown in Figure 2. The timeline is built based on the number of publications from scopus by August 2020, searching for salvinorin A as the keyword.

Manufacturing Information and Legal Status. The easy worldwide accessibility to different *Salvia divinorum* forms, such as dried leaves or gradual-concentration extracts, marketed as “legal high” (a drug that is taken for pleasure and has the same effect as an illegal drug, but has not been made illegal), contributes to its use over illegal drugs.³⁰ In addition, the potent hallucinogenic and well-being effects of both *Salvia divinorum* and salvinorin A contribute to recreational use. Noteworthy, the concept of “drug abuse” includes the use of a substance for purposes other than medical and scientific, i.e., recreational use.³¹ Figure 3 summarizes the legal status of *Salvia divinorum* and salvinorin A in different countries. The first country to ban the possession, distribution, and selling of *Salvia divinorum* was Australia in 2002. These led to most European countries to prohibit *Salvia divinorum* (varying the prohibitive degrees). In the United States, most states implemented salvinorin A manufacturing regulation policies, where most of them have stated *Salvia divinorum* and salvinorin A as Schedule I substance. In few others like Louisiana, Tennessee, and West Virginia, the legal status remains as Legal but not for human consumption. In California

or Maine, the legal status remains as Legal, but illegal to provide it to an underage person. The possession, distribution, and selling of salvinorin A is legal in Mexico, some countries in south America, India, and other Asian countries.

■ SYNTHESIS OF ANALOGUES/STRUCTURE–ACTIVITY RELATIONSHIPS

The total synthesis of natural products such as salvinorin A provides the opportunity to generate structural analogues with various biological properties. Additionally, identifying the pharmacophoric features would allow for developing simpler structures, easier to synthesize but preserving the biological activities. In turn, if there is enough information, molecular models can aid in developing analogues with improved biological profiles. Salvinorin A has challenged researchers in different aspects of the ideal pipeline in natural product-based drug discovery. Having six chiral centers and a diterpene core structure, the total synthesis of salvinorin A is elusive. Consequently, generating analogues of salvinorin A have relied, for the most part, on semisynthesis. Notably, the deletion of different parts of the molecule leads to the loss in binding affinity; thus, modifications or simplification of salvinorin A goes at the cost of biological activity. However, pharmacokinetics and pharmacodynamic properties need to be improved in salvinorin A. The development of new analogues should focus on these and other properties, as discussed in the following sections of this paper.



Moiety	K_i (nM)	$\frac{K_i}{K_{i,SalivA}}$	EC_{50} (nM)	$\frac{EC_{50}}{EC_{50,SalivA}}$	Moiety	K_i (nM)	$\frac{K_i}{K_{i,SalivA}}$	EC_{50} (nM)	$\frac{EC_{50}}{EC_{50,SalivA}}$
	0.59	0.33	0.08	0.00		1.90	0.79	3.80	2.11
	0.32	0.13	0.14	0.08		1.60	0.67	4.20	2.33
	1.90	0.26	6.00	0.15		2.20	0.92	5.20	2.89
	1.50	0.83	11.00	0.65		1.80	0.95	140.00	3.50
	2.10	1.17	0.19	0.01		6.70	0.91	150.00	3.75
	1.60	1.23	0.75	0.17		2.00	0.32	137.00	27.40
	3.20	2.46	2.40	0.53		2.50	0.83	9.50	1.38
	2.30	1.21	30.00	0.75		NA	NA	0.019	0.63
	6.21	0.84	60.00	1.50					

Figure 5. Analogues with better binding affinity (K_i) or potency (EC_{50}) than those of salvinorin A.

Recently, Roach and Shenvi³² provided a comprehensive review of analogues of salvinorin A. As described by the authors, the development of structure–activity relationships is not straightforward, mainly because of two reasons. First, 80% of the modifications have been performed in only two positions of the molecule, C2, and the furan ring. Second, only 2% of the analogues have improved either K_i or EC_{50} over those of salvinorin A. Furthermore, the experimental conditions (e.g., radioligand utilized) as well as the type of information reported (binding affinity, potency, evaluation of the reference compound, etc.) are not homogeneous. Nonetheless, some conclusions can be drawn. The K_i and EC_{50} values, relative to salvinorin A, of analogues collected by Roach and Shenvi, are summarized in Figure 4. For this analysis, only those molecules with either K_i or EC_{50} relative to salvinorin A are considered. Note that other studies report analogues without reporting a measure of salvinorin A as an internal reference. Circles are sized by the number of molecules that belong to the corresponding interval and are color-coded by the substitution sites, detailed at the right of the graph. Molecules with relative K_i or EC_{50} lower than 1 correspond to molecules with better binding affinity or potency than salvinorin A, respectively, and are highlighted as black numbers. There are 12 molecules in this category out of 306 (3.92%) with relative K_i values and 9 out of 253 (3.55%) with relative EC_{50} values. The chemical structures of these molecules are shown in Figure 5. Circles within the rectangles

correspond to molecules that were evaluated in one experiment but not the other. Interestingly, there is a linear trend in the data shown in the square. As expected, tight binders tend to have low EC_{50} values. Not surprisingly, those substitutions that are more represented in the data (C2 and furan sites) span all the intervals. Molecules in the pie charts labeled with gray numbers can be regarded as equipotent to salvinorin A on at least one axis. Further development of those molecules could be of interest.

For the most part, analogues fail to improve affinity and agonistic activity toward KOR, compared to salvinorin A. This speaks of the excellent complementarity in the KOR binding site, and is particularly true for modifications at C2 and furan ring, where several analogues have been evaluated. But this might not be the case for analogues with modifications at other sites of salvinorin A since only a few have been synthesized. Even though exploration of the structure–activity relationship at sites other than C2 and the furan ring, alongside modeling studies, is warranted, it is not fortuitous that most of the structural modifications so far are at C2 and the furan ring. These positions are synthetically more available than the rest of the structure. Although challenging, the total synthesis of salvinorin A could provide analogues at positions not yet explored.

Chemical Synthesis. Total synthesis of salvinorin A has been attempted for more than a decade. It was first accomplished by Scheerer et al. in 2007:³³ in this first attempt,

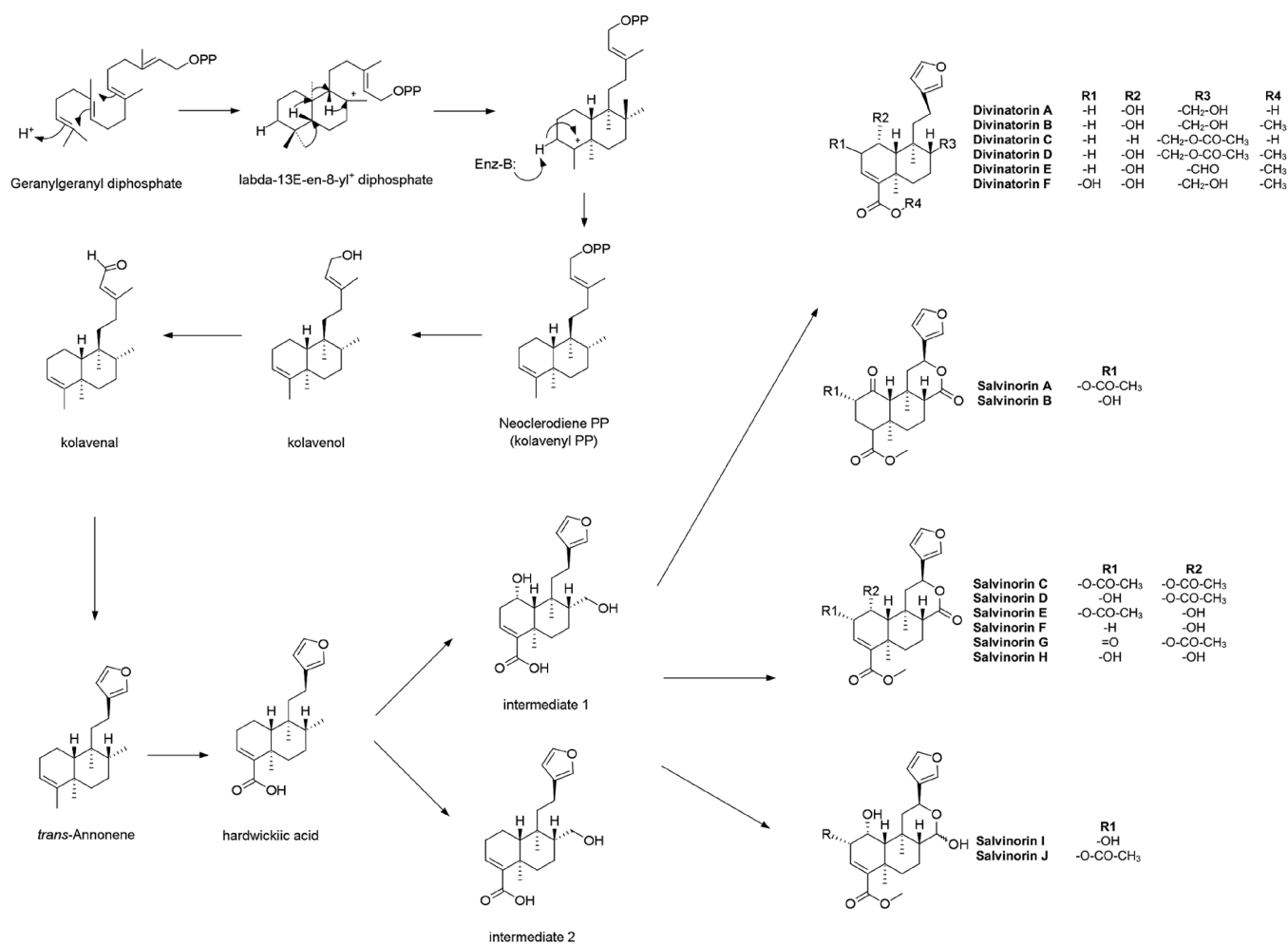


Figure 6. Proposed biosynthetic pathway of salvinorin A and the main metabolites in *Salvia divinorum*. The main route of biosynthesis is shown in the left side of the figure, starting from the common precursor geranylgeranyl diphosphate. Several enzymes are involved in the cyclization including two different diterpene synthases for generating two intermediates, which lead to the different scaffolds of divinatorins and salvinorins (right side).

salvinorin A was obtained with a 0.8% yield in 29 reaction steps. During the following years, Nozawa et al. lowered the number of synthetic steps to 20, with an overall yield of 0.95%. In a follow-up study, the same research group reported a synthetic route consisting of 13 steps, with an overall 2.8% yield.³⁴ Simultaneous efforts by Forsyth and collaborators³⁵ provided a highly functionalized *trans*-decalin core structure of salvinorin A. They later reported the synthesis of (–)-salvinorin A³⁶ from a decalin structure. By the time of this work, the most recent total synthesis of salvinorin A was reported by Wang and Metz,³⁷ obtaining salvinorin A in 18 reaction steps. This synthesis deviated from the previous ones and consisted of an olefin whose synthesis involved two diastereoselective intramolecular Diels–Alder reactions as key transformations.

To have access to structurally simplified analogues of salvinorin A, Roach et al.³⁸ and Sherwood et al.³⁹ have explored the synthesis of slight modifications of salvinorin A. While Roach et al. reported 20-nor salvinorin A, Sherwood et al. obtained pseudo-neoclerodanes to resemble salvinorin A. This has made available several analogues with fewer synthetic steps and better yields. These options compromise potency to some extent, but they make accessible the generation of analogues and structure–activity relationship studies that otherwise would not be possible.

BIOSYNTHESIS AND EXTRACTION OF SALVINORIN A

Biosynthesis. The neoclerodane diterpenoid salvinorin A belongs to the superfamily of labdane-related diterpenoids, accounting for over 7000 chemicals. Depending on the stereochemical configurations, clerodanes can be classified into neo- and ent-neoclerodanes.⁴⁰ According to labeling analysis by NMR and HR-ESI-MS, biosynthesis of salvinorin A and related metabolites follows the 2-C-methyl-erythritol 4-phosphate (MEP) pathway⁴¹ in two reaction steps by class II and class I diterpene synthases (diTPS), evidenced by the mining of leaf- and trichome-specific transcriptomes.⁴² Initially, protonation-dependent cycloisomerization of geranylgeranyl diphosphate (GGPP) is mediated by a class II diTPS via the intermediary labda-13E-en-8-yl⁺ diphosphate carbocation. The first step is the migration of hydride, generating a tertiary carbocation; successive series of concerted Wagner–Meerwein 1,2-hydride and methyl shifts followed by proton loss leads to a rearranged skeleton with different stereochemistry.⁴¹ With the elucidation of (–)-kolavenyl diphosphate as the main product of the enzymatic conversion of GGPP by the class II diTPS, Chen and co-workers proposed a salvinorin A biosynthesis pathway (Figure 6).⁴⁰ (–)-Kolavenyl diphosphate is dephosphorylated by a class I diTPS into (–)-kolavenol and undergoes different regio- and stereoselective reactions by

several enzymes. These structural modifications result in an array of minor metabolites, representing intermediates and precursors of salvinorin A. There are several theories that postulate precursors of salvinorin A. Kutrzeba and collaborators suggested salvinorins D and E, which are in dynamic equilibrium via transacetylation, as potential biosynthetic precursors.⁴³ On the other hand, Chen postulates salvinorin H as the central precursor of salvinorins B, C, D, E, and I; and salvinorin B as the immediate precursor of salvinorin A.⁴⁰ Finally, based on NMR studies, it was proposed that salvinorin J is derived from salvinorin I via an acetyltransferase, and this latter metabolite from divinorin E via oxygenation/acetalization.⁴⁴

Extraction and Isolation. The site of production and accumulation of salvinorin A is the glandular trichomes of the lower surface of the leaf (abaxial side),⁴⁰ where the yield in young ground leaves of *Salvia divinorum* is about 0.90 mg/g dry weight.⁴¹ Salvinorin A was isolated for the first time from dried, milled leaves with boiling chloroform and a further chromatography process.⁸ Later on, in 1984, Valdes et al. isolated the same molecule along with its analogue salvinorin B by extracting the lyophilized and grounded leaves with ether, followed by methanol extraction.⁹ Different methods have been explored to afford better yields of salvinorin A. In 2003, Munro and Rizzacasa used acetone for extraction followed by pigment cleaning with activated charcoal. With this procedure, the isolation of salvinorins B–F and salvinorin A was attainable, with a yield of 3.4 g/kg of dried leaves. They proposed that extraction at room temperature gives higher recovery than refluxing since salvinorin A was probably decomposing in hot solutions.⁴² A modified procedure was adopted by Tidgewell et al., percolating the fine-grounded dried vegetal material, followed by acid/basic extraction and further purification by column chromatography to afford 5 g of salvinorin A/kg of the plant.⁴⁵ Alternatively, a leaf-surface extraction method was developed by Kutrzeba et al. in 2009, by dipping the fresh leaves in chloroform, based on the fact that salvinorin A and its analogues are predominantly synthesized on the surface of the leaves. This method afforded 2.4 g of pure salvinorin A, with the advantage of yielding a chlorophyll-free extract, in contrast to traditional methods.⁴⁴

■ PHARMACOKINETICS OF SALVINORIN A

Analytical Detection Methods. Different methods have been developed for separation, detection, and quantification of salvinorin A and some of its metabolites and analogues in biological fluids. The most common samples for detection include plasma and urine from humans and cerebrospinal fluid in monkeys. An electrospray ionization method for liquid chromatography–mass spectrometry (LC/ESI-MS) was developed for the separation and quantitation of six salvinorins (A–F) and three divinorins (A–C) from herbal preparations.⁴⁶ The alternative use of atmospheric pressure chemical ionization (APCI) suggested that salvinorin B is the main metabolite of salvinorin A *ex vivo*, when sampled in human plasma and urine and monkey cerebrospinal fluid.⁴⁷ Quantification of salvinorin A from the cerebrospinal fluid of monkeys and human plasma has been achieved by developing a liquid chromatography with tandem mass spectrometry methodology.⁴⁸ For forensic toxicology purposes, blood or urine samples are difficult to collect due to exsanguination or advanced putrefaction. Alternatively, vitreous humor or pericardial fluid can be collected during an autopsy in

reasonable quantities. Margalho et al. developed and validated an analytical method for the determination of salvinorin A in these biological matrices using a solid-phase extraction procedure coupled to gas chromatography–mass spectrometry, achieving good limits of detection and quantitation (5.0 ng/mL).⁴⁹ Finally, immunoassay methods using monoclonal antibodies against salvinorin A in an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) have proven to be sensitive, precise, and reliable for detecting salvinorins and chemical identification of the species *Salvia divinorum*.⁵⁰

Pharmacokinetics of Salvinorin A. As previously mentioned, once salvinorin A enters the organism, its biological activity is rapidly exerted. Its effects last no longer than 30 min, depending on the administration route, suggesting that salvinorin A undergoes a fast metabolism and that its metabolic products are inactive. The rapid psychoactive effects of salvinorin A can be reached when leaves are chewed and held in the mouth (extended exposure for about 10 min), rather than via quick swallowing or via drinking in aqueous herbal preparations. However, consumers prefer inhalation preparations because hallucinations effects occur within 30 s and the leaves have a bitter flavor if directly chewed. An effective dose of 200–500 μ g for smoked ingestion has been reported.⁵¹ It is also suggested that the gastrointestinal system is responsible for breaking down the natural hallucinogen.³⁰ Pharmacokinetics of salvinorin A and some of its natural analogues have been studied in different animal models and *in vitro* experiments. The relatively easy brain-blood barrier transport of salvinorin A, its rapid metabolism, and its pharmacokinetic profile contribute to its swift hallucinogenic effect and short span of action. Additionally, gender differences are observed: males have faster distribution and elimination half-lives than those of females.

A rapid elimination half-life of 56.6 ± 24.8 min for salvinorin A was observed in rhesus monkeys after a bolus injection by intravenous administration. Studies suggest that salvinorin A is deacetylated by esterases enzymes present in the blood leading to salvinorin B, the major metabolite accumulated *ex vivo*.⁵² Some authors propose shared metabolic pathways between salvinorin B and other abused drugs such as cocaine, heroin, and tetrahydrocannabinol.⁵¹ A positron emission tomography (PET) study in primates with labeled salvinorin A revealed extremely rapid brain uptake and clearing (short half-life), denoting the highest concentration in the cerebellum and visual cortex, a fact that authors correlate with its sensorial effects, especially when smoked. This rapid entry into the brain reaches its maximum concentration in about 40 s, being faster (input rate) than cocaine, for example. Kinetics studies in peripheral organs showed renal filtration and high activity in the gallbladder as potential routes of excretion for salvinorin A and its metabolic byproducts.⁵³ An active but metabolically resistant derivative of salvinorin A showed a slower clearance in brain concentration than salvinorin A, evidencing that the fast metabolism of salvinorin A is responsible for its short-lasting psychotropic effects.⁵⁴

When incubated in the presence of metabolic enzymes CYP2D6, CYP1A1, CYP2C18, and CYP2E1, the concentration of salvinorin A decreased, pointing to metabolic pathways similar to those described for other drugs of abuse.⁵¹ Another suggested enzyme involved in the degradation and metabolism of salvinorin A is the carboxylesterase (a serine esterase).⁵⁵

Toxicity of Salvinorin A. Several studies on salvinorin or *Salvia divinorum* herbal extracts have been performed to assess toxicity. For example, chronic intraperitoneal administration of salvinorin A in primates³⁰ and in mice⁵⁶ showed no histological differences compared to control animals. Acute toxicity (1600 $\mu\text{g}/\text{kg}$) in rats demonstrated no effects on cardiac conduction, temperature, or galvanic response.⁵⁶ It is much less toxic than morphine ($\text{LD}_{50} = 0.78$ and $0.98 \mu\text{g}/\text{mL}$ in human males and females, respectively).⁵⁷ Even doses up to 12 mg of inhaled pure salvinorin A produce no risk effects in humans.⁵⁸ Although most of the in vivo studies provide evidence for the relative safety of salvinorin A, even at doses higher than the one commonly used by humans, in vitro experiments with cell lines (N 27, Caco 2, Hep G2, COS 7, and Hek 293) reveal that salvinorin A cytotoxicity is both dose- and time-dependent, which highlights the relevance of performing further studies focusing on the chronic and continuous consumption of *Salvia divinorum*.

■ PHARMACODYNAMICS

A study in 2002 screened salvinorin A with a battery of 50 receptors, transporters, and ion channels, revealing high activity to KOR and lack of activity toward the molecular target of classic hallucinogens like LSD or mescaline, the 5-HT_{2A} receptor.¹⁰ Interestingly, salvinorin A is the first known nonaminergic ligand of the opioid receptors. Another outstanding feature of salvinorin A is the high affinity and selectivity toward KOR ($K_i = 17.5 \text{ nM}$, $>1000 \text{ nM}$, and $>10\,000 \text{ nM}$ for KOR, MOR (mu-opioid receptor), and DOR (delta-opioid receptor), respectively). Its potency as a hallucinogen (200 μg) is similar to that of LSD, the most potent entheogen known to date. KOR activation, either by dynorphins (endogenous peptidic ligands) or exogenous ligands (e.g., salvinorin A), decreases dopamine levels where KOR/dynorphin system is present, which includes the caudate-putamen, nucleus accumbens, hypothalamus, hippocampus, amygdala, and spinal cord (see more in the **Importance in Neuroscience** section). Observed effects after KOR activation are related to stress responses, such as analgesia, aversion, anxiogenic responses, and dysphoria-like behavior, including increased risk of drug abuse and addiction. A complete review is provided by Chavkin.⁵⁹ Nonetheless, salvinorin A does not produce typical adverse effects of KOR agonists, which opens the framework to different therapeutic potential applications.

Beyond KOR's agonistic effect, it has been postulated that salvinorin A modulates other biological targets. For example, in 2007, Prisinzano et al. reported allosteric modulation of salvinorin A in MOR;⁶⁰ however, further analyses have not been reported to date. In 2004, Corchero et al. reviewed the crosstalk interaction of salvinorin A with cannabinoid type 1 (CB₁) receptor.⁶¹ For example, while describing salvinorin A rewarding effects in the conditioned place preference test (CPP) in zebrafish, both stimulating (0.1–0.2 $\mu\text{g}/\text{kg}$) and depressive (5–10 $\mu\text{g}/\text{kg}$) induced effects were not blocked by norbinaltorphimine (nBNI) or by rimonabant, a CB₁ antagonist.⁶² Similarly, another CPP test in Wistar rats showed a dose-dependent biphasic behavior,⁶³ antagonized by rimonabant (1 mg/kg) and nBNI (10 mg/kg). Moreover, antinociception models^{64,65} and in vivo inflammation models^{66–68} highlight the relationship between salvinorin A and the cannabinoid endogenous system. Interestingly, the lack of

direct activation of CB₁ receptors by salvinorin A^{10,66} suggests an allosteric modulation.

A possible functional KOR-CB₁ heterodimer formation, instead of an intimate interaction between salvinorin A and CB₁ receptor, is supported by different data: (1) the attenuation of KOR activation by the agonist U69593 blocked by rimonabant; (2) the nonsubstitution of Δ^9 -tetrahydrocannabinol (THC) by salvinorin A in mice;⁶⁹ and (3) the direct receptor-receptor interaction between MOR and CB₁.⁷⁰ Further studies are required to characterize the different signaling pathways triggered by salvinorin A.

Antinociception and Safer Analgesics. KOR has been regarded as a safer alternative to classic opioids, which act mainly on MOR and could trigger undesirable effects such as respiratory depression.⁷¹ Even though inconsistent conclusions were achieved after intraperitoneal salvinorin A administration and evaluation in the acetic acid abdominal constriction test,⁷² several studies point out the antinociceptive properties of salvinorin A. Intraperitoneal administration of salvinorin A produced dose-dependent weak antinociception in the mice tail-flick and hot plate test,⁷³ and similar results are observed through intrathecal administration.⁷⁴ As expected, the antinociceptive effects were attenuated by KOR antagonist nBNI pretreatment. In terms of chronic pain, it has been seen that daily treatment with salvinorin A reduces formalin-induced allodynia, which is associated with chronic pain conditions.⁷⁵ Consistently, salvinorin A reduces glial activation (morphological changes) and modulates proinflammatory mediators in the neural transmission. These molecular and morphological characteristics contribute to central sensitization under chronic pain conditions.⁷⁶ Due to undesired properties of salvinorin A like short-lasting transit in the CNS, innovative analogues (e.g., 16-bromo salvinorin A and 15-ethynyl salvinorin A) were evaluated on preclinical pain models as well as KOR biased agonism;⁷⁷ both ligands showed longer antinociceptive duration than salvinorin A. Additionally, 16-bromo salvinorin A was identified as biased ligand toward G-protein signaling over β -arrestin recruitment.

One of the main concerns when using MOR painkillers is the abuse and addiction potential. Addictive classical MOR agonists increase dopamine levels in the nucleus accumbens in rodents, which is common with other addictive drugs like cocaine. In contrast, salvinorin A and other KOR agonists decrease dopamine levels.^{78,79} Furthermore, nontraditional user surveys showed that *Salvia* use is sporadic,⁸⁰ thus diminishing its potential as a drug of abuse.

Gastrointestinal Activity. Mazatec shamans use *Salvia divinorum* extracts to relieve diarrhea and regulate defecation and urination in sick individuals.¹⁶ Supported by several in vivo and in vitro studies, the antiarrheal properties of *Salvia divinorum* are attributed to salvinorin A. For instance, Capasso et al.⁸¹ observed that a standardized extract of *Salvia divinorum* and salvinorin A at high doses (3 and 10 mg/kg) inhibited gut motility, both in physiological states and under croton-oil-induced intestinal inflammation in mice. The salvinorin A potency increased in the croton-oil-induced intestinal inflammation in mice. However, inhibition of gut motility was not observed when the selective KOR agonist U-50488 was used, suggesting that salvinorin A triggered additional targets besides KOR.⁸¹ A few months later, the same research group concluded that the inhibitory effect of salvinorin A on the inflamed (not in normal) gut involved both KOR and cannabinoid CB₁ receptors through a functional interaction,⁶⁶

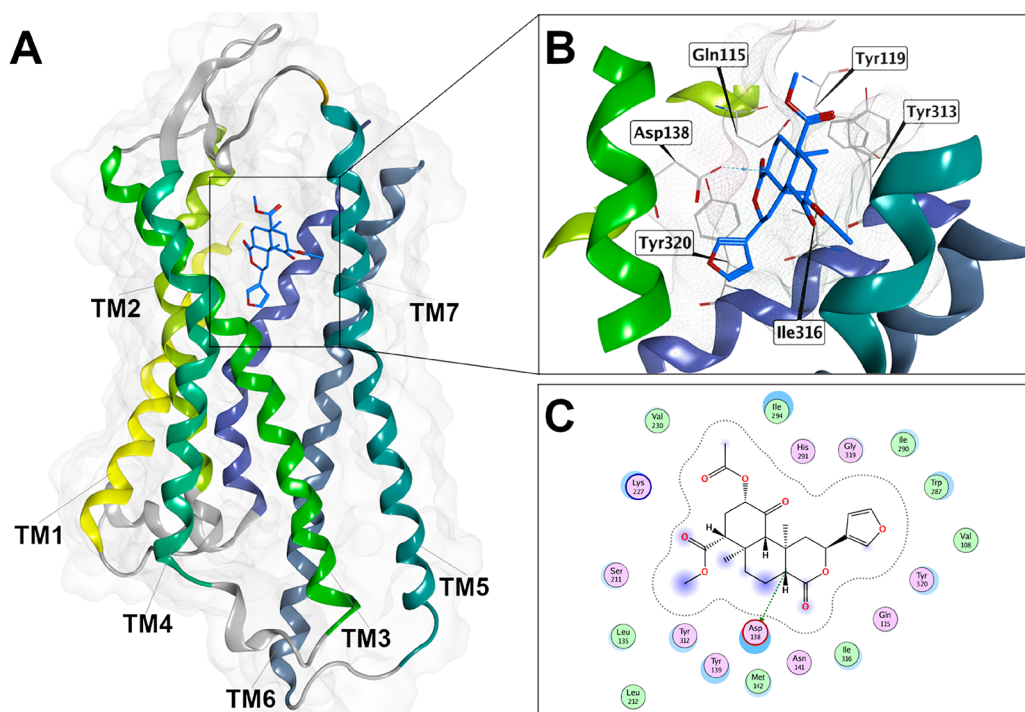


Figure 7. Binding model for salvinorin A and KOR. (A) Salvinorin A (cyan sticks) bound to the orthosteric site in KOR (ribbons, colored by transmembrane domains TM1–TM7. PDB ID: 6B73). (B) Detail on the residues interacting with salvinorin A. (C) Two-dimensional diagram of all receptor–ligand interactions (pink circles denote polar interactions, pink cyan-edged circles mean polar and basic interactions, pink red-edged circles indicate polar and acidic interactions, green circles symbolize greasy interactions, blue-shadowed circles represent receptor exposure, and green dotted arrows indicate side chain acceptor. A dotted line around the ligand represents the proximity contour). Docking study, analysis, and images generated with the software Molecular Operating Environment (Chemical Computing Group).

reinforcing the idea of cross-linked interactions between CB receptors and KOR.

Other Biological Activities of Salvinorin A. One advantage of salvinorin A diterpenic core is the ability to cross the blood-brain barrier, which offers an excellent scaffold for developing different analogues. In 2014, Vasiljevik et al. probed different salvinorin A analogues in antiproliferative assays to evaluate its anticancer properties.⁸² Although this data needs to be independently replicated, different quinone-containing salvinorin A analogues showed antiproliferative activity in breast cancer cell lines and also passive diffusion across an *in vitro* model of the blood-brain barrier, suggesting the neoclerodane core as a potential scaffold for the development of antiproliferative agents toward the central nervous system.

MOLECULAR MODELING STUDIES

Exploring modes of binding of ligands to macromolecular targets provides detailed structural information for the understanding of the protein–ligand recognition process and the atomic features responsible for its biological activity. The binding mode of salvinorin A to KOR is particularly intriguing because salvinorin A was the first KOR agonist with similar hallucinogenic effects to alkaloids, but lacking its characteristic amino group. Therefore, it is critical to elucidate, at an atomistic level, the signaling pathway that rules the opioid-like effects of KOR ligands, useful to understand and predict their therapeutic and potential side effects. Before the three-dimensional structures of opioid receptors came to light, combined studies based on homology modeling and directed mutagenesis provided reliable models that explained most of

the interactions between salvinorin A and KOR.^{83–86} In general, the binding pocket for KOR ligands involves residues in transmembrane 3 (TM3) and TM6, mainly by hydrophobic contacts, and a salt bridge interaction with a highly conserved aspartate in TM3 (Asp138). In the case of salvinorin A, via binding experiments with different KOR mutants, the key role of Tyr313, Tyr119, and Tyr320 has been identified.⁸⁴ For instance, single mutation for alanine in Tyr313 (Y313A) results in a dramatic decrease in the affinity of salvinorin A. Furthermore, it was proposed that hydrophobic interactions between the ligand and Tyr313 are important in stabilization since the mutation for phenylalanine (Y313F) did not cause loss of binding affinity. The agonist-induced potency is abolished by mutations in Tyr119 (Y119A) and Tyr320 (Y320F), evidencing the predominance of hydrophobic interactions,⁸³ and also by replacing Ile316 by alanine (I316A), which is positioned between two tyrosines (Tyr313 and Tyr320) in the R-helical bundle of TM7.⁸⁶ Additionally, hydrogen bonding interactions have also been proposed for residues Gln115 and Tyr313.⁸⁴ Finally, it has been suggested that, since there is no relatively strong ionic interaction stabilizing salvinorin A, different binding modes to KOR may be expected.⁸³ Figure 7 depicts a binding model for salvinorin A and KOR from molecular docking calculations made in this work. The conformation and amino acid interactions of the natural product is in accordance with the one discussed above.

IMPORTANCE IN NEUROSCIENCE

Pharmacological effects such as drug reinforcement, reward stimulus, and motor activity affect the dorsal and ventral striatum (i.e., caudate-putamen and nucleus accumbens,

respectively).⁸⁷ Importantly, several KOR agonists affect these areas by altering the concentration of dopamine. Consequently, salvinorin A has potential applications in mood disorders, brain reward mechanisms, and other neurological illnesses. It has been proposed that the lowering in dopamine levels, through striatal pathways by salvinorin A, involves the decrease of dopamine release^{79,88} and the increase of the dopamine transporter (DAT) activity. DAT activity has also been related to the ERK1/2 pathway, suggesting that salvinorin A-dependent increased DAT function is sensible to ERK1/2 inhibition.⁸⁹

The drop of dopamine levels associated with higher doses of salvinorin A (1.0 mg/kg and 3.2 mg/kg i.p. in mice)⁹⁰ plays a role in dependence, tolerance, and ultimately abuse. In behavioral science, an aversive stimulus produced by an agent coadministered with a reinforcer could be considered a punishment. A growing body of literature identifies the KOR agonist's effects as punishers (in the sense of an aversion experience) in drug self-administration studies. In those studies, KOR agonists are evaluated in conjunction with reinforcing drugs, such as cocaine or MOR agonists.^{91,92} Freeman et al. reported a reduction in cocaine and remifentanyl self-administration in rhesus monkeys when the reinforcing drug was paired with salvinorin A.⁹³ Recent studies show that salvinorin A and nalfurafine punished oxycodone self-administration in rhesus monkeys in a dose-dependent manner.⁹⁴ Moreover, the punishment effects induced by nalfurafine were nBNI reversed, suggesting that the observed effects were mediated by KOR activation. However, in the case of salvinorin A, no nBNI evaluations were reported. These findings are remarkable not only in the behavioral sciences but in the United States efforts to mitigate the current opioid crisis around the country, where the death rates by prescription-opioids have risen since 2000.⁹⁵

A difference between salvinorin A and classic KOR agonists is the induced-effect in general responses of laboratory animals.⁹⁶ For example, the decrease in cocaine self-administration due to coadministration of U69,593 in rhesus monkeys also displayed a reduction in food intake.⁹⁷ Another study shows that salvinorin A (0.3 mg/kg) does not reduce the response to natural reward (10% sucrose solution) in rats, suggesting an exclusive effect on the rewarding effects of cocaine, rather than a prodepressive effect.

In the context of biphasic pro- and antidepressive salvinorin A effects, different authors follow the idea of inconclusive categorization,^{98,99} attributed to the contrasting data reported in the literature. It is well-accepted that KOR activation led to several undesired effects like stress, aversion, depressive behavior, and sedation,¹⁰⁰ while selective antagonists like nBNI serve as antidepressant agents when administered alone or concurrently with KOR agonists.^{100–102} However, an individual case report in Australia of a 26-year-old woman with drug-resistant chronic depression presented total remission of depressive symptoms, according to the Hamilton Depression Scale, after 6 months of self-administered low doses (0.5–0.75 g) of *Salvia divinorum* leaves and occasional intoxication (2–4g), where the leaves were chewed and held in the mouth for 15–30 min.¹⁰³ Moreover, low doses of salvinorin A in zebrafish (0.1 and 0.2 $\mu\text{g}/\text{kg}$) showed antidepressant-like effects by accelerating swimming behavior and an increase in time spent at the CPP test.⁶² In addition, relatively low salvinorin A doses (0.001 and 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$, in rat and mice, respectively) reduced immobility and increased

swimming times in the forced swim test (FST). Administration of salvinorin A at these doses enhanced swimming behavior, compared to the reference antidepressant drug, imipramine.¹⁰⁴ Anhedonia (a symptom of depression in humans) due to chronic mild stress was also reversed in a 3 week treatment with salvinorin A, 1 mg/kg in male and female rats, evidenced by the preference of sucrose solution over plain water,¹⁰⁵ suggesting salvinorin A as an effective antidepressant agent. In contrast, Carlezon et al.⁷⁸ used the FST and intracranial self-administration (ICSS) to exhibit the prodepressive effects of salvinorin A on rats, finding increased immobility behavior and elevated ICSS thresholds at larger doses (0.25–2 mg/kg) than Braida in 2009. Furthermore, a single salvinorin A injection (0.3 mg/kg, i.p.) produced consistent results of prodepressive behavior in the FST,¹⁰⁶ attributing the differences with the antidepressive like results obtained by Braida in 2006 to the route of administration (i.p. vs s.c.) and the pretreatment duration (5 min vs 20 min).

CONCLUDING REMARKS

The use of natural drugs for either spiritual ceremonies or healing purposes is part of human history. Natural products are a major source of biologically active compounds and also serve as a starting point for the development of new drugs. This is the case of salvinorin A and its intriguing pharmacological properties. Natural products are not exempted from undesirable side effects. In salvinorin A, some disadvantages include short half-life, low solubility, hallucinatory properties, and possible abuse potential. The scientific community has advanced in the synthesis and semisynthesis of different salvinorin A analogues. A remarkable example is herkinorin, which is the first known MOR biased ligand, and it has a better pharmacological profile than those of common opioid painkillers. Yet, the need for deeper studies exploring the full therapeutic potential applications of salvinorin A is evidenced, especially in neurological disorders. Therefore, a better understanding of the mechanism at the atomic level between salvinorin A and the KOR/dynorphin system will contribute to the development of safer drugs which mediate different illnesses through KOR modulation such as pain, mood disorders, and addiction. In turn, shamans and psychonautic communities are still trying to find out the possible benefits behind the Shepherdess's Herb, known from several hundred years before.

ASSOCIATED CONTENT

Supporting Information

The Supporting Information is available free of charge at <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acscchemneuro.0c00608>.

List of references concerning the legal status of *Salvia divinorum* and salvinorin A in different countries (PDF)

AUTHOR INFORMATION

Corresponding Author

Karina Martinez-Mayorga – Universidad Nacional Autónoma de México, Instituto de Química, Ciudad Universitaria, Ciudad de México 04510, México; orcid.org/0000-0002-6974-7941; Email: kmtzm@unam.mx

Authors

R. Bruno Hernández-Alvarado – Universidad Nacional Autónoma de México, Instituto de Química, Ciudad Universitaria, Ciudad de México 04510, México

Abraham Madariaga-Mazón – Universidad Nacional Autónoma de México, Instituto de Química, Ciudad Universitaria, Ciudad de México 04510, México;
orcid.org/0000-0002-8938-1318

Alfredo Ortega – Universidad Nacional Autónoma de México, Instituto de Química, Ciudad Universitaria, Ciudad de México 04510, México

Complete contact information is available at:

<https://pubs.acs.org/10.1021/acschemneuro.0c00608>

Author Contributions

R.B.H.-A., A.M.-M., and K.M.-M. collected information and prepared figures, and A.O. provided information. All the authors contributed to the writing of the manuscript.

Notes

The authors declare no competing financial interest.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank the Institute of Chemistry, UNAM for funding.

REFERENCES

- (1) Meyer, E. G., and Writer, B. W. (2012) Salvia Divinorum. *Psychosomatics* 53, 277–279.
- (2) Johnson, J. B. (1939) The Elements of Mazatec Witchcraft. *Etnologiska Studier* 9, I28–I50.
- (3) Weitlaner, R. J. (1952) Curaciones Mazatecas. *An. Mu. Nacl. Mex.*, 279–285.
- (4) Wasson, R. G. (1962) A New Mexican Psychotropic Drug from the Mint Family. *Bot. Mus. Leaflet, Harv. Univ.* 20, 77–84.
- (5) Epling, C., and Játiva, M. C. D. (1962) A New Species of Salvia from Mexico. *Bot. Mus. Leaflet Harv. Univ.* 20, 75–76.
- (6) Reisfield, A. S. (1993) The Botany of Salvia Divinorum (Labiatae). *SIDA Contrib. Bot.* 15, 349–366.
- (7) Ott, J. (1995) Ethnopharmacognosy and Human Pharmacology of Salvia Divinorum and Salvinorin A. *Curare* 18, 103–129.
- (8) Ortega, A., Blount, J. F., and Manchand, P. (1982) Salvinorin, a New Trans-Neoclerodane Diterpene from Sa/via Divinorum (Labiatae). *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* 1, 2505–2508.
- (9) Valdes, L. J., Butler, W. M., Hatfield, G. M., Paul, A. G., and Koreeda, M. (1984) Divinorin A, a Psychotropic Terpenoid, and Divinorin B from the Hallucinogenic Mexican Mint, Salvia Divinorum. *J. Org. Chem.* 49, 4716–4720.
- (10) Roth, B. L., Baner, K., Westkaemper, R., Siebert, D., Rice, K. C., Steinberg, S., Ernsberger, P., and Rothman, R. B. (2002) Salvinorin A: A Potent Naturally Occurring Nonnitrogenous Opioid Selective Agonist. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99, 11934–11939.
- (11) Bruchas, M. R., and Chavkin, C. (2010) Kinase Cascades and Ligand-Directed Signaling at the Kappa Opioid Receptor. *Psychopharmacology (Berl.)* 210, 137–147.
- (12) Office of the Commissioner. *FDA Approves New Opioid for Intravenous Use in Hospitals, Other Controlled Clinical Settings*, U.S. Food and Drug Administration. <https://www.fda.gov/news-events/press-announcements/fda-approves-new-opioid-intravenous-use-hospitals-other-controlled-clinical-settings> (accessed 2020-09-16).
- (13) Harding, W. W., Tidgewell, K., Byrd, N., Cobb, H., Dersch, C. M., Butelman, E. R., Rothman, R. B., and Prisinzano, T. E. (2005) Neoclerodane Diterpenes as a Novel Scaffold for μ Opioid Receptor Ligands. *J. Med. Chem.* 48, 4765–4771.
- (14) Labate, B. C., Caiuby, B., and Cavnar, C., Eds. (2018) *Plant Medicines, Healing and Psychedelic Science: Cultural Perspectives*, Springer International Publishing, Cham.
- (15) Díaz, J.-L. (2013) Salvia Divinorum: A Psychopharmacological Riddle and a Mind-Body Prospect. *Curr. Drug Abuse Rev.* 6, 43–53.
- (16) Valdés, L., Díaz, J. L., and Paul, A. G. (1983) Ethnopharmacology of Ska Maria Pastora (Salvia Divinorum Epling and Jativa-M.). *J. Ethnopharmacol.* 7, 287–312.
- (17) Hanna, J. (1999) Growing Salvia Divinorum from Seed. *Entheogen Rev.* 7, 110–116.
- (18) Hernández-Bello, R., García-Rodríguez, R. V., García-Sosa, K., Peña-Rodríguez, L. M., Vázquez-Hernández, M., Ramos-Morales, F. R., Corcoran, O., and Sánchez-Medina, A. (2015) Salvinorin A Content in Legal High Products of Salvia Divinorum Sold in Mexico. *Forensic Sci. Int.* 249, 197–201.
- (19) González, D., Riba, J., Bouso, J. C., Gómez-Jarabo, G., and Barbanoj, M. J. (2006) Pattern of Use and Subjective Effects of Salvia Divinorum among Recreational Users. *Drug Alcohol Depend.* 85, 157–162.
- (20) Addy, P. H., Garcia-Romeu, A., Metzger, M., and Wade, J. (2015) The Subjective Experience of Acute, Experimentally-Induced Salvia Divinorum Intoxication. *J. Psychopharmacol. (London, U. K.)* 29, 426–435.
- (21) Sumnall, H., Measham, F., Brandt, S., and Cole, J. (2011) Salvia Divinorum Use and Phenomenology: Results from an Online Survey. *J. Psychopharmacol. (London, U. K.)* 25, 1496–1507.
- (22) Strassman, R., Qualls, C., and Uhlenhuth, E. (1994) Dose-Response Study of N,N-Dimethyltryptamine in Humans: II. Subjective Effects and Preliminary Results of a New Rating Scale. *Arch. Gen. Psychiatry* 51, 98–108.
- (23) Hood, R. W., Jr., Ghorbani, N., Watson, P. J., Ghramaleki, A. F., Bing, M. N., Davison, H. K., Morris, R. J., and Williamson, W. P. (2001) Dimensions of the Mysticism Scale: Confirming the Three-Factor Structure in the United States and Iran. *J. Sci. Study Relig.* 40, 691–705.
- (24) Johnson, M. W., MacLean, K. A., Reissig, C. J., Prisinzano, T. E., and Griffiths, R. R. (2011) Human Psychopharmacology and Dose-Effects of Salvinorin A, a Kappa Opioid Agonist Hallucinogen Present in the Plant Salvia Divinorum. *Drug Alcohol Depend.* 115, 150–155.
- (25) Currie, C. L. (2013) Epidemiology of Adolescent Salvia Divinorum Use in Canada. *Drug Alcohol Depend.* 128, 166–170.
- (26) Ford, J. A., Watkins, W. C., and Blumenstein, L. (2011) Correlates of Salvia Divinorum Use in a National Sample: Findings from the 2009 National Survey on Drug Use and Health. *Addict. Behav.* 36, 1032–1037.
- (27) Casselman, I., and Heinrich, M. (2011) Novel Use Patterns of Salvia Divinorum: Unobtrusive Observation Using YouTube™. *J. Ethnopharmacol.* 138, 662–667.
- (28) Kelly, B. C. (2011) Legally Tripping: A Qualitative Profile of Salvia Divinorum Use Among Young Adults. *J. Psychoact. Drugs* 43, 46–54.
- (29) Khey, D. N., Miller, B. L., and Griffin, O. H. (2008) Salvia Divinorum Use among a College Student Sample. *J. Drug Educ.* 38, 297–306.
- (30) Grundmann, O., Phipps, S. M., Zadezensky, I., and Butterweck, V. (2007) Salvia Divinorum and Salvinorin A: An Update on Pharmacology and Analytical Methodology. *Planta Med.* 73, 1039–1046.
- (31) United Nations Office on Drugs and Crime. (2016) *Terminology and Information on Drugs*, United Nations. https://www.unodc.org/unodc/en/scientists/terminology-and-information-on-drugs_new.html (accessed 2020-10-14).
- (32) Roach, J. J., and Shenvi, R. A. (2018) A Review of Salvinorin Analogs and Their Kappa-Opioid Receptor Activity. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 28, 1436–1445.
- (33) Scheerer, J. R., Lawrence, J. F., Wang, G. C., and Evans, D. A. (2007) Asymmetric Synthesis of Salvinorin A, A Potent κ Opioid Receptor Agonist. *J. Am. Chem. Soc.* 129, 8968–8969.
- (34) (a) Hagiwara, H., Suka, Y., Nojima, T., Hoshi, T., and Suzuki, T. (2009) Second-Generation Synthesis of Salvinorin A. *Tetrahedron* 65, 4820–4825. (b) Nozawa, M., Suka, Y., Hoshi, T., Suzuki, T., and

- Hagiwara, H. (2008) Total Synthesis of the Hallucinogenic Neoclerodane Diterpenoid Salvinorin A. *Org. Lett.* 10 (7), 1365–1368.
- (35) Burns, A. C., and Forsyth, C. J. (2008) Intramolecular Diels–Alder/Tsuji Allylation Assembly of the Functionalized Trans-Decalin of Salvinorin A. *Org. Lett.* 10, 97–100.
- (36) Line, N. J., Burns, A. C., Butler, S. C., Casbohm, J., and Forsyth, C. J. (2016) Total Synthesis of (–)-Salvinorin A. *Chem. - Eur. J.* 22, 17983–17986.
- (37) Wang, Y., and Metz, P. (2018) Total Synthesis of the Neoclerodane Diterpene Salvinorin A via an Intramolecular Diels–Alder Strategy. *Org. Lett.* 20, 3418–3421.
- (38) Roach, J. J., Sasano, Y., Schmid, C. L., Zaidi, S., Katritch, V., Stevens, R. C., Bohn, L. M., and Shenvi, R. A. (2017) Dynamic Strategic Bond Analysis Yields a Ten-Step Synthesis of 20-nor-Salvinorin A, a Potent κ -OR Agonist. *ACS Cent. Sci.* 3, 1329–1336.
- (39) Sherwood, A. M., Williamson, S. E., Crowley, R. S., Abbott, L. M., Day, V. W., and Prisinzano, T. E. (2017) Modular Approach to Pseudo-Neoclerodanes as Designer κ -Opioid Ligands. *Org. Lett.* 19, 5414–5417.
- (40) Chen, X., Berim, A., Dayan, F. E., and Gang, D. R. (2017) A (–)-Kolavenyl Diphosphate Synthase Catalyzes the First Step of Salvinorin A Biosynthesis in *Salvia Divinorum*. *J. Exp. Bot.* 68, 1109–1122.
- (41) Pelot, K. A., Mitchell, R., Kwon, M., Hagelthorn, L. M., Wardman, J. F., Chiang, A., Bohlmann, J., Ro, D., and Zerbe, P. (2017) Biosynthesis of the Psychotropic Plant Diterpene Salvinorin A: Discovery and Characterization of the *Salvia Divinorum* Clerodienyl Diphosphate Synthase. *Plant J.* 89, 885–897.
- (42) Munro, T. A., and Rizzacasa, M. A. (2003) Salvinorins D-F, New Neoclerodane Diterpenoids from *Salvia divinorum* and an Improved Method for the Isolation of Salvinorin A. *J. Nat. Prod.* 66, 703–705.
- (43) Kutrzeba, L. M., Li, X.-C., Ding, Y., Ferreira, D., and Zjawiony, J. K. (2010) Intramolecular Transacetylation in Salvinorins D and E. *J. Nat. Prod.* 73, 707–708.
- (44) Kutrzeba, L. M., Ferreira, D., and Zjawiony, J. K. (2009) Salvinorins J from *Salvia Divinorum*: Mutarotation in the Neoclerodane System. *J. Nat. Prod.* 72, 1361–1363.
- (45) Tidgewell, K., Harding, W. W., Schmidt, M., Holden, K. G., Murry, D. J., and E. Prisinzano, T. (2004) A Facile Method for the Preparation of Deuterium Labeled Salvinorin A: Synthesis of [2,2,2-²H₃]-Salvinorin A. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 14, 5099–5102.
- (46) Medana, C., Massolino, C., Pazzi, M., and Baiocchi, C. (2006) Determination of Salvinorins and Divinorins In *Salvia Divinorum* Leaves by Liquid Chromatography/Multistage Mass Spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 20, 131–136.
- (47) Schmidt, M. S., Prisinzano, T. E., Tidgewell, K., Harding, W., Butelman, E., Kreek, M. J., and Murry, D. J. (2005) Determination of Salvinorin A in Body Fluids by High Performance Liquid Chromatography–Atmospheric Pressure Chemical Ionization. *J. Chromatogr. B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 818, 221–225.
- (48) Caspers, M. J., Williams, T. D., Lovell, K. M., Lozama, A., Butelman, E. R., Kreek, M. J., Johnson, M., Griffiths, R., MacLean, K., and Prisinzano, T. E. (2013) LC-MS/MS Quantification of Salvinorin A from Biological Fluids. *Anal. Methods* 5, 7042.
- (49) Margalho, C., Gallardo, E., Castanheira, A., Vieira, D. N., López-Rivadulla, M., and Real, F. C. (2013) A Validated Procedure for Detection and Quantitation of Salvinorin a in Pericardial Fluid, Vitreous Humor, Whole Blood and Plasma Using Solid Phase Extraction and Gas Chromatography–Mass Spectrometry. *J. Chromatogr. A* 1304, 203–210.
- (50) Paudel, M. K., Shirota, O., Sasaki-Tabata, K., Tanaka, H., Sekita, S., and Morimoto, S. (2013) Development of an Enzyme Immunoassay Using a Monoclonal Antibody against the Psychoactive Diterpenoid Salvinorin A. *J. Nat. Prod.* 76, 1654–1660.
- (51) Teksin, Z. S., Lee, I. J., Nemieboka, N. N., Othman, A. A., Upreti, V. V., Hassan, H. E., Syed, S. S., Prisinzano, T. E., and Eddington, N. D. (2009) Evaluation of the Transport, in Vitro Metabolism and Pharmacokinetics of Salvinorin A, a Potent Hallucinogen. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 72, 471–477.
- (52) Schmidt, M. D., Schmidt, M. S., Butelman, E. R., Harding, W. W., Tidgewell, K., Murry, D. J., Kreek, M. J., and Prisinzano, T. E. (2005) Pharmacokinetics of the Plant-Derived κ -Opioid Hallucinogen Salvinorin A in Nonhuman Primates. *Synapse* 58, 208–210.
- (53) Hooker, J. M., Xu, Y., Schiffer, W., Shea, C., Carter, P., and Fowler, J. S. (2008) Pharmacokinetics of the Potent Hallucinogen, Salvinorin A in Primates Parallels the Rapid Onset and Short Duration of Effects in Humans. *NeuroImage* 41, 1044–1050.
- (54) Hooker, J. M., Munro, T. A., Béguin, C., Alexoff, D., Shea, C., Xu, Y., and Cohen, B. M. (2009) Salvinorin A and Derivatives: Protection from Metabolism Does Not Prolong Short-Term, Whole-Brain Residence. *Neuropharmacology* 57, 386–391.
- (55) Tsujikawa, K., Kuwayama, K., Miyaguchi, H., Kanamori, T., Iwata, Y. T., and Inoue, H. (2009) In Vitro Stability and Metabolism of Salvinorin A in Rat Plasma. *Xenobiotica* 39, 391–398.
- (56) Mowry, M., Mosher, M., and Briner, W. (2003) Acute Physiologic and Chronic Histologic Changes in Rats and Mice Exposed to the Unique Hallucinogen Salvinorin A. *J. Psychoact. Drugs* 35, 379–382.
- (57) Shigeev, S. (2007) Severity of Opiate Intoxication to Gender and Age. *Soud. Lek.* 52, 21–24.
- (58) Ranganathan, M., Schnakenberg, A., Skosnik, P. D., Cohen, B. M., Pittman, B., Sewell, R. A., and D'Souza, D. C. (2012) Dose-Related Behavioral, Subjective, Endocrine, and Psychophysiological Effects of the κ Opioid Agonist Salvinorin A in Humans. *Biol. Psychiatry* 72, 871–879.
- (59) Chavkin, C. (2013) Dynorphin—Still an Extraordinarily Potent Opioid Peptide. *Mol. Pharmacol.* 83, 729–736.
- (60) Rothman, R. B., Murphy, D. L., Xu, H., Godin, J. A., Dersch, C. M., Partilla, J. S., Tidgewell, K., Schmidt, M., and Prisinzano, T. E. (2007) Salvinorin A: Allosteric Interactions at the μ -Opioid Receptor. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 320, 801–810.
- (61) Corchero, J., Manzanares, J., and Fuentes, J. A. (2004) Cannabinoid/Opioid Crosstalk in the Central Nervous System. *Crit. Rev. Neurobiol.* 16, 159–172.
- (62) Braidà, D., Limonta, V., Pegorini, S., Zani, A., Guerini-Rocco, C., Gori, E., and Sala, M. (2007) Hallucinatory and Rewarding Effect of Salvinorin A in Zebrafish: κ -Opioid and CB1-Cannabinoid Receptor Involvement. *Psychopharmacology (Berl.)* 190, 441–448.
- (63) Braidà, D., Limonta, V., Capurro, V., Fadda, P., Rubino, T., Mascia, P., Zani, A., Gori, E., Fratta, W., Parolaro, D., and Sala, M. (2008) Involvement of κ -Opioid and Endocannabinoid System on Salvinorin A-Induced Reward. *Biol. Psychiatry* 63, 286–292.
- (64) Coffeen, U., Canseco-Alba, A., Simón-Arceo, K., Almanza, A., Mercado, F., León-Olea, M., and Pellicer, F. (2018) Salvinorin A Reduces Neuropathic Nociception in the Insular Cortex of the Rat. *Eur. J. Pain* 22, 311–318.
- (65) Fichna, J., Dickey, M., Lewellyn, K., Janecka, A., Zjawiony, J. K., MacNaughton, W. K., and Storr, M. A. (2012) Salvinorin A Has Antiinflammatory and Antinociceptive Effects in Experimental Models of Colitis in Mice Mediated by KOR and CB1 Receptors. *Inflamm. Bowel Dis.* 18, 1137–1145.
- (66) Capasso, R., Borrelli, F., Cascio, M. G., Aviello, G., Huben, K., Zjawiony, J. K., Marini, P., Romano, B., Di Marzo, V., Capasso, F., and Izzo, A. A. (2008) Inhibitory Effect of Salvinorin A, from *Salvia Divinorum*, on Ileitis-Induced Hypermotility: Cross-Talk between κ -Opioid and Cannabinoid CB1 Receptors. *Br. J. Pharmacol.* 155, 681–689.
- (67) Aviello, G., Borrelli, F., Guida, F., Romano, B., Lewellyn, K., De Chiaro, M., Luongo, L., Zjawiony, J. K., Maione, S., Izzo, A. A., and Capasso, R. (2011) Ultrapotent Effects of Salvinorin A, a Hallucinogenic Compound from *Salvia Divinorum*, on LPS-Stimulated Murine Macrophages and Its Anti-Inflammatory Action in Vivo. *J. Mol. Med.* 89, 891–902.
- (68) Fichna, J., Schicho, R., Andrews, C. N., Bashashati, M., Klompus, M., McKay, D. M., Sharkey, K. A., Zjawiony, J. K., Janecka, A., and Storr, M. A. (2009) Salvinorin A Inhibits Colonic Transit and

- Neurogenic Ion Transport in Mice by Activating κ -Opioid and Cannabinoid Receptors. *Neurogastroenterol. Motil.* 21, 1326–1338.
- (69) Walentiny, D. M., Vann, R. E., Warner, J. A., King, L. S., Seltzman, H. H., Navarro, H. A., Twine, C. E., Thomas, B. F., Gilliam, A. F., Gilmour, B. P., Carroll, F. I., and Wiley, J. L. (2010) Kappa Opioid Mediation of Cannabinoid Effects of the Potent Hallucinogen, Salvinorin A, in Rodents. *Psychopharmacology (Berl.)* 210, 275–284.
- (70) Rios, C., Gomes, I., and Devi, L. A. (2006) μ Opioid and CB1 Cannabinoid Receptor Interactions: Reciprocal Inhibition of Receptor Signaling and Neuritogenesis. *Br. J. Pharmacol.* 148, 387–395.
- (71) Madariaga-Mazon, A., Marmolejo-Valencia, A. F., Li, Y., Toll, L., Houghten, R. A., and Martinez-Mayorga, K. (2017) Mu-Opioid Receptor Biased Ligands: A Safer and Painless Discovery of Analgesics? *Drug Discovery Today* 22, 1719–1729.
- (72) Wang, Y., Tang, K., Inan, S., Siebert, D., Holzgrabe, U., Lee, D. Y. W., Huang, P., Li, J.-G., Cowan, A., and Liu-Chen, L.-Y. (2005) Comparison of Pharmacological Activities of Three Distinct κ Ligands (Salvinorin A, TRK-820 and 3FLB) on κ Opioid Receptors in Vitro and Their Antipruritic and Antinociceptive Activities in Vivo. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 312, 220–230.
- (73) McCurdy, C. R., Sufka, K. J., Smith, G. H., Warnick, J. E., and Nieto, M. J. (2006) Antinociceptive Profile of Salvinorin A, a Structurally Unique Kappa Opioid Receptor Agonist. *Pharmacol., Biochem. Behav.* 83, 109–113.
- (74) John, T. F., French, L. G., and Erlichman, J. S. (2006) The Antinociceptive Effect of Salvinorin A in Mice. *Eur. J. Pharmacol.* 545, 129–133.
- (75) Guida, F., Luongo, L., Aviglio, G., Palazzo, E., De Chiaro, M., Gatta, L., Boccella, S., Marabese, I., Zjawiony, J. K., Capasso, R., Izzo, A. A., de Novellis, V., and Maione, S. (2012) Salvinorin A Reduces Mechanical Allodynia and Spinal Neuronal Hyperexcitability Induced by Peripheral Formalin Injection. *Mol. Pain* 8, 1744–1754.
- (76) Watkins, L. R., Hutchinson, M. R., Ledebor, A., Wieseler-Frank, J., Milligan, E. D., and Maier, S. F. (2007) Glia as the “Bad Guys”: Implications for Improving Clinical Pain Control and the Clinical Utility of Opioids. *Brain, Behav., Immun.* 21, 131–146.
- (77) Paton, K. F., Biggerstaff, A., Kaska, S., Crowley, R. S., La Flamme, A. C., Prisinzano, T. E., and Kivell, B. M. (2020) Evaluation of Biased and Balanced Salvinorin A Analogs in Preclinical Models of Pain. *Front. Neurosci.* 14, 765.
- (78) Carlezon, W. A., Béguin, C., DiNieri, J. A., Baumann, M. H., Richards, M. R., Todtenkopf, M. S., Rothman, R. B., Ma, Z., Lee, D. Y.-W., and Cohen, B. M. (2006) Depressive-Like Effects of the κ -Opioid Receptor Agonist Salvinorin A on Behavior and Neurochemistry in Rats. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 316, 440–447.
- (79) Gehrke, B. J., Chefer, V. I., and Shippenberg, T. S. (2008) Effects of Acute and Repeated Administration of Salvinorin A on Dopamine Function in the Rat Dorsal Striatum. *Psychopharmacology (Berl.)* 197, 509–517.
- (80) Baggott, M. J., Erowid, E., Erowid, F., Galloway, G. P., and Mendelson, J. (2010) Use Patterns and Self-Reported Effects of Salvia Divinorum: An Internet-Based Survey. *Drug Alcohol Depend.* 111, 250–256.
- (81) Capasso, R., Borrelli, F., Zjawiony, J., Kutrzeba, L., Aviglio, G., Sarnelli, G., Capasso, F., and Izzo, A. A. (2008) The Hallucinogenic Herb Salvia Divinorum and Its Active Ingredient Salvinorin A Reduce Inflammation-Induced Hypermotility in Mice. *Neurogastroenterol. Motil.* 20, 142–148.
- (82) Vasiljevik, T., Groer, C. E., Lehner, K., Navarro, H., and Prisinzano, T. E. (2014) Studies toward the Development of Antiproliferative Neoclerodanes from Salvinorin A. *J. Nat. Prod.* 77, 1817–1824.
- (83) Yan, F., Mosier, P. D., Westkaemper, R. B., Stewart, J., Zjawiony, J. K., Vortherms, T. A., Sheffler, D. J., and Roth, B. L. (2005) Identification of the Molecular Mechanisms by Which the Diterpenoid Salvinorin A Binds to Kappa-Opioid Receptors. *Biochemistry* 44, 8643–8651.
- (84) Singh, N., Chevé, G., Ferguson, D. M., and McCurdy, C. R. (2006) A Combined Ligand-Based and Target-Based Drug Design Approach for G-Protein Coupled Receptors: Application to Salvinorin A, a Selective Kappa Opioid Receptor Agonist. *J. Comput.-Aided Mol. Des.* 20, 471–493.
- (85) Vortherms, T. A., Mosier, P. D., Westkaemper, R. B., and Roth, B. L. (2007) Differential Helical Orientations among Related G Protein-Coupled Receptors Provide a Novel Mechanism for Selectivity: STUDIES WITH SALVINORIN A AND THE κ -OPIOID RECEPTOR. *J. Biol. Chem.* 282, 3146–3156.
- (86) Kane, B. E., McCurdy, C. R., and Ferguson, D. M. (2008) Toward a Structure-Based Model of Salvinorin A Recognition of the κ -Opioid Receptor. *J. Med. Chem.* 51, 1824–1830.
- (87) Graybiel, A. M., and Grafton, S. T. (2015) The Striatum: Where Skills and Habits Meet. *Cold Spring Harbor Perspect. Biol.* 7, a021691.
- (88) Ebner, S. R., Roitman, M. F., Potter, D. N., Rachlin, A. B., and Chartoff, E. H. (2010) Depressive-like Effects of the Kappa Opioid Receptor Agonist Salvinorin A Are Associated with Decreased Phasic Dopamine Release in the Nucleus Accumbens. *Psychopharmacology (Berl.)* 210, 241–252.
- (89) Kivell, B., Uzelac, Z., Sundaramurthy, S., Rajamanickam, J., Ewald, A., Chefer, V., Jaligam, V., Bolan, E., Simonson, B., Annamalai, B., Mannangatti, P., Prisinzano, T. E., Gomes, I., Devi, L. A., Jayanthi, L. D., Sitte, H. H., Ramamoorthy, S., and Shippenberg, T. S. (2014) Salvinorin A Regulates Dopamine Transporter Function via a Kappa Opioid Receptor and ERK1/2-Dependent Mechanism. *Neuropharmacology* 86, 228–240.
- (90) Zhang, Y., Butelman, E. R., Schlussman, S. D., Ho, A., and Kreek, M. J. (2005) Effects of the Plant-Derived Hallucinogen Salvinorin A on Basal Dopamine Levels in the Caudate Putamen and in a Conditioned Place Aversion Assay in Mice: Agonist Actions at Kappa Opioid Receptors. *Psychopharmacology (Berl.)* 179, 551–558.
- (91) Chefer, V. I., Bäckman, C. M., Gigante, E. D., and Shippenberg, T. S. (2013) Kappa Opioid Receptors on Dopaminergic Neurons Are Necessary for Kappa-Mediated Place Aversion. *Neuropsychopharmacology* 38, 2623–2631.
- (92) Collins, S. L., D’Addario, C., and Izenwasser, S. (2001) Effects of κ -Opioid Receptor Agonists on Long-Term Cocaine Use and Dopamine Neurotransmission. *Eur. J. Pharmacol.* 426, 25–34.
- (93) Freeman, K. B., Naylor, J. E., Prisinzano, T. E., and Woolverton, W. L. (2014) Assessment of the Kappa Opioid Agonist, Salvinorin A, as a Punisher of Drug Self-Administration in Monkeys. *Psychopharmacology (Berl.)* 231, 2751–2758.
- (94) Zamarripa, C. A., Naylor, J. E., Huskinson, S. L., Townsend, E. A., Prisinzano, T. E., and Freeman, K. B. (2020) Kappa Opioid Agonists Reduce Oxycodone Self-Administration in Male Rhesus Monkeys. *Psychopharmacology (Berl.)* 237, 1471–1480.
- (95) Chen, Q., Larochelle, M. R., Weaver, D. T., Lietz, A. P., Mueller, P. P., Mercaldo, S., Wakeman, S. E., Freedberg, K. A., Raphael, T. J., Knudsen, A. B., Pandharipande, P. V., and Chhatwal, J. (2019) Prevention of Prescription Opioid Misuse and Projected Overdose Deaths in the United States. *JAMA Netw. Open* 2, e187621.
- (96) Morani, A. S., Kivell, B., Prisinzano, T. E., and Schenk, S. (2009) Effect of Kappa-Opioid Receptor Agonists U69593, U50488H, Spiradoline and Salvinorin A on Cocaine-Induced Drug-Seeking in Rats. *Pharmacol., Biochem. Behav.* 94, 244–249.
- (97) Mello, N. K., and Negus, S. S. (1998) Effects of Kappa Opioid Agonists on Cocaine- and Food-Maintained Responding by Rhesus Monkeys. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 286, 812–824.
- (98) Kivell, B. M., Ewald, A. W. M., and Prisinzano, T. E. (2014) Salvinorin A Analogs and Other Kappa-Opioid Receptor Compounds as Treatments for Cocaine Abuse. In *Advances in Pharmacology (Dwoskin, L. P., Ed.), Emerging Targets & Therapeutics in the Treatment of Psychostimulant Abuse*, pp 481–511, Ch. 12, Vol. 69, Academic Press.
- (99) T. Taylor, G., and Manzella, F. (2016) Kappa Opioids, Salvinorin A and Major Depressive Disorder. *Curr. Neuropharmacol.* 14, 165–176.

(100) Van't Veer, A., and Carlezon, W. A. (2013) Role of Kappa-Opioid Receptors in Stress and Anxiety-Related Behavior. *Psychopharmacology (Berl.)* 229, 435–452.

(101) Knoll, A. T., and Carlezon, W. A. (2010) Dynorphin, Stress, and Depression. *Brain Res.* 1314, 56–73.

(102) Potter, D. N., Damez-Werno, D., Carlezon, W. A., Cohen, B. M., and Chartoff, E. H. (2011) Repeated Exposure to the κ -Opioid Receptor Agonist Salvinorin A Modulates Extracellular Signal-Regulated Kinase and Reward Sensitivity. *Biol. Psychiatry* 70, 744–753.

(103) Hanes, K. R. (2001) Antidepressant Effects of the Herb *Salvia Divinorum*: A Case Report. *J. Clin. Psychopharmacol.* 21, 634–635.

(104) Braidà, D., Capurro, V., Zani, A., Rubino, T., Viganò, D., Parolaro, D., and Sala, M. (2009) Potential Anxiolytic- and Antidepressant-like Effects of Salvinorin A, the Main Active Ingredient of *Salvia Divinorum*, in Rodents. *Br. J. Pharmacol.* 157, 844–853.

(105) Harden, M. T., Smith, S. E., Niehoff, J. A., McCurdy, C. R., and Taylor, G. T. (2012) Antidepressive Effects of the κ -Opioid Receptor Agonist Salvinorin A in a Rat Model of Anhedonia. *Behav. Pharmacol.* 23, 710–715.

(106) Morani, A. S., Schenk, S., Prisinzano, T. E., and Kivell, B. M. (2012) A Single Injection of a Novel Kappa Opioid Receptor Agonist Salvinorin A Attenuates the Expression of Cocaine-Induced Behavioral Sensitization in Rats. *Behav. Pharmacol.* 23, 162–170.

Ricardo Bruno Hernández-Alvarado¹ / Abraham Madariaga-Mazón¹ / Karina Martinez-Mayorga¹

Prediction of toxicity of secondary metabolites

¹ Instituto de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Avenida Universidad 3000, Mexico City, Mexico, E-mail: kmtzm@unam.mx

Abstract:

The prediction of toxicological endpoints has gained broad acceptance; it is widely applied in early stages of drug discovery as well as for impurities obtained in the production of generic or equivalent products. In this work, we describe methodologies for the prediction of toxicological endpoints compounds, with a particular focus on secondary metabolites. Case studies include toxicity prediction of natural compound databases with anti-diabetic, anti-malaria and anti-HIV properties.

Keywords: computational toxicology, secondary metabolites, drug discovery, pesticides, predictive models, QSAR

DOI: 10.1515/psr-2018-0107

1 Introduction

The prediction of toxicity endpoints relies heavily on QSAR models. The evolution of these models is described in the literature [1, 2]. Validated models are now accepted in several countries for the prediction of toxicity endpoints for regulatory purposes [3]. The OECD guidelines for the testing of chemicals are widely accepted for safety testing and assessment of pesticides, personal care products, industrial chemicals and even to aid in decision-making in emergency responses [4, 5]. In November 2004, the OECD member countries agreed on the “OECD Principles for the Validation, for Regulation Purposes, of (Quantitative) Structure-Activity Relationship Models” [6]. For a discussion on the comparison and complementarity of the steps of KDD and QSAR methodologies and how they fit in the OECD principles, the reader is referred to the literature [7]. On the preceding chapter (Toxicity of Secondary Metabolites), we present an overview of different sources of secondary metabolites and their toxicities. In addition, we elaborate on toxicity assessment in drug discovery and agro-chemistry. Here, we provide an overview of tools and methods for the development of predictive models with an emphasis in regulatory settings, and we finalize with selected examples, including the prediction of toxicity of secondary metabolites.

2 Predictive models of toxicological endpoint

Toxicity prediction tools are becoming more useful in many areas. Food-chemistry and pharmaceutical sciences are implementing innovative methods in order to reduce costs, time and pollution. In addition, scientists are also developing new algorithms, including machine learning and deep learning methods, to improve the accuracy of the predictions. For example, eToxPred allows the estimation of toxicity of drug candidates based on Restricted Boltzmann Machine (RBM), Deep Belief Network (DBN) and Extremely Randomized Trees, or Extra Trees (ET) algorithm [8]. ToxiPred predicts aqueous toxicity of small chemical molecules in *T. pyriformis* [9]. Protox, based on a total of 33 machine-learning models, allows for the prediction of various toxicity endpoints such as acute toxicity, hepatotoxicity, cytotoxicity, carcinogenicity, mutagenicity, immunotoxicity, adverse outcomes (Tox21) pathways and toxicity targets [10] among others.

Consequently, the number of publications regarding toxicology predictions is increasing every year, as shown in Figure 1.

Karina Martinez-Mayorga is the corresponding author.

© 2019 Walter de Gruyter GmbH, Berlin/Boston.

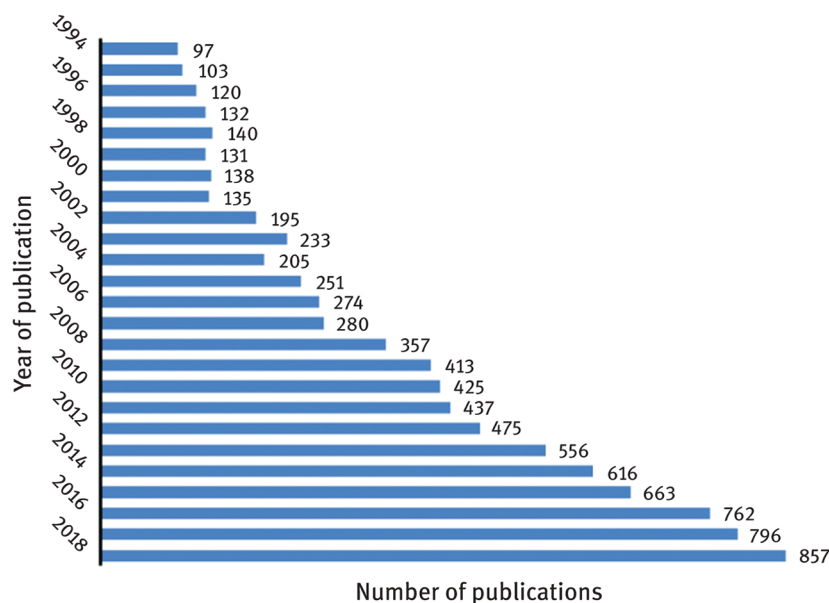


Figure 1: The number of publications on Web of Science, retrieved using the keyword “Toxicity Prediction”, throughout the years.

2.1 Toxicological endpoints commonly predicted

The biological, toxicological and physicochemical endpoints commonly predicted highly depend on the regulation of each country. We have recently collected a representative list of endpoints [7] used in different countries. The evaluations for the testing of acute effects of chemicals are commonly called “6-pack” and include acute inhalation, acute oral, medial lethal dose (LD₅₀), acute dermal, eye irritation, skin irritation, dermal sensitization. Until recently, these evaluations were all performed experimentally in animal models. However, the use of *in vitro* and *in silico* evaluations is now accepted for regulatory purposes. These alternatives are cheaper and faster than *in vivo* full animal experiments, allowing to significantly reduce the use of experimental animals, decrease costs and time.

2.2 Databases of toxic compounds

Databases with biological and chemical information are essential in drug discovery campaigns. These databases contain information from experimental data published in scientific papers or specialized literature and they may also contain computational analyses. Being toxicity a key aspect in drug discovery and environmental sciences, there have been efforts to collect toxicological information in databases. Table 1 summarizes databases and servers with toxicological relevance.

Table 1: Resources with annotated toxicological information.

Name (reference)	Description
Toxnet (https://toxnet.nlm.nih.gov/)	Group of databases covering chemicals and drugs, diseases and the environment, environmental health, occupational safety and health, poisoning, risk assessment and regulations, and toxicology. Maintained by the National Library of Medicine (NLM) [11].
DSSTox (https://www.epa.gov/chemical-research/distributed-structure-searchable-toxicity-dsstox-database)	Distributed Structure-Searchable Toxicity (DSSTox) Database provides chemical information and annotations associated with toxicity data, to address mainly the needs for building quality models in predictive toxicology. Provides a structure browser [12].
Leadscope Toxicity Database (http://www.leadscope.com/toxicity_database/)	A database containing over 180,000 chemical structures with over 400,000 toxicity study results.

<p>Akos (commercial) (http://www.akosgmbh.de/accelrys/databases/toxicity.htm)</p>	<p>Database with over 170,000 chemical substances and comprehensive coverage of reported toxic properties.</p>
<p>ToxCast Dashboard (https://www.epa.gov/chemical-research/toxcast-dashboard)</p>	<p>An online platform with data on over 9,000 chemicals and more than 1,000 high-throughput assay endpoint components [13].</p>
<p>AcTOR (http://actor.epa.gov/actor)</p>	<p>Aggregated Computational Toxicology Online Resource (AcTOR) from the Environmental Protection Agency (EPA) aggregates public sources of chemical toxicity from over 1,000 public sources on over 500,000 chemicals. Searchable by chemical name or structure [14].</p>
<p>CompTox (https://comptox.epa.gov/dashboard)</p>	<p>Computational Toxicology (CompTox) Chemicals Dashboard is an online tool that integrates chemical, toxicity and exposure information for over 760,000 chemicals [15].</p>
<p>ATSDR (https://www.atsdr.cdc.gov/substances/index.asp)</p>	<p>Agency for toxic substances & Disease Registry (ATSDR) is a web portal with information about toxic substances, toxicological information by health effects or chemical class and toxicological information by the audience (toxicologists, health care experts, etc.) [16].</p>
<p>ECOTOX (http://www.epa.gov/ecotox/)</p>	<p>The Eco-Toxicology knowledgebase is a comprehensive, publicly available database providing single chemical environmental toxicity data on aquatic life, terrestrial plants and wildlife. It integrates three existing USEPA datafiles, AQUIRE (aquatic organisms), Phytotox (terrestrial plants) and Terretox (wildlife species). Each record contains information about the chemical, organism, exposure condition and observed effect under which the toxicity test was conducted. The toxicological databases are accessible online.</p>
<p>IRIS (http://www.epa.gov/iris/index.htm)</p>	<p>The Integrated Risk Information System is an online database of toxicity information, providing quantitative human health carcinogenic/hazard data, ambient water quality criteria and maximum contaminant levels. The database is regularly updated and reviewed [17].</p>
<p>SuperToxic (http://bioinformatics.charite.de/supertoxic/)</p>	<p>Compiles about 60,000 compounds and their structures, classified according to their toxicity, based on more than 2 million measurements. This information can be used to aid in the evaluation of the risks of newly designed compounds and an indication of biological interactions with the aid of similarity searches [18].</p>
<p>ArachnoServer (http://www.arachnoserver.org/)</p>	<p>Is a manually curated database containing information on the sequence, three-dimensional structure and biological activity of protein toxins derived from spider venom [19].</p>

2.3 Methods and software to predict toxicity

In general, *in silico* prediction of toxicology follows an algorithm that consists in four main steps: (a) data collection and cleaning, (b) calculation and selection of molecular descriptors, (c) model generation, and (d) model evaluation. A variety of independent tools are able to accomplish each of these steps and can be executed through different software; a list of frequently used software is provided in Table 2. Some of these programs

are commercially available and others open code. The differences in databases and algorithms used on each software frame their use and scope.

Table 2: Common software used in the development of models to predict toxicity.

Software		Brief description
Structural alerts		
Derek Nexus	https://www.lhasalimited.org/products/derek-nexus.htm	This software is a commercial offering from Lhasa Limited. Derek Nexus is an expert knowledge-based software which uses structure-activity relationships to predict the toxicity of novel compounds. It can assess toxicity for mammals and bacterium across 74 different endpoints including Mutagenicity, Skin Sensitisation, and Chromosome Damage.
Toxtree	http://toxtree.sourceforge.net	Open-source application based on tree decision toward estimation of toxic hazard. Toxtree was developed by the European Commission Joint Research Centre's European Chemicals Bureau. It was firstly designed for Cramer Classification, but the last versions include skin irritation and corrosion assessment [20].
ToxAlerts	http://ochem.eu/alerts	Open web-based platform, where users can upload new toxicophores and SAs. This web application is capable of virtually screen databases or compound libraries to identify certain alerts on chemicals [21].
Sahara Nexus	https://www.lhasalimited.org/products/sarah-nexus.htm	This is commercial software available from Lhasa Limited. Sarah Nexus is a statistical tool for predicting the mutagenic potential of compounds. It is commonly used alongside Derek Nexus to provide a prediction which can be used to meet the ICH M7 regulatory requirements.
Physiologically based Toxicokinetic and Toxicodynamic models		
MeGen	https://megen.useconnect.co.uk	Web application, able to generate custom exportable codes to use in commercial software. It includes a physiologically based pharmacokinetics database [22].
WinNonLin	https://www.certara.com	Specialized in the non-compartmental analysis regarding PBTK models. It has the capacity to integrate built models and is compatible with statistical software [23].
Read-across		
OECD QSAR Toolbox	https://www.qsartoolbox.org/	Free downloadable software developed by OECD and released in 2008. It provides the ability to categorize chemicals by the mechanism of action. It is also possible to elucidate metabolic profiles. The toolbox is intended to be used in government affairs, so detailed reports could be generated by the software to support a certain prediction.

ToxRead	http://www.toxread.eu/	User-friendly tool programmed in Java (able to run on different operating systems). It provides a chemoinformatics package with useful features as similarity calculation, molecular depiction, among others [24].
QSAR		
T.E.S.T.	https://www.epa.gov	Free EPA software with precomputed models. It estimates different endpoints such as LD ₅₀ (quantitative) and Ames mutagenicity (qualitative), through different methods such as K-Nearest Neighbors and Hierarchical clustering. This software enables batch predictions and shows the final calculated model.
VEGA	http://www.caesar-project.eu/	VEGA provides access to different QSAR programs and models. The result can be outputted as an Excel file. Additionally, CAESAR software is compatible with VEGA as a module for diverse endpoints such as skin sensitization. CAESAR was firstly developed to produce QSAR models adapted to REACH legislation [25].
QSARINS	http://www.qsar.it/	User-friendly platform intended to develop a build from scratch QSAR models. The license could be obtained by request. It is focused on external validation of QSAR models and implements a genetic algorithm to the selection of variables [26].
Online platforms		
Chembench	https://chembench.mml.unc.edu/	Public web portal for the development and distribution of QSAR models, as well as teaching [27].
QSARDB	https://qsar.db.org/	A repository for (Q)SAR/QSPR models and datasets for the discovery, exploration, citing and predicting of models [28].

Additionally, statistical packages and data mining programs allow the construction of predictive models from scratch. Nevertheless, the best insight to choose relies on the characteristics of the problem at hand.

Methodologies commonly used for toxicity prediction are:

Structural Alerts (SAs). SAs relate the information on the potential toxicity of molecular fragments associated with high chemical reactivity, as shown in Figure 2. Additional examples are shown in Table 3. These alerts are based on information reported in the literature and the opinion of human experts plays a key role. The interest in SAs increased since the European Registration, Evaluation, Authorisation, and Restriction of Chemicals (REACH) regulation accepted the methodology in 2006. SAs became an important chemical safety assessment due to several factors such as simplicity, easy interpretation, short time consuming, among others. These studies provide information to predict toxicants. However, it does not include unknown toxicophores and could not make a broader prediction on less-studied cases.

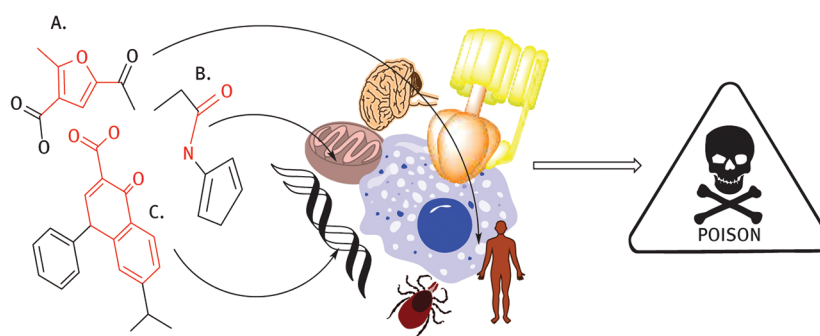


Figure 2: Mutagenic structural alerts (marked in red) of different molecular fragments such as furan (A), aromatic amides (B) and quinolones (C).

Table 3: Examples of known structural alerts. The different groups are characterized by their high reactivity.

Group	Fragment	Structure	Observations
Alkyl Groups	Aldehydes	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{R}-\text{C}-\text{H} \end{array}$	Covalent bond formation with nucleophilic sites on DNA and enzymes [29].
	<i>N</i> -nitrosamines	$\begin{array}{c} \text{R}' \\ \\ \text{R}-\text{N}-\text{NO} \end{array}$	Able to cause point mutations, <i>a priori</i> metabolic activation, leading to oncogene activation [30].
	Hydrazines	$\begin{array}{c} \text{R} \quad \quad \text{R} \\ \quad \quad \\ \text{R}-\text{N}-\text{N}-\text{R} \\ \quad \quad \\ \text{R} \quad \quad \text{R} \end{array}$	Classical model hepatotoxin, it has presented carcinogenicity and chronic toxicity in rats and mice, but molecular mechanisms remain elusive [31].
	Carbamates	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{O}-\text{C}-\text{NH}_2 \\ \\ \text{R} \end{array}$	Inhibition of Acetylcholinesterase, leading to encephalopathies, photophobia and irritability [32].
Alkyl halides	Alkyl halogen	$\begin{array}{c} \text{X} \\ \\ \text{R}-\text{C} \end{array}$	Functional moieties that have been related to DNA reactivity, i. e. mutagenic activity. These alerting structures are presented in common impurities in pharmaceutical products [33].
	Allylic halogen	$\begin{array}{c} \text{X} \\ \\ \text{C}=\text{C}-\text{C} \end{array}$	
	Heteroatomic halogen	$\begin{array}{c} \text{X} \\ \\ \text{S or N}-\text{C}-\text{C} \end{array}$	
Aromatic groups	Nitroaromatic	$\begin{array}{c} \text{NO}_2 \\ \\ \text{C}_6\text{H}_5 \end{array}$	Well-recognized moieties for mutagenicity. The molecular mechanism is believed as the formation of superoxide anion radicals [34].
	<i>N</i> -Acylated aminoaryls	$\begin{array}{c} \text{R} \\ \\ \text{C}_6\text{H}_5-\text{N}-\text{C}-\text{O} \\ \parallel \\ \text{O} \end{array}$	
	Aminoaryls	$\begin{array}{c} \text{R} \\ \\ \text{C}_6\text{H}_5-\text{N}-\text{R} \end{array}$	

Physiologically based Toxicokinetic and Toxicodynamic models (PBTK, PBTD). This recent approach involves anatomical and physiological descriptors that modify the Administration, Distribution, Metabolism, and Excretion

(ADME) process of toxicants. Then, the relationship among the descriptors is transformed into a mathematical equation, in order to predict the concentration of the molecule of interest at a given time, on the site of action or in a specific organ. Similar to SAs, the models are constructed with previous observations and information from the literature. An advantage of PBTK and PBTD is the possibility of species extrapolation because it uses independent organ descriptors [36]. Due to the complexity of these studies, only a few PBTK software packages are available [23].

Read-Across. Read-Across uses chemical analogs to predict the toxicity of an unknown molecule [7]. For example, a compound with unknown LD_{50} must have similar toxicokinetics to the molecules with known the LD_{50} , from which the LD_{50} will be estimated. Read-across may give a qualitative or quantitative result, depending on the information available. The qualitative read-across involves binary answers, e. g. mutagenic or not mutagenic. The transparency and easy-interpretation of read-across have produced a particular interest in regulation purposes. Nevertheless, it has also limitations such as the dependence of accuracy and strength of the prediction to the number of analogs on the group. If the number of analogs is insufficient or they have complex toxicity profiles, it is preferred to use QSAR or another similar approach [37].

Quantitative structure-activity relationship (QSAR). QSAR is one of the most used tools for elicit fast and reliable predictions, not only on toxicology disciplines but also in medicinal chemistry, biology and in many other fields [38, 39]. For example, the number of hits obtained on Web of Science using the keyword “Toxicity Prediction”, in combination with “QSAR”, is ten times more frequent than when using the keywords “Structural alerts” and “Read Across”. QSAR methodologies consist of the generation of mathematical models which are able to correlate physicochemical properties (represented by descriptors) or biological activities to chemical structures [40]. Since the origins of QSAR, back in 1962 [41], continuous efforts have been made to develop useful approaches based on the relationship between molecular structure and activity. Nowadays, it is possible to develop QSAR models to predict potential toxicological endpoints such as LD_{50} , developmental toxicity, etc. However, it should be noted that complex endpoints (such as *in vivo* toxicological ones) are more challenging than those based on *in vitro* assays or the prediction of physicochemical properties. The robustness of QSAR predictions in toxicity has led to its acceptance regulatory settings; this will be discussed in Section 5. Whenever possible, QSAR models should be interpretable to increase the clarity and transferability of the model.

3 Toxicity prediction in regulatory settings

The regulatory compliance of toxicity assessment is mostly handled by the OECD. A series of guides are available online and are continuously updated. The information provided also includes current and emerging challenges in public health. The OECD guidelines for the testing of chemicals is a collection of about 150 testing methods. The “Guidance Document on the Validation of (Quantitative) Structure-Activity Relationship [(Q)SAR] Models” [6], provides a detailed description of the use of QSAR models for the prediction of toxicity endpoints.

The prediction of toxicity for regulatory purposes does not apply to any and all toxicity endpoints. Moreover, each country or geographic region (i. e. the European Union) establishes its own requirements. In terms of methodological protocols to perform and report QSAR models, there is a consensus among several countries to follow OECD principles. A list of endpoints requested by some countries is reported by Gomez, et al. [7]. Needless to say, that even in the case that a given endpoint is eligible for prediction of toxicity, additional limitations apply. For example, the compounds evaluated must fall within the applicability domain, and defined criteria for the statistics of the models should be met. As mentioned above, the prediction of toxicity for regulatory purposes is only allowable for impurities in the industrial chemical procedures, not for the active ingredients, which in fact is in a much higher concentration with respect to the impurities. Last but not least, risk assessment is performed taking into account the relative toxicity of the impurity with respect to the active ingredient, and its concentration. For pesticides, the calculation of worst-case-possible contribution by an impurity to the toxic hazards of the active ingredient is described in the “Manual on the development and use of FAO and WHO specifications for pesticides”.

The amount, type and quality of the information available largely define the type of model to be developed, for a particular endpoint. While knowledge-based predictions can be used for small data sets, statistically-based predictions are more suited for large datasets. In general, it can fall into ligand-based or target-based models.

Ligand-based models are typically performed using SAR and/or QSAR methodologies. These models are based on the premise that similar compounds will behave similarly, in terms of biological and toxicological activities. However, it is also known that there are exceptions, called activity cliffs [42–44]. Ideally, after the identification and potential remission of activity cliffs, predictive tools would allow for the identification of potential hazards, such as physicochemical property or structural features that are associated with adverse

effects. Predictive models can be used on a wide range of endpoints, from enzymatic assays to animal models, including those focused on pharmacokinetics and pharmacodynamics profiles.

Target-based models are particularly valuable when there is not enough information for the development of SAR or QSAR models or when the binding recognition process is particularly relevant. Analysis of potential off-target effects may aid to prevent potential safety issues. This approach requires a detailed analysis of the interaction of the ligands with the biological target under study. For example, following this structure-based approach, Szczepek et al. improved the safety profile of a set of compounds by reducing off-target cleavage of zinc-finger nucleases, associated with cytotoxicity [45].

The more complex endpoint is the more challenging the prediction becomes. Complex endpoints are characterized by having multiple mechanisms involved, either by the interaction of one ligand with multiple targets, by the interaction of multiple ligands to the same target, or a combination of both, which is observed for instance in the recognition of odors and fragrances. Complexity might also arise from the interaction at different binding sites. In other words, for the development of predictive models (particularly linear-based regression models), the set of molecules under study should follow the same kinetic mechanism (agonism, antagonism, etc.). It could even be observed that the effect of a given molecule could be dose-dependent, being an agonist at certain concentrations and an antagonist at a different concentration. The reason for this apparent controversy lies in the binding sites occupied. In this case, the binding site where the agonistic effect takes place is saturated, and the compound can bind to an allosteric site with an antagonistic effect. Statistics-based models are particularly sensitive to this type of divergent information. In turn, knowledge-based models are often interpretable and could even inform of adverse outcome pathways AOP.

Recently, Allen et al. [46] show an improvement on predictive toxicity models by incorporating three types of descriptors: chemical descriptors, protein target descriptors from protein-ligand interactions and descriptors derived from *in vitro* cell cytotoxicity dose-response data. The addition of the two later descriptors sets enhanced classification rates as well as interpretability of the models.

For an overview of the relevance and challenges of toxicity predictions in the context of regulatory settings, the reader is referred to the review article by Gleeson et al. [47] and references cited therein. As pointed out by the authors, low concordance has been observed between the toxicity on animal models and humans [48] which could explain the appearance of previously undetected toxicity issues that lead to the withdraw of approved drugs [49]. Relations of toxicity values across different species have been attempted using different approaches; although rough estimates can be proposed, prediction of toxicity values across species is rarely met.

Last but not least, the use of deep learning has made its appearance for the prediction of toxicity endpoints. In 2016, Mayr et al. won the Tox21 Data Challenge using deep learning [50]. For this data, the authors found that deep learning excelled in toxicity prediction and outperformed many other computational approaches like naive Bayes, support vector machines and random forests. Deep learning holds good promises, particularly for multi-objective problems. Gathering of further examples will frame the applicability scope of this method and will help avoid building false expectations.

4 Case studies

4.1 Toxicity prediction using different software

Concerning toxicity prediction of secondary plant metabolites, Glück et al. performed the *in silico* prediction of genotoxicity of 609 food-relevant phytochemicals. The authors found that the sensitivity and specificity were improved by the combined use software, such as VEGA models SARpy, KNN, ISS, CAESAR and LAZAR. They found that (-)-asimilobine, aloin, annoretine, chrysothron, coptisine, elymoclavine and thalicminine are predicted to be genotoxic with high probability and that it is highly probable that pyrrolizidine alkaloids are carcinogenic [51].

Additional applications of toxicity prediction of secondary metabolites have focused on screening [52]; identification and elucidation of adverse outcome pathways [53]; or for the comparison with available experimental data [54].

The different software available can complement each other, for example, based on the chemical space coverage. However, if the compounds under study are within the applicability domain and the predictions have high confidence, the results obtained from different software coincide. Table 4 lists examples where T.E.S.T. and Derek correctly predict the mutagenicity of a series of secondary metabolites reported in the literature.

Table 4: Predicted and reported mutagenicity of selective secondary metabolites.

Source	Molecule	T.E.S.T.	Derek	Reported mutagenicity	Reference
<i>Cinnamomum Cinnamomum zeylanicum</i>	Cinnamaldehyde	Positive	Plausible	Positive	Reported in EPA-T.E.S.T. dataset
<i>Taxus Taxus brevifolia</i>	Paclitaxel	Negative	Inactive	Negative	Reported in EPA-T.E.S.T. dataset
<i>Cinchona</i> spp.	Quinine	Negative	Inactive	Negative	Munzer [55]
<i>Atropa Atropa belladonna</i>	Atropine	Negative	Inactive	Negative	Ramel [56]
<i>Colchicum autumnale</i> L.	Colchicine	Negative	Inactive	Negative	Reported in EPA-T.E.S.T. dataset
<i>Nicotiniana</i> spp.	Nicotine	Negative	Inactive	Negative	Reported in EPA-T.E.S.T. dataset
<i>Psilocybe</i> spp.	Psilocybins	Negative	Inactive	Negative	Van Went [57]
<i>Gyromitra esculenta</i>	Gyromitrin	Negative	Inactive	Negative	Reported in EPA-T.E.S.T. dataset

Interestingly, in these examples, only the cinnamaldehyde is reported as mutagenic and is predicted as such by both programs used, giving confidence of future compounds of the same type.

4.2 Toxicity prediction of an entire database of natural products with antidiabetic activity

In a recent study, we reported a database named DiaNat-DB [58] (available at <http://rdu.iquimica.unam.mx/handle/20.500.12214/1186>). This database contains 336 compounds (secondary metabolites) with antidiabetic activity from plants used in traditional medicine in different countries. An estimation of the mutagenicity *in vitro*, evaluated in Sarah Nexus is summarized in Table 5. From the 336 compounds contained in DiaNat-DB, only 19 were out of the domain, and 31 resulted in equivocal classification (there is information against and in favor of a certain prediction). This shows that the chemical space covered, and information contained in Sarah Nexus allowed the evaluation of the 85 % of the secondary metabolites contained in DiaNat-DB. Interestingly, 245 of those compounds are predicted negative for mutagenicity *in vitro*.

Table 5: Mutagenicity *in vitro* evaluated in Sarah Nexus.

Classification	Number of molecules
Equivocal	31
Negative	245
Out of domain	19
Positive	39
Total	334

Further analysis of this data will be performed to explore the structural details of secondary metabolites that are predicted mutagenic. This information will be informative to focus on those compounds and revise their use in folk medicine. If required, the experimental evaluation for mutagenicity will place a warning on its use.

It should be noted that there is a fundamental difference between profiling a database for further development and the use of predictive methods in substitution of experimental evaluation. While in the first case the risk of false positives derives in costs; the second case would place a potential hazard to humans or the environment. Therefore, in regulatory settings, the use of toxicity prediction values as substitution of experimental evaluation is admissible only for impurities derived of manufacturing processes, not for the main components (active ingredient).

4.3 Toxicity prediction of natural compounds from the African flora

Another *in silico* toxicity assessment regarding secondary metabolites was that carried out by Onguéné et al. [59] In that study, databases of natural products (total of 806 chemical entries) from African flora (p-ANAPL, Afro-MalariaDb, Afro-HIV) were compared for structural diversity using Principal Component Analysis and most

common substructure analyses. In addition, structural alert analyses were performed using Lhasa Ltd. Briefly, the results showed that only a small portion of the libraries were predicted beyond the toxicity thresholds. This finding encourages the possibility to further analyze this database for additional applications [59].

Comparisons and further analyses of large compound collections as the ones described here provide a useful means for the discovery of new applications and structurally novel active compounds.

5 Conclusions

The assessment of toxicity values is valuable for the development of drugs, agrochemicals, cosmetics, food additives, etc. Toxicity values predicted using computational models are now accepted in regulatory settings as an alternative to animal testing if particular requirements are met. The OECD guidance for the development, use, and reporting of QSAR models are followed around the world and adherence of other countries is expected. The continuous update of databases; the development and implementation of improved algorithms; and novel strategies of external validation will contribute to further develop predictive models of toxicity. Furthermore, a large compound collection of natural products from Africa is available [60]. This comprehensive database contains more than 4,500 natural products and includes the botanical classification.

Acknowledgements

This work was supported by Instituto de Química-UNAM, and DGAPA-UNAM (PAPIIT IN210518). The authors thank ChemAxon and Lhasa Limited, for kindly providing academic licenses of their software.

References

- [1] Tropsha A, Golbraikh A. Predictive QSAR modeling workflow, model applicability domains, and virtual screening. *Curr Pharm Des.* 2007;13:3494–504.
- [2] Tropsha A, Wang SX. QSAR modeling of GPCR ligands: methodologies and examples of applications. In: Bourne H, Horuk R, Kuhnke J, Michel H, editors. *GPCRs: from deorphanization to lead structure identification*. Berlin: Springer, 2007:49–74.
- [3] Veith GD. On the nature, evolution and future of quantitative structure-activity relationships (QSAR) in toxicology. *SAR QSAR Environ Res.* 2004;15:323–30.
- [4] Demchuk E, Ruiz P, Chou S, Fowler BA. [SAR/QSAR methods in public health practice](#). *Toxicol Appl Pharmacol.* 2011;254:192–7.
- [5] Ruiz P, Begluitti G, Tincher T, Wheeler J, Mumtaz M. [Prediction of acute mammalian toxicity using QSAR methods: a case study of sulfur mustard and its breakdown products](#). *Molecules.* 2012;17:8982–9001.
- [6] Guidance Document on the Validation of (Quantitative) Structure-Activity Relationship [(Q)SAR] Models. OECD. 2014. DOI: 10.1787/9789264085442-en.
- [7] Gómez-Jiménez G, Gonzalez-Ponce K, Castillo-Pazos DJ, Madariaga-Mazón A, Barroso-Flores J, Cortés-Guzman F, et al. The OECD principles for (Q)SAR models in the context of knowledge discovery in databases (KDD). In: Karabencheva-Christova T, Christov C, editor(s). *Advances in protein chemistry and structural biology* Vol. 113. Amsterdam: Elsevier, 2018:85–117.
- [8] Pu L, Naderi M, Liu T, Wu H, Mukhopadhyay S, Brylinski M. [eToxPred: a machine learning-based approach to estimate the toxicity of drug candidates](#). *BMC Pharmacol Toxicol.* 2019;20:2.
- [9] Mishra N, Singla D, Agarwal S, Consortium OSDD, Raghava GPS. ToxiPred: a server for prediction of aqueous toxicity of small chemical molecules in *T. Pyriformis*. *J Transl Toxicol.* 2014;1:21–7.
- [10] Drwal J, Banerjee P, Dunkel M, Wettig MR, Preissner R. ProTox: a web server for the in silico prediction of rodent oral toxicity. *Nucleic Acids Res.* 2014;42:53–8.
- [11] Wexler P. [TOXNET: an evolving web resource for toxicology and environmental health information](#). *Toxicol.* 2001;157:3–10.
- [12] Richard A, Williams C. DSSTox chemical-index files for exposure-related experiments in arrayexpress and gene expression omnibus: enabling toxico-chemogenomics data linkages. *Bioinformatics.* 2009;25:692–4.
- [13] Richard A, Judson RS, Houck KA, Grulke CM, Volarath P, Thillainadarajah I, et al. ToxCast chemical landscape: paving the road to twenty-first century toxicology. *Chem Res Toxicol.* 2016;26:1225–51.
- [14] Judson R, Richard A, Dix D, Houck K, Elloumi F, Martin M, et al. ACToR—aggregated computational toxicology resource. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2008;233:7–13.
- [15] Williams AJ, Grulke CM, Edwards J, McEachran AD, Mansouri K, Baker NC, et al. The CompTox chemistry dashboard: a community data resource for environmental chemistry. *J Chem Inform.* 2017;9:61.
- [16] Fay M, Donohue J, De Rosa C. ATSDR evaluation of health effects of chemicals. VI. Di(2-ethylhexyl)phthalate. Agency for Toxic Substances and Disease Registry. *Toxicol Ind Health Toxicol.* 1999;15:651–746.
- [17] Review of EPA’s Integrated Risk Information System (IRIS) Process. EPA 2014. DOI: 10.17226/18764.

- [18] Schmidt U, Struck S, Gruening B, Hossbach J, Jaeger IS, Parol R, et al. SuperToxic: a comprehensive database of toxic compounds. *Nucleic Acids Res.* 2008;37:D295–9.
- [19] Pineda S, Chaumeil P, Kunert A, Kaas Q, Thang M, Le L, et al. ArachnoServer 3.0: an online resource for automated discovery, analysis and annotation of spider toxins. *Bioinformatics.* 2018;34:1074–6. DOI: 10.1093/bioinformatics/btx661.
- [20] Bhatia S, Schultz T, Roberts D, Shen J, Kromidas L, Api AM. Comparison of Cramer classification between Toxtree, the OECD QSAR Tool-box and expert judgment. *Regul Toxicol Pharmacol.* 2015;71:52–62.
- [21] Sushko I, Salmina E, Potemkin VA, Poda G, Tetko IV. [ToxAlerts: a web server of structural alerts for toxic chemicals and compounds with potential adverse reactions.](#) *J Chem Inf Model.* 2012;52:2310–16.
- [22] Loizou G, Hogg A. [MEGen: a physiologically based pharmacokinetic model generator.](#) *Front Pharmacol.* 2011;2:56.
- [23] Bessems JG, Loizou G, Krishnan K, Clewell HJ, Bernasconi C, Bois F, et al. PBTK modelling platforms and parameter estimation tools to enable animal-free risk assessment. *Regul Toxicol Pharmacol.* 2014;68:119–39.
- [24] Gini G, Franchi AM, Manganaro A, Golbamaki A, Benfenati E. ToxRead: a tool to assist in read across and its use to assess mutagenicity of chemicals. *SAR QSAR Environ Res.* 2014;25:999–1011.
- [25] Chaudhry Q, Piclin N, Cotterill J, Pintore M, Price NR, Chrétien JR, et al. [Global QSAR models of skin sensitizers for regulatory purposes.](#) *Chem Cent J.* 2010;4:S5.
- [26] Gramatica P, Cassani S, Chirico N. [QSARINS-chem: insubria datasets and new QSAR/QSPR models for environmental pollutants in QSARINS.](#) *J Comput Chem.* 2014;35:1036–44.
- [27] Capuzzi SJ, Kim IS-J, Lam WI, Thornton TE, Muratov EN, Pozefsky D, et al. Chembench: a publicly accessible, integrated cheminformatics portal. *J Chem Inf Model.* 2017;57:105–8.
- [28] Ruusmann V, Sild S, Maran U. QSAR DataBank repository: open and linked qualitative and quantitative structure–activity relationship models. *J Cheminform.* 2015;7:32.
- [29] LoPachin RM, Gavin T. [Molecular mechanisms of aldehyde toxicity: a chemical perspective.](#) *Chem Res Toxicol.* 2014;27:1081–91.
- [30] Mehta R, Schrader TJ. Carcinogenic substances in food: mechanisms. In: Caballero B, Finglas P, Toldra F, editor(s). *Encyclopedia of food sciences and nutrition.* USA: Academic Press, 2005:117.
- [31] Matsumoto M, Kano H, Suzuki M, Katagiri T, Umeda Y, Fukushima S. Carcinogenicity and chronic toxicity of hydrazine monohydrate in rats and mice by two-year drinking water treatment. *Regul Toxicol Pharmacol.* 2016;76:63–73.
- [32] Vale A, Lotti M. Organophosphorus and carbamate insecticide poisoning. In: Lotti M, Blecker M, editor(s). *Handbook of clinical neurology* Vol. 131. Amsterdam: Elsevier, 2015:149–68.
- [33] Müller L, Mauthe RJ, Riley CM, Andino MM, De Antonis D, Beels C, et al. A rationale for determining, testing, and controlling specific impurities in pharmaceuticals that possess potential for genotoxicity. *Regul Toxicol Pharmacol.* 2006;44:198–211.
- [34] Kovacic P, Somanathan R. Nitroaromatic compounds: environmental toxicity, carcinogenicity, mutagenicity, therapy and mechanism. *J Appl Toxicol.* 2014;34:810–24.
- [35] Reddy AV, Jaafar J, Umar K, Majid ZA, Aris AB, Talib J, et al. Identification, control strategies, and analytical approaches for the determination of potential genotoxic impurities in pharmaceuticals: a comprehensive review. *J Sep Sci.* 2015;38:764–79.
- [36] Gehring R, Van Der Merwe D. Toxicokinetic-toxicodynamic modeling. In: Gupta R, editor. *Biomarkers in toxicology.* USA: Academic Press, 2014.
- [37] Raies AB, Bajic VB. [In silico toxicology: computational methods for the prediction of chemical toxicity.](#) *Wiley Interdiscip Rev Comput Mol Sci.* 2016;6:147–72.
- [38] Ding B, Hua C, Kepert CJ, D’Alessandro DM. Influence of structure–activity relationships on through-space intervalence charge transfer in metal–organic frameworks with cofacial redox-active units. *Chem Sci.* 2019;10:1392–400.
- [39] Romero-Estudillo I, Viveros-Ceballos JL, Cazares-Carreño O, González-Morales A, Flores de Jesus B, López-Castillo M, et al. [Synthesis of new \$\alpha\$ -aminophosphonates: evaluation as anti-inflammatory agents and QSAR studies.](#) *Bioorg Med Chem.* 2018;27:2376–86.
- [40] Begam BF, Kumar JS. Computer assisted QSAR/QSPR approaches – a review. *Indian J Sci Technol.* 2016;9:8.
- [41] Yousefinejad S, Hemmateenejad B. [Chemometrics tools in QSAR/QSPR studies: a historical perspective.](#) *Chemom Intell Lab Syst.* 2015;149:177–204.
- [42] Medina-Franco JL, Navarrete-Vázquez G, Méndez-Lucio O. [Activity and property landscape modeling is at the interface of cheminformatics and medicinal chemistry.](#) *Future Med Chem.* 2015;7:1197–211.
- [43] Maggiora GM. On outliers and activity cliffs – why QSAR often disappoints. *J Chem Inf Model.* 2006;46:1535.
- [44] Dimova D, Bajorath J. [Advances in activity cliff research.](#) *Mol Inform.* 2016;35:181–91.
- [45] Szczepek M, Brondani V, Büchel J, Serrano L, Segal DJ, Cathomen T. Structure-based redesign of the dimerization interface reduces the toxicity of zinc-finger nucleases. *Nat Biotechnol.* 2007;25:786–93.
- [46] Allen CHG, Koutsoukas A, Cortés-Ciriano I, Murrell DS, Malliavin TE, Glen RC, et al. [Improving the prediction of organism-level toxicity through integration of chemical, protein target and cytotoxicity qHTS data.](#) *Toxicol Res (Camb).* 2016;5:883–94.
- [47] Gleeson MP, Modi S, Bender A, Robinson RL, Kirchmair J, Promkatkaew M, et al. [The challenges involved in modeling toxicity data in silico: a review.](#) *Curr Pharm Des.* 2012;18:1266–91.
- [48] Kalgutkar A, Didiuk M. Structural alerts, reactive metabolites, and protein covalent binding: how reliable are these attributes as predictors of drug toxicity? *Chem Biodivers.* 2009;6:2115–37.
- [49] Lasser KE, Allen PD, Woolhandler SJ, Himmelstein DU, Wolfe SM, Bor DH. Timing of new black box warnings and withdrawals for prescription medications. *J Am Med Assoc.* 2002;287:2215–20.
- [50] Mayr A, Klambauer G, Unterthiner T, Hochreiter S. [DeepTox: toxicity prediction using deep learning.](#) *Front Environ Sci.* 2016;3:80.
- [51] Glück J, Buhrke T, Frenzel F, Braeuning A, Lampen A. [In silico genotoxicity and carcinogenicity prediction for food-relevant secondary plant metabolites.](#) *Food Chem Toxicol.* 2018;116:298–306.
- [52] Arvidson KB, Valerio LG, Diaz M, Chanderbhan RF. In silico toxicological screening of natural products. *Toxicol Mech Methods.* 2008;18:229–32.

- [53] Ruiz-Rodríguez MA, Vedani A, Flores-Mireles AL, Cháirez-Ramírez MH, Gallegos-Infante JA, González-Laredo RF. In silico prediction of the toxic potential of lupeol. *Chem Res Toxicol*. 2017;30:1562–71.
- [54] Valerio LG, Arvidson KB, Chanderbhan RF, Contrera JF. [Prediction of rodent carcinogenic potential of naturally occurring chemicals in the human diet using high-throughput QSAR predictive modeling](#). *Toxicol Appl Pharmacol*. 2007;222:1–16.
- [55] Münzner R, Renner HW. [Mutagenicity testing of quinine with submammalian and mammalian systems](#). *Toxicol*. 1983;26:173–8.
- [56] Ramel C, Alekperov UK, Ames BN, Kada T, Wattenberg LW. Inhibitors of mutagenesis and their relevance to carcinogenesis: report by ICPEMC expert group on antimutagens and desmutagens. *Mutat Res Genet Toxicol*. 1986;39:511–7.
- [57] Van Went GF. Mutagenicity testing of 3 hallucinogens: LSD, psilocybin and 9-THC using the micronucleus test. *Experientia*. 1978;34:342–5.
- [58] Noriega-Colima K, Martínez-Mayorga K, Madariaga-Mazon A. DiaNat-DB: una base de datos de agentes antiabéticos de origen natural: generación y análisis de las propiedades fisicoquímicas y estructurales. Available at: <http://132.248.9.195/ptd2019/marzo/0786633/Index.html>. 2018.
- [59] Onguéné A, Simoben C, Fotso G, Andrae-Marobela K, Khalid S, Ngadjiu B, et al. In silico toxicity profiling of natural product compound libraries from African flora with anti-malarial and anti-HIV properties. *Comput Biol Chem*. 2018;72:136–49.
- [60] Ntie-Kang A, Telukunta KK, Döring K, Simoben CV, Moumbock AFA, Malange YI, et al. NANPDB: a resource for natural products from Northern African sources. *J Nat Prod*. 2017;80:2067–76.

Abraham Madariaga-Mazón¹ / Ricardo Bruno Hernández-Alvarado¹ / Karla Olivia Noriega-Colima¹ / Adriana Osnaya-Hernández¹ / Karina Martinez-Mayorga¹

Toxicity of secondary metabolites

¹ Chemical Physics, Instituto de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Avenida Universidad 3000, Mexico City, Mexico, E-mail: kmtzm@unam.mx

Abstract:

Secondary metabolites, commonly referred to as natural products, are produced by living organisms and usually have pharmacological or biological activities. Secondary metabolites are the primary source for the discovery of new drugs. Furthermore, secondary metabolites are also used as food preservatives, biopesticides or as research tools. Although secondary metabolites are mainly used by their beneficial biological activity, the toxicity of some of them may limit their use. The toxicity assessment of any compound that is prone to be used in direct contact with human beings is of vital importance. There is a vast spectrum of experimental methods for toxicity evaluation, including *in vitro* and *in vivo* methodologies. In this work, we present an overview of the different sources, bioactivities, toxicities and chemical classification of secondary metabolites, followed by a sketch of the role of toxicity assessment in drug discovery and agrochemistry.

Keywords: secondary metabolites, drugs, agrochemicals, toxicity assessment

DOI: 10.1515/psr-2018-0116

1 Introduction

Organisms, such as bacteria, fungi, or plants, produce a variety of organic compounds, being some of them essential for the survival of the organism. These compounds include sugars, proteins, and amino acids and are commonly known as primary metabolites. Other types of compounds that are not essential for their normal growth, development, or reproduction, are classified as secondary metabolites or generically also called natural products. Williams et al. [1] defined natural products as substances that have no apparent role in the internal economy of the organism that produces it.

Secondary metabolites have served as drugs or as an inspiration to obtain drugs. Other applications include dyes, polymers, fibers, glues, oils, waxes, flavoring agents, and perfumes. Consequently, awareness of their biological properties has opened the search for new drugs, antibiotics, insecticides, and herbicides, among other uses [2].

Although natural products have a key role in drug discovery, some of them are highly toxic. In this context, toxicity refers to the harmful effect on a whole organism, such as an animal, bacterium, or plant, as well as the effect on a substructure of the organism, such as a cell or an organ. Nevertheless, the toxic effect of compounds can also be beneficial for the treatment of some illness, for example, cytotoxic compounds are used in cancer treatment. Thus, secondary metabolites may show dual roles [3].

The overview of the different chemical and biological aspects of secondary metabolites presented in this work paves the way to the prediction of toxicity of these relevant compounds.

2 Secondary metabolites: Sources, classification, and bioactivities

Secondary metabolites are produced in every single living organism on earth. By their ancestral use, plants are probably the best known and more explored source of bioactive natural products, followed by microorganisms and a smaller fraction from animals. There is evidence on the usage of medicinal plants since the Sumerians (approximately 5000 years ago), referring to a collection of plants including poppy, henbane, and mandrake; or the Chinese (2500 BC) describing the use of camphor, ginseng, cinnamon bark and ephedra [4]. Nevertheless, it was until the nineteenth century that active secondary metabolites were isolated and characterized from medicinal plants. Nowadays, the use of these remedies is a common practice, particularly in countries where alternative medicine is the preferred and available choice to maintain health for the prevention, diagnosis, improvement or treatment of physical and mental illness. This knowledge, accumulated over centuries, represents the basis for modern medicine.

Karina Martinez-Mayorga is the corresponding author.

© 2019 Walter de Gruyter GmbH, Berlin/Boston.

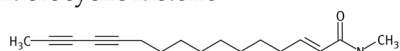
The discovery of penicillin, the first mass-produced antibiotic derived from *Penicillium* fungi, is the well-known Fleming's serendipity case. Since then, the use of microorganisms for the discovery of secondary metabolites with biological activities has remarkably increased. In particular, bacteria and fungi arise as a promising source of bioactive compounds. It is estimated that only a small fraction of the total fungi species known have been chemically characterized [5]. The diversity in chemical structures of the fungi-derived compounds, and by consequence in biological activities, depends on several factors. One of them is the environment of isolation, i. e. soil, dust, sand, marine sediment, fresh and sea water, tissues of terrestrial and marine plants (endophytes), as well as from marine invertebrates and vertebrates (entomopathogenic) [6].

Many of the biological activities of the newly discovered secondary metabolites remain unknown. With the aid of data mining, new methodologies can be applied to suggest bioactivities of novel structures. For example, based on network pharmacology approaches, a suggestion of possible molecular targets is provided [7].

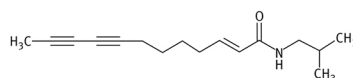
2.1 Chemical classification and bioactivities

Secondary metabolites are structurally and chemically diverse. Traditionally, natural products have been classified according to their structural similarity, and hence similarities in their pathway of biosynthesis: fatty acids and polyketides (from acetate pathway), phenylpropanoids and aromatic amino acids (from shikimate pathway), terpenoids and steroids (from mevalonate pathway) and nitrogen-containing compounds (alkaloids). Attempts to classify secondary metabolites based on their biological effects was not possible since in most cases the activity was (and still is) unknown [1]. The large diversity observed for these compounds derives on a large coverage of the chemical space as recently described [8]. In chemoinformatic terms, this is relevant for the development of predictive models which relies on the chemical space covered by the molecules in training sets.

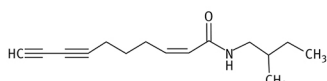
Polyketides are built by condensation of acetate units deriving in poly- β -keto chains and creating a large class of structurally diverse compounds. This class includes fatty acids, polyacetylenes, prostaglandins, macrolide antibiotics and a large group of aromatic compounds such as anthraquinones and tetracyclines. Examples of fatty acids are alkamides (**1–4**), present in herbal preparations of dried roots of *Echinacea purpurea* are widely used as immunostimulants, commonly used for treating bacterial and viral infections. Among polyketides are the medical important macrolides, a large family of natural products with antibiotic activity, characterized by a macrocyclic lactone.



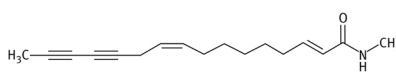
1 Tetradecca-2E-ene-10, 12-diynoic acid isobutylamide



2 Dodeca-2E-ene-8, 10-diynoic acid isobutylamide

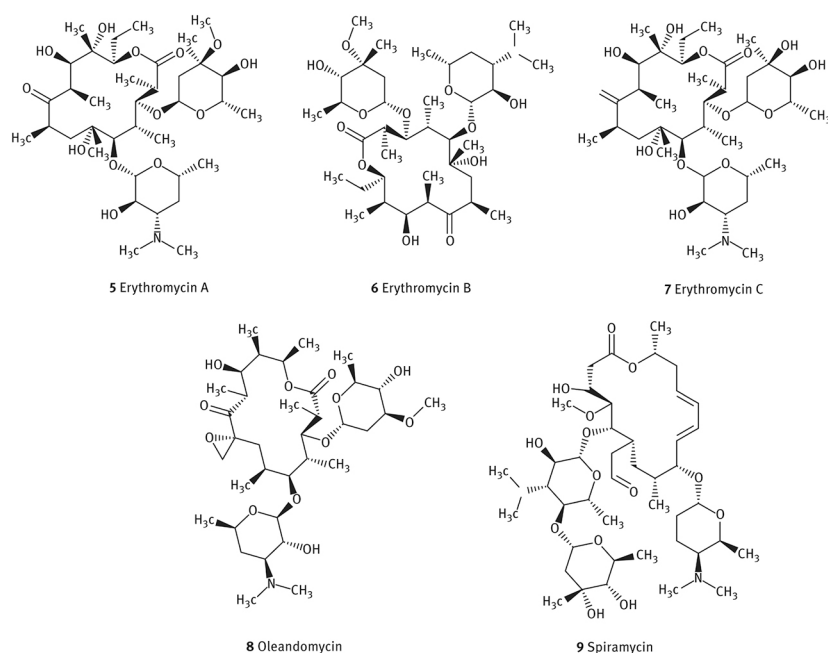


3 Undeca-2Z-ene-8, 10-diynoic acid 2-methylbutylamide

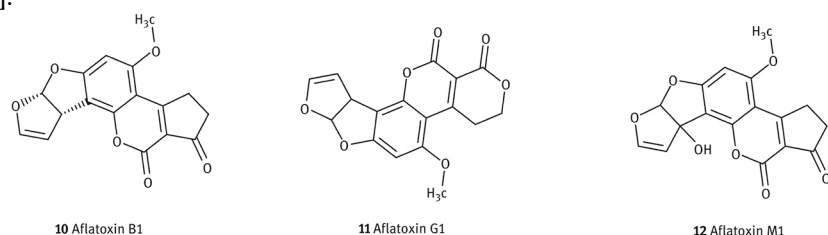


4 Hexadeca-2E,9Z-diene-12, 14-diynoic acid isobutylamide

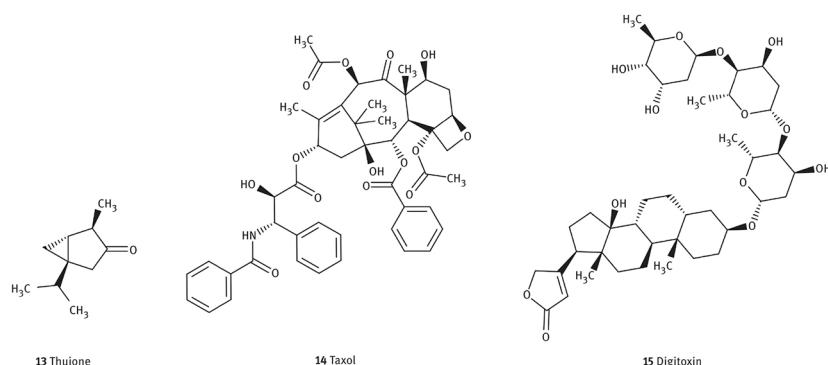
Erythromycins are macrolide compounds isolated from *Saccharopolyspora erythraea*. Erythromycin A is the main compound of the commercial product erythromycin, a mixture containing erythromycins A, B, and C (**5–7**). Other examples of macrolides with antibiotic activity are oleandomycin (**8**), produced by fermentation cultures of *Streptomyces antibioticus* and spiramycins (**9**) produced by cultures of *Streptomyces ambofaciens* [9].



Aflatoxins are mycotoxins produced by the fungi *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus* with an anthraquinone derived biosynthesis (10–12). There are four main aflatoxins, but these toxins can be metabolized by animals or other microorganisms to produce other aflatoxins. The most common mycotoxin is aflatoxin B₁ and is also the most acutely toxic. These toxins are associated with peanuts, maize, rice and pistachio nuts [10, 11].

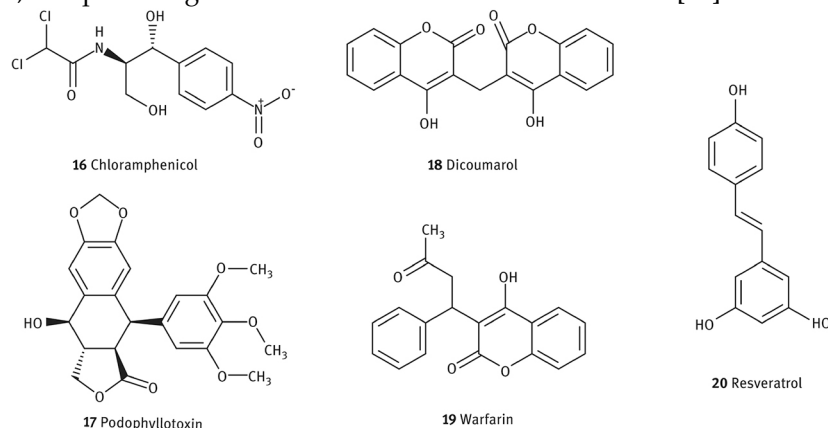


Terpenoids are the largest group of secondary metabolites with over 35,000 known members, and they are classified according to the number of isoprene units (five carbons) in their skeleton. The smaller building block, the isoprene, is thought to protect the plant from heat. Representative terpenoids are essential oils or higher polymers such as rubber. The monoterpene (ten carbons, two isoprene units) thujone (13) is present in the wormwood oil from *Artemisia absinthium*, one of the main components of the drink absinthe, known by its neurotoxic effect and now banned in several countries [12]. Essential oils give plants their fragrance, though the good aroma is not only their main purpose. For example, citronella oil from *Cymbopogon winterianus* and *C. nardus* is used as a component of commercial insect repellents; eucalyptus oil from *Eucalyptus globulus* (and other species) has antiseptic effect; or the well-known pine essential oil from *Pinus palustris* or other pines species used in industrial cleaning chemicals by its disinfectant activity [13]. One of the “molecular stars” in the terpenoids group is taxol (14), a diterpene with anticancer properties isolated in 1971, obtained from the bark of the Pacific yew, *Taxus brevifolia*. Since the amount needed of taxol for a course treatment may be as high as 2 g, the harvesting of the bark has been strictly regulated. Some alternatives have been explored and used, such as semi-synthesis from more accessible structurally related materials; or obtention by microbial culture from endophytic fungi isolated from the bark of the *T. brevifolia* and *T. wallachiana* species (*Taxomyces andreanae* and *Pestalotiopsis microspora*, respectively). Nevertheless, the chemical conversion of the derivatives to produce the final product taxol is still complex, and the yields from fungi culture extractions are so low that is insignificant in terms of commercial drug production [14, 15]. Cardioactive glycosides are present in many plants that are grown as ornamentals but must be considered as toxic and should be treated with caution, including *Digitalis* and *Helleborus* species. Among these compounds, digitoxin (15) is the only compound used with medical purposes, employed in congestive heart failure and treatment of cardiac arrhythmias [16]. Rubber, the largest of the terpenoids, contains over 400 isoprene units and it is obtained from latex (a fluid produced by *Hevea brasiliensis*) [17].

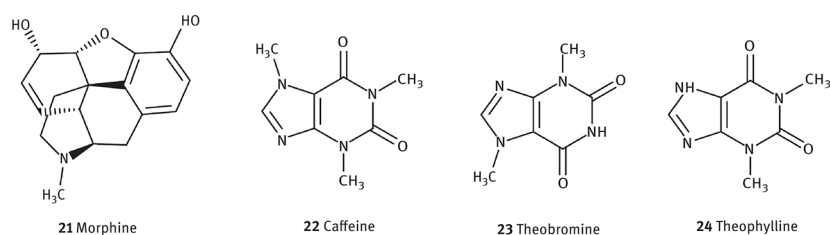


From the shikimate pathway, limited to microorganisms and plants, but no animals, a great variety of aromatic compounds can be biosynthesized. These include aromatic amino acids such as phenylalanine, tyrosine, tryptophan, and benzoic acids. One of the first broad-spectrum antibiotics discovered belongs to this type of compounds: chloramphenicol (16), an aminated derivative of *L-p*-aminophenylalanine produced by cultures of *Streptomyces venezuelae*, even though the synthetic compound is now used as the commercial drug [18]. Phenylalanine and tyrosine (in their *L*- forms) are precursors of important phenylpropanoids such as caffeic and ferulic acids, with significant antioxidant activities [19]. In turn, phenylpropanoids are the building blocks for lignans and lignins, polymers formed by two or more units, respectively. Podophyllotoxin (17), one of the main lignans contained in preparations from roots of *Podophyllum* species, demonstrated antimitotic effect by binding to the protein tubulin during mitosis. Due to its significant toxicity, the use in the clinic for anticancer treatment has been banned, increasing the research around derivatives with lesser undesirable effects [20]. Coumarins are also contained in this group, they are biosynthesized from cinnamic acid and later a rearrangement to form a lactone, to form the characteristic two-ring systems of this biologically important metabolites. Dicoumarol (18) and warfarin (19) are coumarins having toxic effects due to their potent anticoagulant effects. Indeed, warfarin was initially used as a rodenticide, causing internal hemorrhage and death of the rat [21].

Finally, flavonoids, stilbenes, and phenylpropanoids comprise an important and vast group from the shikimate pathway. Although they are known by their noteworthy beneficial properties to human health, several compounds have also attracted attention due to the diverse roles that play in plants, such as antimicrobial agents (phytoalexins), photoreceptors, pigments, insect repellents, regulators of hormones transport, among others [22]. A variety in flavonoids and stilbenes can be found in red wine, rich in resveratrol (20) and relevant for its antioxidant activity, and recently described also as an anti-inflammatory, inhibition of platelet aggregation, and protect against cancer and cardiovascular diseases [23].



The last group of secondary metabolites is alkaloids: low molecular weight nitrogen-containing compounds mainly found in plants and with lesser occurrence in microorganisms and animals. One of the most remarkably known alkaloids is morphine (21), extracted from opium poppy *Papaver somniferum*. Morphine is a powerful analgesic and narcotic, and despite its several adverse effects (state of euphoria and mental detachment, together with nausea, vomiting, gastrointestinal constipation, respiratory depression, among others), remains as one of the first options for relief of severe pain. Several investigations have been conducted aiming to design novel structures with the ability to retain the analgesic properties but diminishing adverse effects, resulting in the new paradigm of biased activation of the opioid receptors. Nevertheless, further research is warranted [24]. In our daily used beverages, such as tea, coffee, and cocoa, one can find several xanthine-derivatives alkaloids. The main alkaloids, caffeine (22), theobromine (23), and theophylline (24), inhibit the phosphodiesterase that degrades cyclic AMP, resulting in an increase in cAMP levels and consequent stimulation of the central nervous system, relaxation of bronchial smooth muscle, induction of diuresis, among others [25].



This overview highlights the importance of natural products and bioactivities as therapeutic agents as well as commonly used foods and beverages.

2.2 Toxicity of representative secondary metabolites

As described in the text, natural products are chemical compounds that usually have a beneficial application for human health. Nevertheless, the same organisms also produce toxic molecules. It has been hypothesized that secondary metabolites are biosynthesized as waste or detoxification products. It has also been suggested that secondary metabolites have functional metabolic roles. The most accepted hypothesis is that secondary metabolites are produced as a survival role, e.g. as a defense against other organisms, such as in the case of prey capture [1]. Therefore, high toxicity is an inherent characteristic of this purpose. Interestingly, to whom these compounds are toxic to, needs to be stated.

For centuries, humans have had a fascination (and also a fear) for the toxic effects of organisms: plants, animals, microorganisms. The interest in this area is such that a scientific field is entirely dedicated to the research on toxic compounds (toxins) produced by living organisms, called toxicology [26]. It is worth noting the difference between venom and poison. Venoms referred to animal secretions that contain mixtures of different enzymes, toxins, and other compounds, generated through a specialized organ and that is delivered through a specialized system. In turn, poisons are substances, not only produced by natural sources, that cause noxious effects in organisms. The animal-derived poisons are produced via specialized cells or tissues, and they can be suffused throughout their bodies, so in this case, the toxic effect occurs when the predator organism is exposed to the poisonous organism [27]. Selected examples of natural products with known toxic activity are listed in Table 1.

Table 1: Selected examples of secondary metabolites with known toxicity expressed as their lethal doses (LD_{50}) values.

Source	Molecule	Toxicological effect	LD_{50} *, mg/kg (animal model, route of admin- istra- tion)	Reference
Clostridium tetani	Botulinum Toxin**	Neurotoxic	0.0000004– 0.0000025 (mus, IP)	[28]
Shigelladysenteriae	Shiga toxin	Enterotoxic	0.02 (mus, ip)	[29]
Catharanthusroseus	Vincristine	Cytotoxic	1.9 (rat, ip)	[30]
Colchicum autumnale	Colchicine	Cytotoxic	6.1 (rat, ip)	[30]
Taxusbrevifolia	Paclitaxel	Cytotoxic	32.5 (rat, ip)	[31]
Amanita muscaria	Muscimol	Neurotoxic	45 (rat, oral)	[32]
Nicotiniana spp.	Nicotine	Neurotoxic	50 (rat, oral)	[33]
Psilocybe spp.	Psilocybins	Neurotoxic	280 (rat, iv)	[30]
Gyromitra esculenta	Gyromitrin	Hepatotoxic	320 (rat, oral)	[34]
Cinchona spp.	Quinine	Antimalarial	115 (mus, ip)	[30]

Atropabelladona	Atropine	Neurotoxic	500 (rat, oral)	[29]
Prunus spp.	Amygdalin	Cyanogenic	880 (rat, oral)	[35]

*LD₅₀ is the amount of a material, given all at once, which causes the death of one half of a group of test animals.

**Range for different botulinum toxins: A, B, C1, C2, D, E and F.

Humans have found practical applications for toxic secondary metabolites in, at least, two major fields: drug design and agrochemical industry. Analyzing the features that contribute to their toxicity is mandatory in drug discovery since the majority of candidates to be a hit in big pharma are rejected due to either their lack of bioavailability or their inherent toxicity to human organs or cells. In turn, if compounds with exceptional pesticide activity are toxic not only to targeted organisms (insects, fungi, weeds, etc.) but also to humans, they fail in the final agrochemical-development pipeline. Therefore, it is advisable to determine toxicological endpoints early in the development of new molecules. In the following sections, we focus on the relevance of toxicity in drug discovery and agrochemistry.

3 Toxicity assessment in agrochemicals and drugs

3.1 Toxicity assessment

Typically, the measure of toxicity is based on the LD₅₀ value, defined as the lethal dose that kills, on average, 50% of the test animals using a specified administration route [26]. There are, however, modifications to this method, to decrease the number of laboratory animals used. Acute toxicity is, in general, easier and cheaper to evaluate, compared to sub-chronic and chronic exposures. Nonetheless, chronic exposure of toxicants, as well as those with long residence time, should be evaluated properly. In practice, this influences, for example, the decision about dosing. The major difference between repeated dose and subchronic toxicity studies is the duration: repeated dose toxicity studies are conducted over a duration of 28 days, and subchronic toxicity studies are carried out over 90 days [36]. A detailed description of the guidance for the evaluation of chronic effects is provided by the OECD [37]. Relevant definitions used in toxicity assessment are provided below.

Route of administration: The preparation to be used determines if the oral, topical, inhalation or any other via of administration/exposure should be investigated.

Organ or tissue damaged/affected: Commonly damage to DNA is investigated. This section includes mutagenicity, carcinogenicity, teratogenicity, and neurotoxicity, among others.

Pharmacologically based pharmacokinetics (PBPK) models: Moving forward to more complex determinations, identification of PBPK models could allow mitigating tissue-specific effects (e.g. limit exposure to the central nervous system for undesirable on-target neuronal pharmacology). Efforts on this direction have been reported and continue to be developed. Ruiz et al. [38] at the Agency of Toxic Substances & Disease Registry (ATSDR) have reported the on-going work for the development of the ATSDR toolkit, a computational tool to assist with site-specific health assessments. Currently, models of environmental contaminants, including volatile organic compounds (VOCs) and metals, have been developed [39–41].

A review of PBPK models performed by Sager et al. [42] showed that the most commonly reported models were those for drug-drug interaction predictions (28%), followed by inter-individual variability and general clinical pharmacokinetic predictions (23%), formulation or absorption modeling (12%), and predicting age-related changes in pharmacokinetics and disposition (10%). In addition, they identified 106 models of sensitive substrates, inhibitors, and inducers. The lack of consistency in model quality and development, identified by the authors, highlighted a need for the development of best practice guidelines.

Adverse outcome pathway (AOP). The AOP is a way to link existing knowledge to one or more series of causally connected key events (KE) between two points—a molecular initiating event (MIE) and an adverse outcome (AO) that occur at a level of biological organization. AOP is important for risk assessment (evaluation of what can go wrong, how likely it is to happen, what the potential consequences are, and how tolerable the identified risk is) and regulatory applications. AOPs are under development, the definitions, the working workflow, and the details around AOPs are available elsewhere [43].

The testing of acute effects of chemicals “6-pack” include:

Acute Inhalation: Medial lethal concentration (LC50) from short-term exposure to a test substance by the inhalation route.

Acute Oral: Medial lethal dose (LD50) from short-term exposure to a test substance by the oral route.

Acute Dermal: Medial lethal dose (LD50) from short-term exposure to a test substance by the dermal route.

Eye Irritation: Provides information on health hazard likely to arise from exposure to test substance (liquids, solids, and aerosols) by single dose application on the eye.

Skin Irritation: Provides information on health hazard likely to arise from exposure to liquid or solid test substance by dermal application.

Dermal Sensitization: Determine the potential for a test substance to elicit a skin sensitization reaction. There are different methods, for example, the basic principle underlying the Local Lymph Node Assay (LLNA) in mouse is that sensitizers induce a primary proliferation of lymphocytes in the auricular lymph nodes draining the site of chemical application. This proliferation is proportional to the dose applied and provides a measurement of sensitization.

Detailed descriptions of these and other methods are accessible in the OECD Guide documentation.

The extensive use of laboratory animals is a concern. International organizations (OECD, EPA, etc.) spend efforts to the use, standardization, and acceptance of alternative methods. A modernization of the battery of acute toxicity tests “6-pack” has been proposed.

The 6-pack was revised in 2015 to include non-animal (in vitro/ex vivo) test methods for classification and labeling for Eye Irritation, both for commonly used household cleaning products with anti-microbial claims and more conventional pesticides products. In 2018, EPA has continued the modernization of the 6-pack through its Draft Interim Science Policy to allow the Skin Sensitization endpoint to be performed in *in vitro* models as well. Currently, only pure substances are permitted to be used as test materials for submission purposes and one of the Integrated Testing Strategies.

The modernization of the acute toxicity “6-pack” has three main goals:

- * Critically evaluate which studies form the basis of Office of Pesticide Programs decisions.
- * Expanding acceptance of alternative methods and;
- * Reducing barriers such as challenges of data sharing among companies and international harmonization to adopting alternative methods in the U.S. and internationally.

3.2 Toxicity of drug candidates

Being toxicity an inherent property of all substances, it needs to be extensively assessed to any drug before it is launched to the market. A battery of *in vitro* and *in vivo* experiments is required. These experiments are costly, time-consuming and demand a large number of laboratory animals and reagents. Toxicological determinations in the discovery process focus on key mechanisms of toxicity. In general, there are a series of assays to be performed depending on the drug discovery stage; for example, studies on earlier stages use high-throughput methods both *in silico* and *in vitro* but lead or preclinical compounds are subjected to advanced procedures focused to off-target selectivity screening or using of animals for dosing experiments [44]. This scenario highlights the convenience of eliminating drug candidates that are likely to fail due to toxicity issues, and for this purpose, *in silico* methods are valuable tools. Nevertheless, the quality and the quantity of the toxicological data or the mechanism of action to be calculated remain to be the workhorse for the development of *in silico* models. Common *in silico* filters include hepatotoxicity, mutagenicity, carcinogenicity, and propensity for developing reactivity reactions. Segall et al. [45] provide predictions for a range of endpoints including hepatotoxicity, hERG-channel inhibition, developmental toxicity, teratogenicity, chromosomal damage (*in vitro* and *in vivo*), mutagenicity (*in vitro*) and carcinogenicity (dataset available upon request). The authors present the analysis of toxicity in the context of balancing multiple factors involved in the discovery of new drugs. Such a scenario is often called multiparameter optimization (MPO), emphasizing on the advantages of avoiding hard filters, by weighting the scoring profiles and considering the uncertainty in the data.

3.3 Toxicity of agrochemicals

Pesticides are widely employed around the world. The number and type of pesticide use vary across different crops and countries. Figure 1 summarizes the number of different pesticides used for different crops. This information was obtained from the analysis of the Pesticides Properties DataBase (PPDB) [46] developed by the Agriculture & Environment Research Unit (AERU) at the University of Hertfordshire. Notably, there is a large variety of pesticides used to produce cereals, fruits, and vegetables. Clearly, modern agricultural practices require the use of hundreds of pesticides; it is paramount to stick to good practices and ethics.

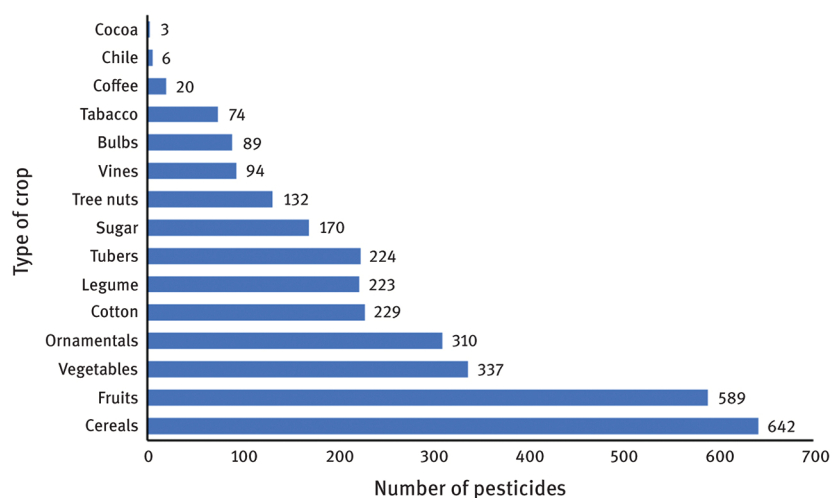


Figure 1: The number of different pesticides used for different crops.

An evident requirement of the pesticides is their toxicity. Needless to say, the pesticides should be as selective as possible to the pest under control and as harmless as possible to non-target organisms, especially humans and the environment [47]. In a recent study, we analyzed the different ranges of toxicity across different species, modes of exposure and toxicological modes of action [48]. As expected, for sensitive animals, such as birds, the ranges of toxicities obtained are one order of magnitude more toxic, for the same endpoint, than for larger and less sensitive species, such as mammals.

Most pesticides are synthetic compounds. However, a small group of pesticides obtained from natural sources has shown particularly good toxicological profiles, being more selective to pest and less harmful to humans, animals or the environment. Pesticides with lesser toxicological and more benign-environmental profiles should take high priority in the development of new pesticides. Some natural products fill the characteristics for the development of new pesticides with these needs (for example with molecular target sites different than those of the synthetic pesticides). Table 2 show examples of selected secondary metabolites used in pest control.

Table 2: Selected examples of toxic compounds used in agrochemical industry.

Classification	Molecule name	Reference
Weed control	Glufosinate	[49]
	AAL-toxin	[50]
	Leptospermone	[51]
Insect control	Spinosad	[52]
	Avermectins	[53]
	Rotenone	[54]
Mollusc control	Vulgarone B	[55]
	<i>Phytolacca dodecandra</i>	[56]
Algae control	9,10-anthraquinone	[57]
	Menadione sodium bisulfite	[58]
	Azoxystrobin	[59]
Plant pathogens control	Cinnamaldehyde	[60]
	Flindersine	[61]

Interestingly, a large portion of pesticides, contained in PPDB (one of the most comprehensive pesticide database), are classified as metabolites [46]. In this database, those classified as metabolites correspond to chemical degradation substances and might retain pesticidal activity. This highlights the relevance of metabolic products, in addition to those naturally occurring in nature.

Automatically generated rough PDF by ProofCheck from River Valley Technologies Ltd

4 Conclusions

Secondary metabolites have reached a remarkable place as drugs, agrochemicals, cosmetics, food additives, etc. Knowledge on the structural diversity, natural sources, synthetic feasibility, as well as its inherent toxicities of these compounds will help expand their uses, for the benefit of human and animal health and the environment.

Acknowledgements

The authors thank ChemAxon for kindly providing academic license of their software.

Funding

This work was supported by Instituto de Quimica-UNAM, and DGAPA-UNAM [grant number PAPIIT IN210518].

References

- [1] Williams DH, Stone MJ, Hauck PR, Rahman SK. [Why are secondary metabolites \(natural products\) biosynthesized?](#) Nat Prod. 1989;52:1189–208.
- [2] Croteau R, Kutchan T, Lewis NG. Natural products (secondary metabolites). In: Buchanan B, Gruissem W, Jones R, editors. *Biochemistry & molecular biology of plants*. American Society of Plant Physiologists, 2000:1250–319.
- [3] Schoental R. [Toxicology of natural products](#). Food Cosmet Toxicol. 1965;3:609–20.
- [4] Petrovska B. [Historical review of medicinal plants usage](#). Pharmacogn Rev. 2012;6:1–5.
- [5] Kirk JL, Beaudette LA, Hart M, Moutoglis P, Klironomos JN, Lee H, et al. Methods of studying soil microbial diversity. J Microbiol Methods. 2004;58:169–88.
- [6] Debbab A, Aly AH, Proksch P. [Bioactive secondary metabolites from endophytes and associated marine derived fungi](#). Fungal Divers. 2011;49:1–12.
- [7] Zuo H, Zhang Q, Su S, Chen Q, Yang F, Hu Y. A network pharmacology-based approach to analyse potential targets of traditional herbal formulas: an example of Yu Ping Feng decoction. Sci Rep. 2018;8:1–15.
- [8] Saldívar-González FI, Pilón-Jiménez BA, Medina-Franco JL. Chemical space of naturally occurring compounds. Phys Sci Rev. 2018. DOI: 10.1515/psr-2018-0103.
- [9] Pal S. [A journey across the sequential development of macrolides and ketolides related to erythromycin](#). Tetrahedron. 2006;62:3171–200.
- [10] Leong YH, Latiff AA, Ahmad NI, Rosma A. Exposure measurement of aflatoxins and aflatoxin metabolites in human body fluids. A short review. Mycotoxin Res. 2012;28:79–87.
- [11] Kumar P, Mahato DK, Kamle M, Mohanta TK, Kang SG. Aflatoxins: a global concern for food safety, human health and their management. Front Microbiol. 2017;7:2170.
- [12] Lachenmeier DW, Walch SG, Padosch SA, Kröner LU. Absinthe—a review. Crit Rev Food Sci Nutr. 2006;46:365–77.
- [13] Edris AE. [Pharmaceutical and therapeutic potentials of essential oils and their individual volatile constituents: a review](#). Phyther Res. 2007;21:308–23.
- [14] Altmann KH, Gertsch J. Anticancer drugs from nature – natural products as a unique source of new microtubule-stabilizing agents. Nat Prod Rep. 2007;24:327–57.
- [15] Kingston DGI. [The shape of things to come: structural and synthetic studies of taxol and related compounds](#). Phytochemistry. 2007;68:1844–54.
- [16] Gobbin M, Cerri A. Digitalis-like compounds: the discovery of the O-aminoalkyloxime group as a very powerful substitute for the unsaturated [gamma]-butyrolactone moiety. Curr Med Chem. 2005;12:2343–55.
- [17] Mooibroek H, Cornish K. Alternative sources of natural rubber. Appl Microbiol Biotechnol. 2000;53:355–65.
- [18] Pirae M, Magarvey N, He J, Vining LC. The gene cluster for chloramphenicol biosynthesis in Streptomyces venezuelae ISP5230 includes novel shikimate pathway homologues and a monomodular non-ribosomal peptide synthetase gene. Microbiology. 2001;147:2817–29.
- [19] Razzaghi-Asl N, Garrido J, Khazraei H, Borges F, Firuzi O. [Antioxidant properties of hydroxycinnamic acids: a review of structure- activity relationships](#). Curr Med Chem. 2013;20:4436–50.
- [20] Shareef MA, Duscharla D, Ramasatyaveni G, Dhoke NR, Das A, Ummanni R, et al. Investigation of podophyllotoxin esters as potential anticancer agents: synthesis, biological studies and tubulin inhibition properties. Eur J Med Chem. 2015;89:128–37.
- [21] Borges F, Roleira F, Milhazes N, Santana L, Uriarte E. Simple coumarins and analogues in medicinal chemistry: occurrence, synthesis and biological activity. Curr Med Chem. 2005;12:887–916.
- [22] Ververidis F, Trantas E, Douglas C, Vollmer G, Kretzschmar G, Panopoulos N. Biotechnology of flavonoids and other phenylpropanoid-derived natural products. Part I: chemical diversity, impacts on plant biology and human health. Biotechnol J. 2007;2:1214–34.
- [23] Gambini J, Inglés M, Olaso G, Lopez-Grueso R, Bonet-Costa V, Gimeno-Mallench L, et al. Properties of resveratrol: in Vitro and In Vivo studies about metabolism, bioavailability, and biological effects in animal models and humans. Oxid Med Cell Longev. 2015;2015:837042.

- [24] Madariaga-Mazón A, Marmolejo-Valencia AF, Li Y, Toll L, Houghten RA, Martinez-Mayorga K. Mu-Opioid receptor biased ligands: A safer and painless discovery of analgesics? *Drug Discov Today*. 2017;22:1719–29.
- [25] Ashihara H, Sano H, Crozier A. Caffeine and related purine alkaloids: biosynthesis, catabolism, function and genetic engineering. *Phytochemistry*. 2008;69:841–56.
- [26] Wexler P, Fonger GC, White J, Weinstein S. Toxicology: taxonomy, interpretation, and information resources. *Sci Technol Libr*. 2015;34:67–90.
- [27] Fox J, Serrano S. [Approaching the golden age of natural product pharmaceuticals from venom libraries: an overview of toxins and toxin-derivatives currently involved in therapeutic or diagnostic applications](#). *Curr Pharm Des*. 2007;13:2927–34.
- [28] Environmental Health & Safety. University of Florida. <http://www.ehs.ufl.edu/>.
- [29] Lewis RJ. Sax's dangerous properties of industrial materials. *J Am Chem Soc*. 2005;127:2794–4.
- [30] Kim S, Chen J, Cheng T, Gindulyte A, He J, He S, et al. PubChem 2019 update: improved access to chemical data. *Nucleic Acids Res*. 2019;47:D1102–9.
- [31] Wishart DS, Feunang YD, Guo AC, Lo E, Marcu A, Grant JR, et al. DrugBank 5.0: a major update to the DrugBank database for 2018. *Nucleic Acids Res*. 2018;46:D1074–82.
- [32] Budavari S. The merck index : an encyclopedia of chemicals, drugs, and biologicals, 11th ed. (Budavari S, ed.). N.J., USA: Rahway, 1989.
- [33] Sine C. Nicotine. In: Meister RT, editor. *Farm chemicals handbook '93*. Willoughby, Ohio: 1993:C245
- [34] Patocka J, Pita R, Kuca K. Gyromitrin, mushroom toxin of *gyromitra* spp. *Mil Med Sci Lett*. 2012;81:61–7.
- [35] Adewusi SR, Oke OL. On the metabolism of amygdalin. 1. The LD₅₀ and biochemical changes in rats. *Can J Physiol Pharmacol*. 1985;63:1080–3.
- [36] Parasuraman S. [Toxicological screening](#). *J Pharmacol Pharmacother*. 2011;2:74–9.
- [37] OECD. Test No. 452: chronic toxicity studies. OECD, 2009. DOI: 10.1787/9789264071209-en.
- [38] Ruiz P, Yang X, Lumen A, Fisher J. Quantitative structure–activity relationship (QSAR) models, physiologically based pharmacokinetic (PBPK) models, biologically based dose response (BBDR) and toxicity pathways: computational tools for public health. In: *Comput Toxicol*. January 2013:5–21.
- [39] Ruiz P, Fowler BA, Osterloh JD, Fisher J, Mumtaz M. Physiologically based pharmacokinetic (PBPK) tool kit for environmental pollutants—metals. *SAR QSAR Environ Res*. 2010;21:603–18.
- [40] Ruiz P, Mumtaz M, Osterloh J, Fisher J, Fowler BA. Interpreting NHANES biomonitoring data, cadmium. *Toxicol Lett*. 2010;198:44–8.
- [41] Mumtaz MM, Ray M, Crowell SR, Keys D, Fisher J, Ruiz P. Translational research to develop a human PBPK models tool kit—volatile organic compounds (VOCs). *J Toxicol Environ Heal Part A*. 2012;75:6–24.
- [42] Sager JE, Yu J, Ragueneau-Majlessi I, Isoherranen N. Minireview physiologically based pharmacokinetic (PBPK) modeling and simulation approaches: a systematic review of published models, applications, and model verifications. *DRUG Metab Dispos Drug Metab Dispos*. 2015;43:1823–37.
- [43] Leist M, Ghallab A, Graepel R, Marchan R, Hassan R, Bennekou SH, et al. Adverse outcome pathways: opportunities, limitations and open questions. *Arch Toxicol*. 2017;91:3477–505.
- [44] Kerns EH, Di L, Kerns EH, Di L. Toxicity. Drug-like prop concepts, struct design and methods from ADME to toxicity optimization. Elsevier, 2008:215–23.
- [45] Segall MD, Barber C. [Addressing toxicity risk when designing and selecting compounds in early drug discovery](#). *Drug Discov Today*. 2014;19:688–93.
- [46] Lewis KA, Tzilivakis J, Warner DJ, Green A. An international database for pesticide risk assessments and management. *Hum Ecol Risk Assess An Int J*. 2016;22:1050–64.
- [47] Duke SO, Cantrell CL, Meepagala KM, Wedge DE, Tabanca N, Schrader KK. Natural toxins for use in pest management. *Toxins (Basel)*. 2010;2:1943–62.
- [48] Madariaga-Mazón A, Osnaya-Hernández A, Chávez-Gómez A, García-Ramos JC, Cortés-Guzmán F, Castillo-Pazos DJ, et al. [Distribution of toxicity values across different species and modes of action of pesticides from PESTIMEP and PPDB databases](#). *Toxicol Res*. 2019;8:146–56.
- [49] Duke SO, Rimando AM, Schrader KK, Cantrell CL, Meepagala KM, Wedge DE, et al. Natural products for pest management. In: Ikan R, editor. *Selected topics in the chemistry of natural products*. World Scientific, 2008:209–51.
- [50] Duke SO, Dayan FE. [Modes of action of microbially-produced phytotoxins](#). *Toxins*. 2011;3:1038–64.
- [51] Owens DK, Nanayakkara NPD, Dayan FE. In planta mechanism of action of leptospermine: impact of its physico-chemical properties on uptake, translocation, and metabolism. *J Chem Ecol*. 2013;39:262–70.
- [52] Williams T, Valle J, Viñuela E. Is the naturally derived insecticide Spinosad® compatible with insect natural enemies? *Biocontrol Sci Technol*. 2003;13:459–75.
- [53] Putter I, Mac Connell JG, Preiser FA, Haidri AA, Ristich SS, Dybas RA. Avermectins: novel insecticides, acaricides and nematocides from a soil microorganism. *Experientia*. 1981;37:963–4.
- [54] Gupta RC. Rotenone. In: Wexler P, editor. *Encyclopedia of toxicology*. Elsevier, 2014:185–7.
- [55] Prabhakaran G, Bhoire S, Ravichandran M. [Development and evaluation of poly herbal molluscicidal extracts for control of apple snail \(Pomacea maculata\)](#). *Agriculture*. 2017;7:22.
- [56] Kariuki ST, Kariuki JM, Mailu BM, Muchiri DR. *Phytolacca octandra* (L.), *Phytolacca dodecandra* (L'Herit) and *Balanites aegyptiaca* (L.) extracts as potential molluscicides of schistosomiasis transmitting snails. *J Med Plants Res*. 2017;10:823–8.
- [57] Schrader KK, De Regt MQ, Tidwell PR, Tucker CS, Duke SO. Selective growth inhibition of the musty-odor producing Cyanobacterium *Oscillatoria cf. chalybea* by natural compounds. *Bull Environ Contam Toxicol*. 1998;60:651–8.
- [58] O'Neil J, Scarrott B, Svalheim RA, Elliott J, Hodges SJ. Vitamin K₂ in animal health: an overview. In: Gordeladze J, editor. *Vitamin K₂ – vital for health and wellbeing*. InTech, 2017:215–36.
- [59] Liang S, Xu X, Lu Z. Effect of azoxystrobin fungicide on the physiological and biochemical indices and ginsenoside contents of ginseng leaves. *J Ginseng Res*. 2018;42:175–82.

- [60] Xie Y, Huang Q, Wang Z, Cao H, Zhang D. [Structure-activity relationships of cinnamaldehyde and eugenol derivatives against plant pathogenic fungi](#). *Ind Crops Prod.* 2017;97:388–94.
- [61] Cantrell CL, Case BP, Mena EE, Kniffin TM, Duke SO, Wedge DE. Isolation and identification of antifungal fatty acids from the basidiomycete *Gomphus floccosus*. *J Agric Food Chem.* 2008;56:5062–8.