



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS

SELECTIVIDAD FUNCIONAL DEL RECEPTOR OPIOIDE MU EVALUADO A TRAVÉS DE
SIMULACIONES DE DINÁMICA MOLECULAR Y CÁLCULO DE LA ENERGÍA LIBRE

TESIS

PARA OPTAR POR EL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA

Q. ANDRÉS FELIPE MARMOLEJO VALENCIA

DRA. KARINA MARTÍNEZ MAYORGA
INSTITUTO DE QUÍMICA

CIUDAD DE MÉXICO, OCTUBRE DE 2016



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.

Dedicatoria

Este trabajo está dedicado a mis padres Víctor Hugo Marmolejo Benítez y Luz Fanny Valencia Pérez y a cada uno de los integrantes de estas dos familias.

Agradecimientos

Agradezco a la Universidad Nacional Autónoma de México, UNAM por permitir mi crecimiento académico y personal dentro de un campus considerado Patrimonio de la Humanidad por la UNESCO.

A mi directora de tesis, Dra. Karina Martínez Mayorga, investigadora en el Instituto de Química de la UNAM. Gracias por el tiempo dedicado en este trabajo, la confianza brindada, el carisma y el optimismo durante todo el proceso.

A mi jurado de tesis, Dr. Rubén Santamaría Ortiz, Dr. Rogelio Rodríguez Sotres, Dr. Héctor Viadiu Ilarraza, Dr. César Millán Pacheco y Dra. Laura Domínguez Dueñas, quienes tuvieron la disposición de realizar buenas observaciones con el fin de obtener un contenido adecuado en este documento.

Al Consejo de Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por la beca otorgada con número de becario 335795.

Al Postgrado en Ciencias Químicas y la Facultad de Química de la UNAM, por el conocimiento académico brindado dentro del programa de Maestría que han construido y por los apoyos económicos otorgados.

Al Instituto de Química de la UNAM y a su Departamento de Fisicoquímica y Teórica, por disponer de sus instalaciones en pro de la ciencia y el soporte económicos brindado al proyecto.

Al DGTIC por el tiempo de supercomputo, proyecto SC16-1-IG-55-MZ0 del Dr. Fernando Cortés Guzmán. Al propio Dr. Fernando Cortez Guzmán y a la M.Sc. Lillian G. Ramírez Palma, por su disposición y colaboración en la realización de los cálculos computacionales.

A los amigos, compañeros y colegas que estuvieron en el tiempo de la Maestría en Departamento de Fisicoquímica y Teórica del Instituto de Química de la UNAM; Alberto Fernández Alarcón, Andrea J. Cadena Caicedo, Arturo Sauza de la Vega, David I. Ramírez Palma, Eduardo Hernández Huertas, Elda M. Melchor Martínez, Erik I. Sánchez Flores, Fernando J. Holguín Gallego, Lillian G. Ramírez Palma, Marco A. Tlatelpa Iglesias, Mariano Sánchez Castellanos, Víctor Duarte Alaniz, Víctor A. Aristizabal Ferreira y Wilmer E. Vallejo Narvaez.

Por último, agradecer a toda mi familia y a Natalia Rendón Londoño por el apoyo incondicional detrás de todo el proceso de Maestría.

Tabla de Contenido

| | |
|--|-----------|
| RESUMEN | 1 |
| 1. INTRODUCCIÓN | 2 |
| 2. ANTECEDENTES | 4 |
| 2.1 Receptores opioides y Receptor opioide Mu | 4 |
| 2.1.1 Conceptos de tolerancia, desensibilización e internalización en receptor opioide Mu | 7 |
| 2.1.2 Modulación alostérica por sodio en GPCR y en receptores opioides | 8 |
| 2.1.3 Selectividad funcional | 10 |
| 2.2 Herkinorina | 11 |
| 2.3 Métodos computacionales en sistemas biológicos | 12 |
| 2.3.1 <i>Docking</i> y Alineamiento flexible de moléculas pequeñas | 12 |
| 2.3.1.1 Alineamiento flexible | 12 |
| 2.3.1.2 <i>Docking</i> | 13 |
| 2.3.2 Dinámicas moleculares y energías libres de unión proteína-ligando | 14 |
| 2.3.2.1 Dinámica Molecular | 14 |
| 2.3.2.2 Cálculos de energía libre alquímicos | 15 |
| 2.3.3 Estudios entre las moléculas de interés y el receptor opioide Mu implementando métodos computacionales | 17 |
| 3. OBJETIVOS | 20 |
| 3.1 Objetivo general | 20 |
| 3.2 Objetivos específicos | 20 |
| 4. METODOLOGÍA | 21 |
| 4.1 Alineamientos flexibles de moléculas pequeñas en MOR | 21 |
| 4.2 <i>Docking</i> de agonistas de MOR | 21 |
| 4.2.1 <i>Docking</i> con MOE | 22 |
| 4.2.1.1 Primer <i>Docking</i> (D1) | 22 |
| 4.2.1.2 Segundo <i>Docking</i> (D2) | 23 |
| 4.2.2 <i>Docking</i> con Molsoft (ICM) | 23 |
| 4.3 Dinámica molecular | 24 |
| 4.3.1 Preparación del receptor | 24 |
| 4.3.1.1 Receptor activado de MOR | 24 |
| 4.3.1.2 Receptor inactivo de MOR | 24 |
| 4.3.2 Ligandos | 25 |
| 4.3.3 Construcción del sistema | 25 |
| 4.3.3.1 Complejo proteína-ligando | 25 |
| 4.3.3.2 Hidratación del bolsillo de unión y del canal interno del receptor | 26 |
| 4.3.4 Producción de la dinámica molecular | 26 |
| 4.4 Cálculos de la energía libre absoluta de la unión proteína-ligando en MOR | 29 |
| 4.4.1 Dinámicas de doble-desacoplamiento | 30 |
| 4.4.2 Restricciones en el sistema receptor-ligando | 30 |
| 4.5 Análisis generales de las dinámicas | 32 |
| 4.5.1 Análisis de modos funcionales (<i>FMA</i>) | 32 |
| 4.5.2 Helicidad | 32 |
| 4.5.3 Ángulos diedros | 32 |
| 4.5.4 Interacción proteína ligando | 32 |
| 4.5.5 Ocupación de moléculas de agua dentro del receptor | 33 |

| | |
|--|------------|
| 5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN | 34 |
| 5.1 Moléculas estudiadas | 34 |
| 5.2 Alineamiento molecular | 34 |
| 5.2.1 Alineamiento de la morfina y naloxona sobre los ligandos cristalográficos de MOR | 36 |
| 5.2.2 Alineamiento de DAMGO y la herkinorina al ligando cristalográfico de MOR en su conformación activa | 38 |
| 5.3 Docking | 39 |
| 5.3.1 <i>Docking</i> de la herkinorina en MOR | 41 |
| 5.3.1.1 Pose D-ICM-1 de la herkinorina en MOR | 43 |
| 5.3.1.2 Pose D-ICM-10 de la herkinorina en MOR | 44 |
| 5.3.2 <i>Docking</i> de DAMGO en MOR. | 50 |
| 5.3.2.1 DAMGO-D-ICM-1 en MOR | 51 |
| 5.3.2.2 DAMGO-D-ICM-2 en MOR | 52 |
| 5.3.2.3 DAMGO-D-ICM-24 en MOR | 53 |
| 5.4 Dinámicas moleculares | 53 |
| 5.4.1 Seguimiento estructural, conformaciones y orientaciones de los complejos receptor-ligando | 55 |
| 5.4.2 Cálculo de la energía libre absoluta para la unión proteína-ligando de los agonistas estudiados en MOR | 61 |
| 5.4.2.1 Volumen del sitio de unión en MOR | 61 |
| 5.4.2.2 Energía libre de unión receptor-ligando para la herkinorina en MOR | 62 |
| 5.4.2.3 Energía libre de unión receptor-ligando para la morfina y naloxona en MOR | 63 |
| 5.4.2.4 Energía libre de unión receptor-ligando para DAMGO en MOR | 64 |
| 5.4.3 Conformaciones de los ligandos en MOR | 68 |
| 5.4.3.1 Elección representativa para DAMGO dentro de MOR | 68 |
| 5.4.3.2 Configuraciones representativas de los sistemas en el receptor activo, interacciones receptor-ligando e interacciones mediadas con moléculas de agua | 73 |
| Contactos receptor-ligando para los sistemas estudiados | 73 |
| Conformaciones y red molecular de aguas en configuraciones de la herkinorina, morfina y naloxona dentro de MOR | 77 |
| 5.4.4 Movimientos importantes en los lazos y hélices transmembranales en la transmisión de señales alostéricas | 80 |
| 5.4.4.1 Fluctuación del esqueleto del receptor (-N-C α -CO-) del receptor mu | 80 |
| 5.4.4.2 Helicidad | 81 |
| Agonismo vs antagonismo | 82 |
| Herkinorina vs morfina y DAMGO | 83 |
| Configuraciones en presencia y ausencia de sodio alostérico | 84 |
| 5.4.4.3 Análisis de modos funcionales (FMA) | 86 |
| FMA para la herkinorina, morfina y DAMGO | 86 |
| FMA entre configuraciones en ausencia y presencia de sodio alostérico para DAMGO y la morfina | 88 |
| 5.4.4.4 Ángulos diedros de las cadenas laterales para aminoácidos importantes en el sitio de unión y en el sitio alostérico del sodio | 89 |
| Aminoácidos en el sitio ortostérico | 89 |
| Aminoácidos en el sitio alostérico | 91 |
| 5.5 Resultados importantes | 93 |
| 6. CONCLUSIONES | 96 |
| 7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 97 |
| 8. ANEXOS | 109 |
| Anexo A | 109 |
| A.1 Alineamiento flexible en MOE | 109 |
| A.2 <i>Docking</i> en Molecular Operating Environment (MOE) | 110 |
| A.2.1 Emplazamiento | 110 |
| A.2.2 Puntaje | 110 |
| A.2.3 Refinamiento | 111 |
| A.3 <i>Docking</i> Molsoft (ICM) | 112 |

| | |
|---|------------|
| A.3.1 Sitio de unión de ICM | 112 |
| A.3.2 Emplazamiento | 112 |
| A.3.3 Puntaje | 113 |
| A.4 Campo de fuerza de CHARMM | 113 |
| A.5 Parámetros para los ligandos desde CHARMM CGenFF. | 113 |
| A.5.1 Herkinorina | 114 |
| A.5.2 Morfina | 117 |
| A.5.3 Naloxona | 120 |
| A.5.4 DAMGO | 122 |
| A.6 Cálculos de energía libre alquímicos | 125 |
| A.6.1 Interacciones desacopladas en los sistemas estudiados | 126 |
| A.6.2 Método de BAR | 129 |
| A.7 Análisis de modos funcionales (FMA) | 130 |
| Anexo B | 132 |
| B.1 Interacciones de ligando-proteína según MOE | 132 |
| B.2 Mutaciones reportadas en el receptor opioide Mu. | 133 |
| Anexo C | 135 |
| C.1 Publicaciones | 135 |
| C.2 Eventos científicos | 135 |
| C.3 Cursos impartidos | 135 |

Tabla de Tablas

| | |
|--|-----|
| Tabla 1. Receptores opioides, localización y sus respuestas farmacológicas | 5 |
| Tabla 2. Cristales resueltos por rayos X del receptor opioide Mu..... | 5 |
| Tabla 3. Aminoácidos en el receptor opioide mu para definir el sitio de unión en MOE. | 22 |
| Tabla 4. Aminoácidos en el receptor opioide mu para definir el sitio de unión en ICM..... | 24 |
| Tabla 5. Etapas y restricciones usadas en el proceso de estabilización de los sistemas en las dinámicas moleculares..... | 29 |
| Tabla 6. Aminoácidos seleccionados en MOR para el cálculo del centro de masa usado en la restricción de la distancia ente proteína y ligando dependiendo del ligando usado..... | 31 |
| Tabla 7. Moléculas estudiadas y referenciadas en este trabajo..... | 35 |
| Tabla 8. Similitud estructural para las moléculas estudiadas en este trabajo..... | 36 |
| Tabla 9. Interacciones proteína-ligando calculadas desde MOE para la morfina, naloxona después del alineamiento flexible con sus referencias cristalográficas BU72 y β -FNA de MOR..... | 38 |
| Tabla 10. Interacciones proteína-ligando para DAMGO y la herkinorina después del alineamiento flexible, respecto de su referencia en MOR, BU72..... | 40 |
| Tabla 11. La salvinorina A, interacciones importantes para su selectividad sobre KOR y estudio en MOR..... | 45 |
| Tabla 12. Interacciones proteína-ligando calculadas desde MOE para las poses de la herkinorina seleccionadas en este trabajo..... | 49 |
| Tabla 13. Comparación entre las posiciones provistas por alineamiento flexible o docking (azul celeste) frente a las posiciones finales luego de 200 ns de dinámica molecular (naranja)..... | 57 |
| Tabla 14. Volumen del bolsillo de unión para cada sistema y configuración de los ligandos estudiados mediante la energía libre química dentro del receptor opioide mu..... | 65 |
| Tabla 15. Energía libre química para las uniones receptor-ligando de los sistemas estudiados en MOR..... | 66 |
| Tabla 16. Componentes principales seleccionados, PCs, para la construcción del análisis de modos funcionales, FMA, del movimiento del esqueleto de MOR en los sistemas del ligando DAMGO..... | 73 |
| Tabla 17. Valores estimados para la probabilidad de contactos en el tiempo entre el ligando y aminoácidos de MOR que estaban a menos de 4.0 Å de distancia cada 0.5 ns durante los 200 ns de la dinámica..... | 76 |
| Tabla 18. Número de componentes principales, PCs, usados para construir el análisis de modos funcionales, FMA, sobre el movimiento del esqueleto de MOR en los sistemas y configuraciones seleccionados como representativos..... | 86 |
| Tabla A- 1. Parámetros del grado de asignación de las densidades de propiedad..... | 110 |
| Tabla B- 1. Listado de mutaciones en los aminoácidos importantes en el receptor opioide Mu..... | 133 |

Tabla de Figuras

| | |
|---|----|
| Figura 1. Receptor opioide Mu y aminoácidos importantes. A) MOR en su estado activo (verde) e inactivo (azul) mostrando las siete hélices transmembranales nombradas como (TMs). B) Aminoácidos relevantes en el sitio de unión con agonistas/antagonistas visto desde la parte extracelular. | 6 |
| Figura 2. Esquema general de la regulación en GPCR ejemplificadas con dos tipos de agonistas selectivos. Se muestra al estado inactivo (PDBID 4DKL, azul), estado activo (PDBID 5C1M, verde), la subunidad alfa Gi (desde PDBID 1GG2), arrestina (desde PDBID 4ZWJ) y agonistas (etiquetados como 1 o 2). El paso de señalización debido al acoplamiento del receptor con la proteína G de membrana son representados como “paso de señalización A”. La señalización debida al acoplamiento con las arrestinas se nombró “paso de señalización B”. En esencia el agonista 1 no promueve el reclutamiento de β -arrestina mientras el agonista 2 sí lo hace. El agonista 2 genera internalización pero no el agonista 1. | 9 |
| Figura 3. Múltiples procesos en la cascada de señalización de MOR que pueden generarse por la unión de un agonista. Dependiendo del agonista unido se puede activar uno o un número de estos pasos generando un mecanismo selectivo en la señalización. $G_{av/o}$ representa la unión con la proteína G de membrana, GRK a la unión de cinasas que se unen a estos tipos de receptores y β -Arr a la unión con las arrestinas. | 9 |
| Figura 4. Ejemplificación del mapeo energético de las conformaciones de una proteína en la que la unión con agonistas selectivos de la señalización produce diferentes mapeos energéticos favoreciendo distintos caminos en la actividad, “selectividad funcional” (Kenakin, 2011). | 10 |
| Figura 5. Comparación estructural entre el producto natural salvinorina A y su análogo herkinorina. La diferencia substancial se encuentra en la presencia del sustituyente en el C2-benziloxi en la herkinorina. | 11 |
| Figura 6. Ciclo termodinámico para el cómputo de la energía libre absoluta alquímica ($\Delta G_{Unión}^{0 \rightarrow 1} = \Delta G_{Proteína}^{0 \rightarrow 1} - \Delta G_{Agua}^{0 \rightarrow 1}$). Representados en dos sistemas en el que el ligando se acopla/desacopla rodeado de moléculas de agua (ΔG_{Agua}) y otro acoplando/desacoplando en un complejo proteína-ligando ($\Delta G_{Proteína}$). Los superíndices indican hacia que lugar toma sentido las interacciones en donde el “0” representa el estado del ligando no interactuante y “1” al ligando interactuando totalmente con el sistema. | 16 |
| Figura 7. Diagrama de flujo de las metodologías realizadas sobre las moléculas estudiadas. | 21 |
| Figura 8. Etapas de la construcción de los sistemas para el cálculo de dinámicas moleculares en MOR. En donde 1, es la etapa de preparación del receptor activo o inactivo. 2, etapa de hidratación del canal interno en los receptores activo e inactivo. 3, etapa de preparación del ligando. 4, composición de la membrana lipídica usada. 5 y 6, son las etapas de solvatación y los iones añadidos al sistema. | 27 |
| Figura 9. Validación del campo de fuerza de moléculas orgánicas pequeñas de CHARMM (CGenFF). (A) Mostrándose en equilibrio durante 4 ns la posición de las moléculas de clorhidratado de la morfina en su empaque cristalino. (B) Y la tendencia del volumen de la celda $1630 \pm 169 \text{ \AA}^3$ comparable al experimental de $1515.04 \pm 0.09 \text{ \AA}^3$ (Gelbrich et al., 2012). | 28 |
| Figura 10. Alineamiento flexible para la morfina y naloxona. Los resultados de la morfina (A) y naloxona (B) son coloreados en verde frente a su referencia específica en MOR, BU72 y β FNA (naranja), respectivamente. | 37 |
| Figura 11. Alineamiento flexible para DAMGO y la herkinorina. Los resultados en DAMGO (A y B) y la herkinorina (C y D) son coloreados en verde, respecto de la referencia en MOR, BU72 (naranja). Las figuras B y D muestran los aminoácidos en donde se solapan DAMGO y la herkinorina al pasar los límites de contacto. | 39 |
| Figura 12. Validación del docking a través ligandos cristalográficos. De BU72 realizado en ICM (A). Para β -FNA en ICM (B). De BU72 hecho en MOE desde el resultado D2-A (C). Y β -FNA desde MOE desde el resultado D2-A (D). El color verde representa a las coordenadas originales del ligando cristalográfico, el azul resultado del docking y naranja es sustituyente que se une covalentemente al aminoácido K233 ^{5,39} de β -FNA en el receptor inactivo. | 41 |
| Figura 13. Estructuras superpuestas que recibieron los mejores puntajes de calificación en los estudios de docking en MOR para de la herkinorina usando los programas ICM y MOE. Mostrándose a la herkinorina-D-ICM-1 (azul) y la herkinorina-MOE-D2-S (naranja). | 41 |
| Figura 14. Comparación estructural entre BU72 (A), la salvinorina A (B) y la herkinorina (C). | 42 |
| Figura 15. Comparación del resultado de docking de la herkinorina-D-ICM-1 con modelos cercanos. (A) Contactos de la salvinorina A en MOR por Bartuzi y colaboradores (Bartuzi et al., 2015). (B) Contactos de la salvinorina A en KOR por Polepally y colaboradores (Polepally et al., 2014). (C) Interacciones del ligando BU72 con la proteína calculadas desde MOE. (D) Ubicación de herkinorina-D-ICM-1 en MOR (azul) con referencia a las coordenadas del ligando BU72 del cristal (gris). (E) Aminoácidos de contacto de la herkinorina-D-ICM-1 desde interacciones proteína-ligando por MOE. Para conocer el tipo de interacción en 2D ver Anexo B. | 46 |
| Figura 16. Comparación del resultado de docking de la herkinorina-D-ICM-10 frente a modelos cercanos. (A) Contactos de salvinorina A en KOR por Yan y colaboradores (Yan et al., 2005). (B) Contactos de la salvinorina A en KOR por Kane y | |

| | |
|---|-----------|
| colaboradores (Kane et al., 2006). (C) Interacciones del ligando BU72 con la proteína calculadas desde MOE. (D) Ubicación de la herkinorina-D-ICM-10 en MOR (naranja) con referencia a las coordenadas del ligando BU72 del cristal (gris). (E) Aminoácidos de contacto de la herkinorina D-ICM-10 desde interacciones proteína-ligando por MOE. Para conocer el tipo de interacción en 2D ver Anexo B..... | 47 |
| Figura 17. Modelo de unión putativo de un análogo de la salvinorina A con el sustituyente 3-piridil de un carbonilo α-β-insaturado en C2 sobre MOR (Polepally et al., 2014) | 49 |
| Figura 18. Orientación de las poses del docking de DAMGO en MOR. (A) DAMGO-D-ICM-1, (B) DAMGO-D-ICM-2, (C) DAMGO-D-ICM-24 y (D) DAMGO-MOE-DI-A. | 51 |
| Figura 19. Contactos proteína-ligando predichos por MOE de la pose DAMGO-D-ICM-1. Para conocer el tipo de interacción en 2D ver Anexo B. | 52 |
| Figura 20. Contactos proteína-ligando predichos por MOE de la pose DAMGO-D-ICM-2 en MOR. Para conocer el tipo de interacción en 2D ver Anexo B. | 52 |
| Figura 21. DAMGO-D-ICM-24 y referentes cristalográficos. (A) Contactos de DAMGO en la conformación D-ICM-24 en MOR. (B) Comparación entre DAMGO en MOR (gris) y DIPP-NH₂ en DOR (4RWA, violeta). El mapa de interacción se muestra en el Anexo B. | 53 |
| Figura 22. RMSD calculado para el esqueleto (-N-Cα-CO-) de MOR y para cada ligando en su sistema. Las letras A, C, E, G e I representan el RMSD del esqueleto del receptor para el sistema de la morfina, herkinorina, naloxona y DAMGO, respectivamente. Las letras B, D, F, H y J representan el RMSD del ligando para el sistema de la morfina, herkinorina, naloxona y DAMGO, respectivamente. El aumento del RMSD del esqueleto del receptor en la naloxona puede deberse a que el lazo ICL3 tiene una alta fluctuación (ver figura 34). Los RMSD están referidos al punto inicial de los 200 ns de la dinámica molecular luego de las etapas de equilibrio. | 59 |
| Figura 23. Disposición del ion Na⁺ en las dinámicas de la morfina y naloxona en MOR. La morfina (gris), la naloxona (naranja) y el emplazamiento del grupo C2-benzoiloxi de la herkinorina-D-ICM-1 (cian)..... | 60 |
| Figura 24. Comportamiento de la herkinorina en sus poses D-ICM-1 (A) y D-ICM-10 (B) dentro de MOR. Los 200 ns se representan por el cambio de color la ubicación de la herkinorina en el receptor, en donde, una coloración verde se usó para las ubicaciones en el inicio de la dinámica, blanco para las de la mitad de la dinámica y azules para las ubicaciones finales. | 61 |
| Figura 25. Perfil de los valores acumulados de la energía libre en función de lambda por el análisis BAR. Para A. Herkinorina, B. Morfina, C. Naloxona y D. DAMGO. Las líneas gris y naranja representan la activación de las interacciones de Vdw y electrostáticas, respectivamente. Los valores están divididos por kT y son adimensionales. | 67 |
| Figura 26. Perfil energético de las interpolaciones entre estados consecutivos usando el método de BAR, para el acoplamiento de la herkinorina-D-ICM-1 y la herkinorina-D-ICM-10 en sus sistemas proteicos y el acoplamiento de la estructura de la herkinorina en un sistema de aguas. Las líneas gris y naranja representan la activación de las interacciones de Vdw y electrostáticas, respectivamente. | 67 |
| Figura 27. Puntos finales de la dinámica de 200 ns para las configuraciones de DAMGO dentro de MOR. (A) D-ICM-1, (B) D-ICM-24, (C) D-ICM-1+Na⁺, (D) D-ICM-2 y (E) D-ICM-24+Na⁺. | 69 |
| Figura 28. Segundo ángulo diedro (χ_2) de la cadena lateral del aminoácido W293 en MOR. El ángulo (χ_2) está formado por los átomos -Cα-Cβ-Cγ-Cδ- de dicho aminoácido. | 70 |
| Figura 29. Frecuencias observadas para los contactos entre las configuraciones de DAMGO y aminoácidos de MOR con menos de 4.0 Å de distancia. Cada circunferencia representa un 20 % de probabilidad de contacto en el tiempo, aumentando de adentro hacia afuera. | 71 |
| Figura 30. FMA de las configuraciones de DAMGO. Para las poses: A) D-ICM-1. B) D-ICM-1+Na⁺. C) D-ICM-2. D) D-ICM-24. E) D-ICM-24+Na. Los colores verde, blanco y azul representan el movimiento donde verde se refiere a movimientos correlacionados con valores bajos de RMSD y tiempos iniciales de las dinámicas, azul al movimiento en valores altos de RMSD correspondientes a tiempos finales de la dinámica y el blanco es un intermedio entre los anteriores. | 72 |
| Figura 31. Frecuencias observadas para los contactos a menos de 4.0 Å del ligando en el receptor opiode mu. (A) Contactos para las configuraciones de la herkinorina-D-ICM-1, morfina+Na⁺, naloxona+Na⁺ y DAMGO-D-ICM-24+Na⁺. (B) Comparación de contactos para la morfina en presencia y ausencia de sodio alostérico. (C) Comparación para DAMGO-D-ICM-24 en presencia y ausencia de sodio alostérico. Cada circunferencia representa un 20 % de probabilidad de contacto en el tiempo, aumentando de adentro hacia afuera..... | 75 |
| Figura 32. Colocación de los ligandos en MOR con énfasis en puentes y contactos mediados por moléculas de aguas. A) Herkinorina-D-ICM-1. B) Naloxona. C) Morfina+Na⁺. D) Morfina (-Na⁺). E) DAMGO-D-ICM-24+Na⁺. E) DAMGO-D-ICM-24 (-Na⁺). Cuando se indica +Na⁺ o -Na⁺ se refiere a en presencia o ausencia de sodio alostérico, respectivamente. | 78 |
| Figura 33. Probabilidad de encontrar moléculas de agua en 200 ns dentro del sitio activo de MOR en los sistemas seleccionados como relevantes. El análisis de cavidades internas y de ocupación de agua dentro de MOR, a través del | |

programa *trj_cavity*, genera cavidades en el receptor que pueden variar en tamaño y frecuencia respecto a cada punto de la dinámica. Así, se puede encontrar por ejemplo una cavidad pequeña que no perdure y en la que no se encuentren moléculas de agua (zonas rojas) y cavidades grandes o pequeñas que son más frecuentes en la dinámica y en las cuales se encuentre presencia de moléculas de agua (zonas rosas, blancas y azules). 80

Figura 34. RMSF calculado para los sistemas de MOR y los ligandos más relevantes. Los puntos de fluctuación importantes están enumerados y representados sobre la estructura de MOR del respectivo sistema receptor-ligando..... 81

Figura 35. Persistencia de la helicidad medida como porcentajes en el tiempo de simulación para las hélices transmembranales y en los lazos importantes de MOR, calculado para los sistemas seleccionados como relevantes...... 85

Figura 36. Modelos para el movimiento del esqueleto de MOR identificados desde el análisis de modos funcionales para: A. Herkinorina-D-ICM-1, B. Morfina+Na⁺, C. Naloxona (+Na⁺), D. Morfina (-Na⁺), E. DAMGO-D-ICM-24+Na⁺ y F. DAMGO-D-ICM-24 (-Na⁺). Los colores verde, blanco y azul representan el movimiento donde verde se refiere a movimientos correlacionados con valores bajos de RMSD e inicios de la dinámica, azul al movimiento en valores altos de RMSD correspondientes a tiempos finales de la dinámica y el blanco es un intermedio entre los anteriores. 87

Figura 37. Distribución en la dinámica molecular de los ángulos diedros de las cadenas laterales de los aminoácidos involucrados en el sitio de unión ortostérico del receptor opiode mu, en los sistemas representativos. 90

Figura 38. Distribución en la dinámica molecular de los ángulos diedros de las cadenas laterales de los aminoácidos involucrados en el sitio alostérico del sodio en el receptor opiode mu, para los sistemas representativos. 93

Figura A-1. Ciclo termodinámico para el cómputo de la energía libre absoluta alquímica ($\Delta G_{Unión}^{0 \rightarrow 1} = \Delta G_{Proteína}^{0 \rightarrow 1} - \Delta G_{Agua}^{0 \rightarrow 1}$). Representados en dos sistemas en el que el ligando se acopla/desacopla rodeado de moléculas de agua (ΔG_{Agua}) y otro acoplado/desacoplado en un complejo proteína-ligando ($\Delta G_{Proteína}$). Los superíndices indican hacia que lugar toma sentido las interacciones en donde el “0” representa el estado del ligando no interactuante y “1” al ligando interactuando totalmente con el sistema. 125

Figura A-2. Interacciones acopladas/desacopladas para el sistema receptor opiode mu y ligando herkinorina. A) Representa el estado donde no hay interacciones vistas con potenciales entre átomos no enlazantes. B) Representa el estado donde se acoplan las interacciones de V_{vdw} vistas con potenciales V_{vdw} entre átomos de cada grupo del sistema. B) Representa el evento de acoplar las interacciones electrostáticas vistas como potenciales V_{Elec} entre átomos de cada grupo del sistema, todo esto luego de que están acoplados todos los V_{vdw} 127

Figura A-3. Etapas en el acoplamiento de las interacciones tipo Van der Waals (V_{dw}) y electrostáticas ($Elec$) en el complejo receptor-ligando de los sistemas representativos. Desde $0 \leq Etapa \leq 20$ los potenciales que representan las interacciones de V_{dw} son acoplados ($0 \leq \lambda_i \leq 1$), mientras que los potenciales de interacciones $Elec$ se encuentran apagados ($\lambda_j = 0$). Para $20 \leq Etapa \leq 40$ se acoplan los potenciales que representan las interacciones $Elec$ ($0 \leq \lambda_j \leq 1$), mientras los potenciales de interacciones de V_{dw} se encuentran encendidos ($\lambda_i = 1$). A) Es la configuración de herkinorina-D-ICM-1. B) Morfina+Na⁺. Y C) DAMGO-D-ICM-24 sin sodio alostérico. 128

Figura B- 1. Tipos de interacciones que se computan en el cálculo de proteína-ligando del programa MOE. 132

Lista de Abreviaturas

| | |
|-------|--|
| BAR | Bennett acceptance ratio |
| DAMGO | Tyr-D-Ala-Gly-N-Me-Phe-Gly-ol |
| DOR | Receptor opioide delta |
| CHL | Colesterol |
| ewMCM | Movimiento máximamente correlacionado del ponderado del ensamble |
| FMA | Análisis de modos funcionales |
| GPCR | Receptores acoplados a proteína-G |
| ECL | Lazo extracelular |
| ICL | Lazo intracelular |
| ICM | Modelamiento molecular basado en mecánica de coordenadas interna (Molsoft) |
| KOR | Receptor opioide kappa |
| MCM | Movimiento máximamente correlacionado |
| MOE | <i>Molecular Operating Environment</i> |
| MOR | Receptor opioide mu |
| OR | Receptor opioide |
| PC | Componente principal |
| PCA | Análisis de componentes principales |
| RMN | Resonancia magnética nuclear |
| GRK | Cinasa de receptor acoplado a proteína-G |
| TM | Hélice transmembranal |
| RMSD | <i>Root mean square deviation</i> |
| RMSF | <i>Root mean square fluctuation</i> |
| POPC | 1-palmitoil, 2-oleoil-sn-glicero-3-fosfolina |
| POPE | 1-palmitoil-2-oleoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina |

RESUMEN

La modulación de receptores opioides es una de las principales estrategias para el alivio del dolor causado por distintas afecciones. Estudios recientes se basan en estructuras obtenidas por difracción de rayos X. Algunos agonistas de estos receptores no contienen las características estructurales de los ligandos previamente conocidos. En particular, la herkinorina no tiene un nitrógeno básico en su estructura, en contraste con los opioides como la morfina. La afinidad de la herkinorina hacia el receptor opioide μ , no reclutamiento de arrestinas, no internalización del receptor en la célula y el hecho de que puede disminuir efectos adversos, hace interesante su estudio. Por este motivo, nos dimos a la tarea de encontrar un modo de unión para la herkinorina observando diferencias en interacciones respecto de la morfina y DAMGO, agonistas que pueden causar una baja o alta internalización, usando métodos de alineamientos flexibles, *docking* molecular, dinámicas moleculares y cálculos de energías libres de unión químicas entre receptor y ligando. Los sistemas proteína-ligando en las dinámicas y en el cálculo de la energía están conformados por moléculas de aguas, membrana e iones representados explícitamente, lo que hace al sistema más real. Los resultados obtenidos muestran que la herkinorina emplaza un grupo sustituyente en el sitio alostérico del ion sodio cercano al aminoácido D114 ubicado en la segunda hélice transmembranal, el cual está implicado en la vía de señalización del receptor, esto difiere a lo observado para la morfina y DAMGO. Así, se dan algunas bases para explicar la selectividad de señales dentro del receptor opioide μ y recomendaciones en la búsqueda de nuevas moléculas basadas en la estructura del receptor capaces de modular distintos sitios en el receptor además del ortostérico.

Palabras claves: interacción proteína-ligando, *docking*, dinámica molecular, energía libre química, receptor opioide μ , herkinorina, selectividad funcional.

1. INTRODUCCIÓN

Los moduladores de receptores opioides tienen impacto sobre aspectos importantes en la salud pública, por un lado son el principal mecanismo para el tratamiento del dolor en condiciones neuropáticas, inflamación, post-operación y cáncer. Por otro, lado están implicados en la modulación de comportamientos y emociones. El uso de estos compuestos ha llegado a ser un problema de salud pública debido a efectos secundarios como la tolerancia, dependencia y adicción. Se han encontrado que mecanismos de desensibilización e internalización del receptor en la célula son pasos previos a la dependencia. Analgésicos con menos efectos secundarios han sido un sueño para los científicos en este campo de búsqueda. Las mejoras para entender estos mecanismos de acción han dado nuevas estrategias para el diseño de moléculas selectivas y más potentes, sin embargo falta mucho por conocer.

La determinación de algunas estructuras en estados activos o inactivos de la superfamilia de receptores acoplados a proteínas G (GPCR) se ha incrementado hasta el presente, entre ellos están los receptores opioides. Esto ayuda a obtener mejor información sobre los mecanismos de acción y señalización de los modulares de los GPCR. Para el caso del receptor opioide mu (MOR), principal en la mediación del dolor fueron determinadas sus estructuras activa e inactiva, unidas a un agonista y antagonista, respectivamente. También, el campo de la resonancia magnética nuclear (RMN) ha aportado información de movimientos de hélices transmembranales que están presentes en los receptores de esta superfamilia. Estudios de mutagénesis en el receptor y mediciones de afinidades de moléculas que interactúan con los receptores opioides se han llevado a cabo para hallar las disposiciones de los grupos estructurales de los ligandos. Otros en la parte bioquímica, biofísica y de modelado también van aportando información relevante que complementa, sustenta y predice la forma de cómo funcionan los mecanismos de señalización.

Para el caso de modelado molecular a través de la dinámica molecular de estos receptores, se debe tener claro incluir una membrana de bicapa lipídica que simule la membrana celular dejando un ambiente lo más cercano a las condiciones normales en la célula. Además, métodos computacionales tendrán que estar sujetos a algún parámetro experimental que lo avale, lo cual llega a ser un problema para procedimientos como el acoplamiento (*docking*) de moléculas dentro del receptor debido a funciones de puntaje que intentan predecir afinidades o por lo menos clasificar de una manera correlacionada a lo encontrado experimentalmente. Las estructuras de rayos X facilitan la vía de estudios de modos de la unión entre receptor y ligando, suponiendo que estructuras similares a los ligandos cristalográficos pueden generar uniones homólogas a los ligandos cristalográficos. El problema aparece cuando las moléculas son muy diferentes y sólo hay conocimientos previos sobre algún análogo del ligando de interés. Por esto, métodos implementando dinámica molecular y cálculos de la energía libre química son usados, éstos tienen en cuenta componentes explícitos del sistema y pueden predecir valores más precisos con referencia a datos experimentales, comenzando a discriminar mejor las orientaciones de las moléculas en el sitio de unión dentro de una proteína.

En la modulación de MOR se encuentran algunos ligandos interesantes respecto a la selectividad y a la activación de vías de señalización. Seleccionándose para el trabajo las moléculas más relevantes. Entre ellas la herkinorina la cual es una molécula que difiere en una gran medida a la estructura de opioides con esqueleto tipo morfina. Pocos estudios del posicionamiento de la herkinorina dentro de MOR han sido hechos pero no son concluyentes en su modo de unión. El gran interés es que la herkinorina es una molécula agonista funcionalmente selectivo que genera selectivamente la actividad canónica del receptor

opioide mu, pero no permite que pueda reclutar arrestinas o que se internalice el receptor en el citoplasma de las células. Por otro lado, se encuentra una molécula nombrada como DAMGO la cual es un péptido agonista selectivo que en cierta forma puede generar internalización del receptor. La información más concluyente sobre la posible orientación experimental está dada por un antagonista del receptor opioide delta (DOR), el resto se basa en ensayos por mutagénesis de aminoácidos relevantes y quelación de metales como Zn^{2+} en MOR. Así, una correcta ubicación de estas moléculas en el receptor y estudios del comportamiento de dicho receptor aportaría conocimiento sobre la modulación. Otras moléculas incluidas en el estudio son la morfina y la naloxona, estas estructuras son un agonista y un antagonista de MOR, sus características estructurales son similares a las de los ligandos en los cristales de MOR lo que permite una fácil ubicación dentro del receptor. La morfina por una parte genera una baja internalización del receptor pero tiene una marcada desensibilización experimentalmente hablando, además de servir de una rápida referencia por los demás estudios que se han hecho sobre MOR. Por otro lado, la naloxona al ser un antagonista y ser muy estudiado en MOR sirve como referente del estado inactivo del receptor.

En este trabajo se realiza un estudio computacional sobre las moléculas herkinorina, DAMGO, morfina y naloxona enfocándonos en cálculos de dinámica molecular y de energías libres de unión sobre MOR, proponiendo modos de uniones razonables y comparables a las energías experimentales de unión, que además incluyen la región alostérica importante en la modulación de MOR, la cual es encontrada dependiente de la presencia de sodio en algunos ligandos agonistas. Con esto se tiene base para observar, soportar y dar indicios de procesos estructurales dentro del receptor opioide mu con diferentes tipos de agonistas antes de que las señales se generen.

2. ANTECEDENTES

2.1 Receptores opioides y Receptor opioide Mu

El sistema de receptores opioides (ORs, por sus siglas en inglés) controla el dolor, la recompensa y la adicción en los seres humanos y algunos animales; los ORs pertenecen a la superfamilia de receptores acoplados a las proteínas G (GPCR), clase A (también llamados tipo rodopsina), su estructura terciaria está formada por siete dominios transmembranales, ubicando su cadena N-terminal en la parte extracelular y la C-terminal en la zona intracelular. La comparación de secuencias de los GPCRs clase A llevó a encontrar motivos conservados, como el segmento DRY de la tercera hélice transmembranal (TM3) y el NPxxY ubicado en la séptima hélice transmembranal (TM7). Los GPCRs se caracterizan por unirse a proteínas G heterotriméricas, las cuales constan de subunidades llamadas α , β y γ (Massotte *et al.*, 2005). El efecto biológico de los ORs, por ejemplo, su efecto analgésico está relacionado con su distribución en el cuerpo humano. Los OR están ampliamente distribuidos en el cerebro, como también se pueden encontrar en el tallo cerebral, la columna vertebral, en el intestino y en neuronas periféricas. Cuatro principales subtipos de receptores opioides: Mu (μ , MOR), Delta (δ , DOR), Kappa (κ , KOR) y ORL1 (*Opioid receptor like-1*), así como sus genes, han sido caracterizados a nivel celular, molecular y farmacológico (Al-Hasani *et al.*, 2011; Chen *et al.*, 1993; Dhawan *et al.*, 1996; Yasuda *et al.*, 1993).

Para ayudar en la nomenclatura y ubicación de los aminoácidos en los GPCRs Ballesteros y Weinstein crearon un método en donde se seleccionan los motivos más conservados en cada uno de los siete dominios (TMs) que son identificados por la relación evolutiva de estas proteínas y se les asigna un valor de 50 a cada uno de ellos, acompañados por el número en el dominio en el que se ubica. Luego se enumeran los aminoácidos de cada dominio conforme avanza la secuencia, limitados a pasar por el número 50 del aminoácido conservado. Así, por ejemplo en la TM3 el aminoácido R165 es el más conservado y le corresponde el valor de 3.50, mientras que el residuo D147 del mismo dominio le corresponde el número 3.32 (Ballesteros *et al.*, 1995). Para una rápida identificación se nombrarán como R165^{3.50} y D147^{3.32}; puede omitirse el número correspondiente al aminoácido para generalizar dentro de la familia como R^{3.50} o D^{3.32}.

Las moléculas que interactúan con ORs son clasificadas como ligandos agonistas, agonistas parciales, agonista-antagonista y antagonistas. Los agonistas activan al receptor opioide generando acciones de respuesta como analgesia, euforia, dependencia física, etc. Un ejemplo es la morfina, alcaloide fenantreno del opio que actúa como agonista de MOR, siendo el analgésico más importante de la medicina contemporánea. Los agonistas parciales tienen una eficacia reducida (actividad máxima) en los pasos de señalización respecto a la eficacia de los agonistas totales. Los agonistas-antagonistas pueden ser agonistas bajo una condición o antagonistas bajo otra condición sobre un receptor, o sencillamente ser un antagonista para un receptor y ser una antagonista para otro receptor cercano estructuralmente al primero. Finalmente un antagonista es aquel que causa una actividad contraria a la que puede activar un agonista (Atanasov *et al.*, 2013). La Tabla 1 resume las principales respuestas fisiológicas debidas a la interacción de ligandos con MOR, DOR y KOR (Fine *et al.*, 2004).

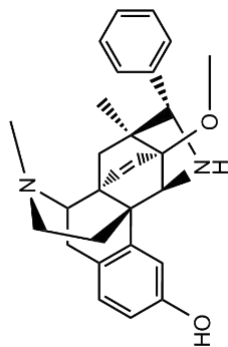
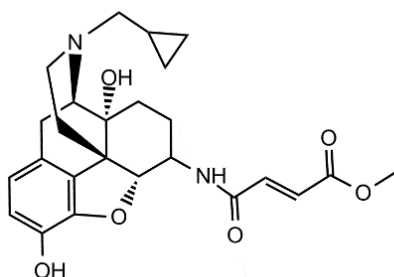
Tabla 1. Receptores opioides, localización y sus respuestas farmacológicas

| Receptor | Localización en el SNC | Respuesta |
|----------|--|---|
| μ | Cerebro (lamina III y IV de la corteza, tálamo y sustancia gris central), medula espinal (sustancia gelatinosa). | Analgesia supraespinal, dependencia física. |
| κ | Cerebro (hipotálamo, sustancia gris central y claustrum), medula espinal (sustancia gelatinosa). | Analgesia espinal, sedación, miosis, la inhibición de la liberación de la hormona antidiurética |
| δ | Cerebro (núcleo pontino, amígdala, bulbos olfatorios y corteza profunda) | Analgesia, euforia, dependencia física. |

(Fine *et al.*, 2004)

Tabla 2. Cristales resueltos por rayos X del receptor opioide Mu.

| PDBID | Ligando co-cristalizado | Interacciones importantes |
|-------|----------------------------|---|
| 4DKL | β -FNA (antagonista) | D147 ^{3.32} (interacción iónica), Y148 ^{3.33} (Puente de hidrógeno), K233 ^{5.39} (Enlace covalente con el ligando), M151 ^{3.36} , I296 ^{6.51} , H297 ^{6.52} (mediada por dos moléculas de agua), V300 ^{6.55} , W293 ^{6.48} , Y326 ^{7.43} |
| 5C1M | BU72 (agonista) | H54 (ubicado en el extreme N-terminal), V143 ^{3.28} , D147 ^{3.32} (interacción iónica), Y148 ^{3.33} (mediada por una molécula de agua), M151 ^{3.36} , K233 ^{5.39} (desde el esqueleto del receptor mediada por una molécula de agua), V236 ^{5.42} , W293 ^{6.48} , I296 ^{6.51} , H297 ^{6.52} (mediada por dos moléculas de agua), V300 ^{6.55} , W318 ^{7.35} , I322 ^{7.39} , Y326 ^{7.43} |



En años recientes fueron reportadas las estructuras tridimensionales de MOR en su forma inactiva y activa, obtenidas por cristalografía de rayos-X. Los correspondientes códigos identificadores en la base de datos de proteínas PDB (*Protein data bank*) son 4DKL y 5C1M (Figura 1). La estructura inactiva de MOR fue co-cristalizada con un antagonista llamado β -funaltrexamina (β -FNA) que se une de forma covalente al residuo K2335.39 (resolución 2.8 Å). Mientras que el ligando co-cristalizado con MOR en el estado activo fue el agonista BU72 (obtenida con mejor resolución 2.1 Å), esta estructura cristalina se logró gracias a la incorporación de un nano cuerpo (Nb39) en la parte intracelular del receptor, la cual homologa a las proteínas G. El éxito de la metodología para lograr la cristalización de estos receptores radica en la estabilidad debida a la unión con las proteínas G. Los dos ligandos co-cristalizados con MOR tienen un esqueleto cíclico tipo morfina y sus interacciones principales con dicho receptor se enlistan en la Tabla 2. Las diferencias principales entre el receptor opioide inactivo y activo se encuentran en TM6 con un movimiento de ~10 Å hacia afuera del receptor, en TM7 con un movimiento moderado hacia el interior del receptor y en TM5 acercándose a TM6 (Huang *et al.*, 2015; Manglik *et al.*, 2012). Movimientos que también podían apreciarse para la rodopsina en su forma activa e inactiva.

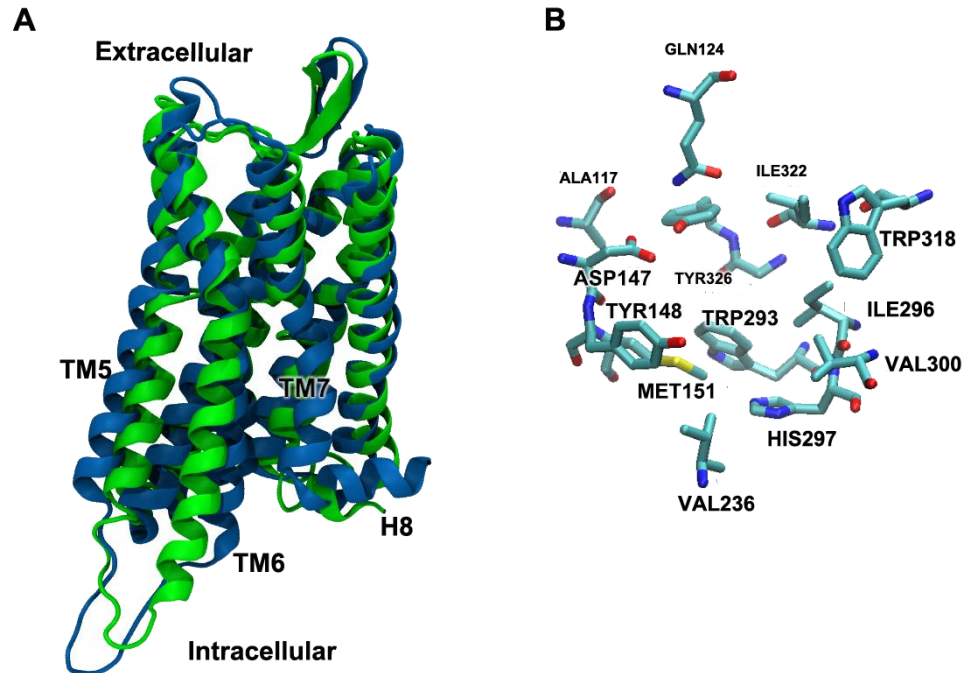


Figura 1. Receptor opioide Mu y aminoácidos importantes. A) MOR en su estado activo (verde) e inactivo (azul) mostrando las siete hélices transmembranales nombradas como (TMs). B) Aminoácidos relevantes en el sitio de unión con agonistas/antagonistas visto desde la parte extracelular.

2.1.1 Conceptos de tolerancia, desensibilización e internalización en receptor opioide Mu

Los receptores opioides, particularmente MOR, son el principal blanco terapéutico para el control de dolor agudo, crónico y post-operatorio. Sin embargo, el desarrollo de tolerancia, dependencia y adicción dificultan su uso clínico (Tsao *et al.*, 2000; Williams *et al.*, 2013), esto conduce a que la prescripción de estos medicamentos debe realizarse bajo estricta vigilancia médica. La tolerancia se define como el estado en el cual un organismo deja de responder al efecto de una droga, esto lleva a que se requiera una dosis cada vez más alta para alcanzar el mismo efecto. La adicción es definida como un daño cerebral crónico y recurrente que es caracterizado por la búsqueda y uso compulsivo de una droga, a pesar de tener conocimiento de sus dañinas consecuencias. Se considera una enfermedad o daño cerebral porque las drogas cambian la estructura y función del cerebro. Los cambios en el cerebro pueden ser duraderos y pueden llevar al comportamiento dañino observado en personas adictas a las drogas. La dependencia por su parte, se refiere al estado en el que un organismo funciona en forma normal solamente en presencia de la droga, la remoción abrupta de la droga se manifiesta como un disturbio físico que puede incluir sudoración, enrojecimiento de la piel, vomito, ansiedad, insomnio y dolor muscular.

Es difícil encontrar mecanismos celulares claros que den explicación a la tolerancia, uno de estos que puede estar asociado parcialmente es la internalización de MOR en el citoplasma (Figura 2). Esta hipótesis se basa en que la internalización disminuye la disponibilidad de los receptores a la estimulación por agonistas (Zastrow *et al.*, 2003). Estudios *in vitro* del cambio negativo de la señalización de MOR en un tratamiento largo con agonistas pueden sustentar la idea (Elliott *et al.*, 1997; L. C. S. Purington, 2011). Además, estudios de fluorescencia y microscopia confocal han mostrado que MOR se internaliza en el citoplasma de la célula (Alvarez *et al.*, 2002). Agonistas como DAMGO y fentanil producen una alta internalización de MOR (Alvarez *et al.*, 2002; Zastrow *et al.*, 1993), mientras la morfina no genera internalización en condiciones normales (Keith *et al.*, 1996; Sternini *et al.*, 1996). Sin embargo, se ha observado que la morfina puede disminuir la señalización de MOR, lo que resultaría en tolerancia.

Lo sucedido con la morfina y otros ligandos, los cuales no inducen una fuerte internalización de MOR, puede explicarse por un proceso llamado desensitización (Figura 3), el cual es un conjunto de cambios moleculares en niveles de la señalización del receptor (Lefkowitz *et al.*, 1983; Williams *et al.*, 2013), que pueden ser de tipo homólogos (en el que se engloba a la reducción del efecto cuando un agonista actúa en un receptor específico) o heterólogo (reducción del efecto cuando el agonista actúa en otros receptores que comparten un componente de la cascada de señalización). Esto hace que los agonistas generen bajos niveles de señalización (Rozenfeld *et al.*, 2007; Sharma *et al.*, 1975). Se piensa que la desensibilización es precursor en la tolerancia (Rozenfeld *et al.*, 2007).

La internalización y la desensitización pueden tratar de explicarse con estudios donde se muestran las capacidades de ligandos agonistas para reclutar estructuras moleculares intracelulares como las fosfatasa, quinasas y arrestinas (Zastrow *et al.*, 2003; J. Zhang *et al.*, 1998; L. Zhang *et al.*, 1996). Para el caso de la morfina y DAMGO la diferencia en la capacidad de internalización del receptor se ha explicado con la fosforilación hecha por cinasas de receptores acoplados a proteínas G (GRK) sobre la treonina T370 y la serina S375 del extremo C-terminal ubicado en la parte intracelular en MOR (Doll *et al.*, 2011). En la que DAMGO promueve esta fosforilación en T370 y S375, catalizada por GRKs 2 y 3, generando reclutamiento de las β -arrestinas 1 y 2 y una fuerte internalización posiblemente por el secuestro debido a estas arrestinas. Esto precede y puede ser un paso a la tolerancia. Por el contrario, la morfina induce la fosforilación de S375 catalizada por GRK5 que puede inducir pobremente el reclutamiento de

β -arrestina2 pero no la β -arrestina1 (Doll *et al.*, 2012; Chad E. Groer *et al.*, 2011). A pesar de esto DAMGO puede volver a ganar actividad cuando el receptor esta desensibilizado (resensibilización, Figura 2) antes de que se produzca la internalización, mientras la morfina no logra recuperar la actividad cuando su receptor se encuentra desensibilizado (Dang *et al.*, 2004; Koch *et al.*, 2008; Koch *et al.*, 1998). Por lo que se ha propuesto que la activación del camino GRK5 puede contribuir a la analgesia y a la tolerancia *in vivo* en la morfina (Doll *et al.*, 2012).

La internalización puede suceder por dos mecanismos translocación y endocitosis, la diferencia es que la endocitosis recubre al receptor con parte de la membrana y lo lleva a dentro de la célula, mientras la traslocación no usa dicha envoltura lipídica. Experimentalmente, la endocitosis puede impedirse a baja temperatura dejando evidente el mecanismo de translocación. Se ha encontrado que la morfina no promueve la translocación mediada por β -arrestina2 de MOR, por el contrario DAMGO si lo hace. Pero, cuando se sobre expresa a GRK2 en las células HEK-293, la morfina, esta vez sí puede inducir la translocación del receptor hacia el interior de la célula (C. E. Groer *et al.*, 2007). También, la señalización mediada por las arrestinas se le ha atribuido efectos adversos incluyendo tolerancia, supresión respiratoria y constipación (Bohn *et al.*, 2000; Bohn *et al.*, 1999; Raehal *et al.*, 2005).

A pesar del conocimiento que se tiene, no se puede explicar completamente las manifestaciones clínicas de la tolerancia, por estar presente en sistemas muy completos y complejos con plasticidad en los mecanismos; como se muestra en las Figuras 2 y 3 (Christie, 2008; Williams *et al.*, 2013).

2.1.2 Modulación alostérica por sodio en GPCR y en receptores opioides

Un hallazgo relevante en los GPCRs de clase A es el descubrimiento de un sitio de unión alostérico conservado que aloja un ion sodio, (Katritch *et al.*, 2014), el cual está implicado en muchas funciones fisiológicas (W. Liu *et al.*, 2012). Los primeros experimentos en indicar un posible sitio de unión para el sodio en esta clase de receptores encontraron una modulación negativa para las uniones agonistas para receptores opioides, mientras que no afectan la afinidad para el agonista. Lo que servía para diferenciar agonistas de antagonistas (Pert *et al.*, 1973; Snyder *et al.*, 2003). Posteriormente, se observó que la mutación en el residuo conservado D2.50 en los GPCR tiene significancia en el efecto de dependencia del sodio ya mencionado. Además, mutantes en D2.50 por aminoácidos no cargados reducen la señal generada dependiente del ligando para algunos GPCRs, sugiriendo que el ion sodio puede influir en la transducción de las señales (movimiento de señales desde fuera de la célula hacia dentro) en este tipo de receptores.

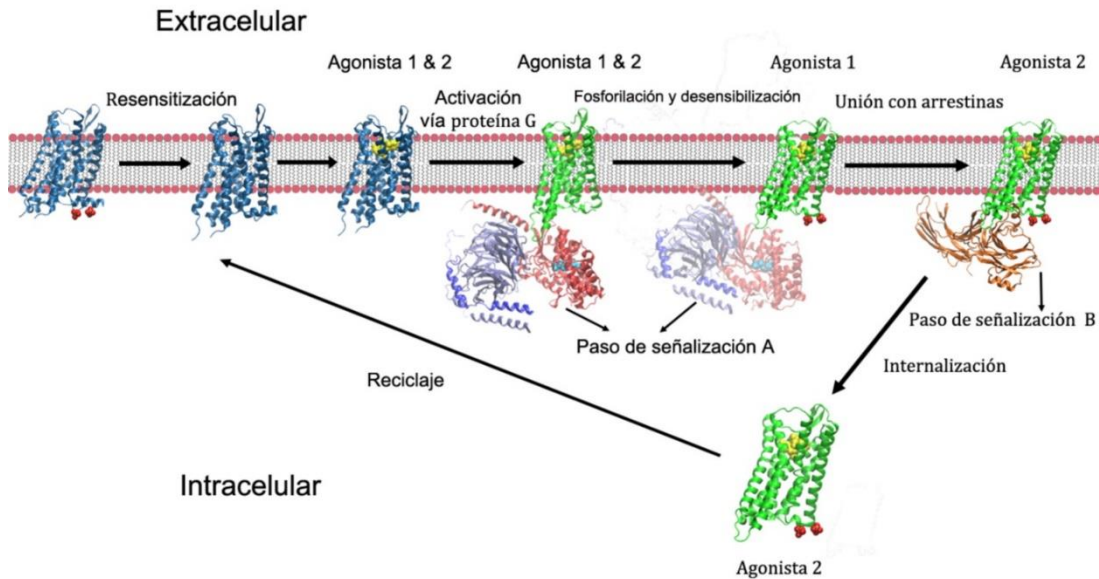


Figura 2. Esquema general de la regulación en GPCR ejemplificadas con dos tipos de agonistas selectivos. Se muestra al estado inactivo (PDBID 4DKL, azul), estado activo (PDBID 5C1M, verde), la subunidad alfa G_i (desde PDBID 1GG2), arrestina (desde PDBID 4ZWJ) y agonistas (etiquetados como 1 o 2). El paso de señalización debido al acoplamiento del receptor con la proteína G de membrana son representados como "paso de señalización A". La señalización debida al acoplamiento con las arrestinas se nombró "paso de señalización B". En esencia el agonista 1 no promueve el reclutamiento de β -arrestina mientras el agonista 2 sí lo hace. El agonista 2 genera internalización pero no el agonista 1.

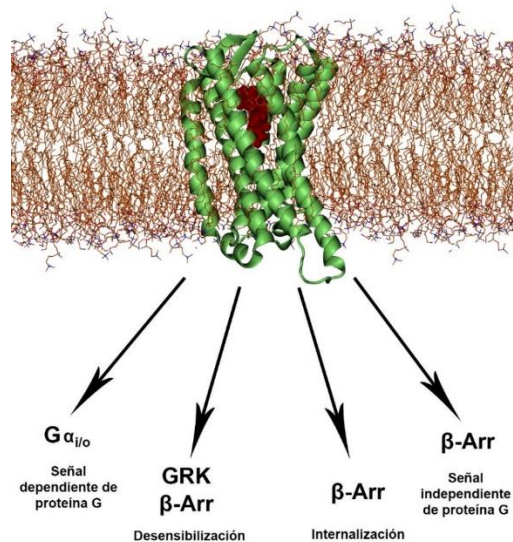


Figura 3. Múltiples procesos en la cascada de señalización de MOR que pueden generarse por la unión de un agonista. Dependiendo del agonista unido se puede activar uno o un número de estos pasos generando un mecanismo selectivo en la señalización. $G_{\alpha i/o}$ representa la unión con la proteína G de membrana, GRK β -Arr a la unión de cinasas que se unen a estos tipos de receptores y β -Arr a la unión con las arrestinas.

El receptor de adenosina A_{2A} en su conformación inactiva fue una de las primeras estructuras de GPCRs resueltas por cristalografía de rayos X en alta resolución (1.8 Å). En dicha estructura se observa un conglomerado de moléculas formado por un ion sodio, moléculas de agua y amino ácidos muy conservados en las hélices TM2 y TM3 como D^{2.50} y S^{3.39} (W. Liu *et al.*, 2012). Posteriormente, la estructura en alta resolución (1.8 Å) de DOR en su conformación inactiva, permitió encontrar densidad electrónica correspondiente a un átomo de sodio en dicho sitio alostérico, revelando que N^{3.35} también es un aminoácido importante (Fenalti *et al.*, 2014). Más aún, la mutación N^{3.35}V reduce y la N^{3.35}A anula el efecto del sodio alostérico sobre la unión de los ligandos, aumentando en ambos casos la señalización mediada por arrestina en estudios en DOR. Ambas mutaciones no afectan la señalización canónica mediada por proteína G de membrana, lo cual sugiere que este ion afecta la unión de las β-arrestinas y que el efecto sobre la señalización mediada por proteína G pueda depender de un ligando y una mutación en específico. Por lo tanto, se ha sugerido que el sodio actúa como un efectivo interruptor en los diferentes caminos de la señalización de GPCRs (Fenalti *et al.*, 2014).

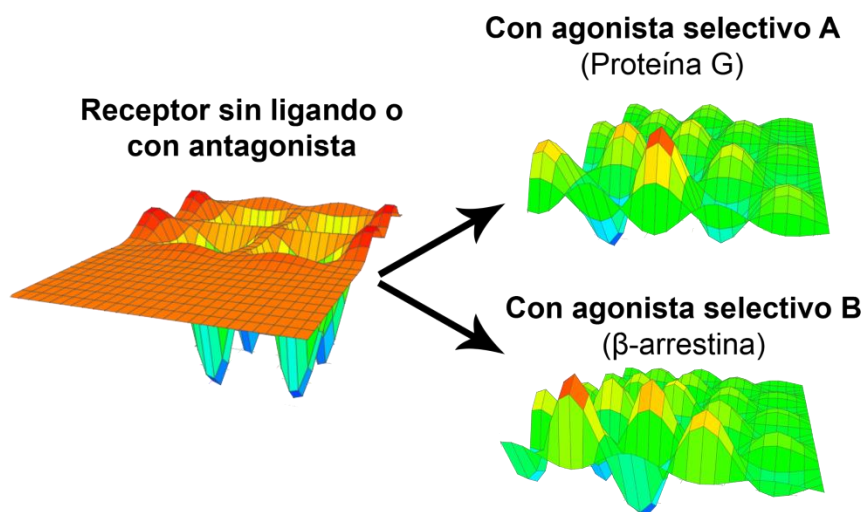


Figura 4. Ejemplificación del mapeo energético de las conformaciones de una proteína en la que la unión con agonistas selectivos de la señalización produce diferentes mapeos energéticos favoreciendo distintos caminos en la actividad, “selectividad funcional” (Kenakin, 2011).

2.1.3 Selectividad funcional

Como comenta Kenakin (Kenakin, 2011), si representamos al receptor en un mapa energético con todas sus posibles conformaciones, entonces un ligando que se una al receptor puede alterar energéticamente las conformaciones y atravesar por nuevos mapas energéticos y por lo tanto tomar partida en nuevos comportamiento funcionales (H. Ongun Onaran *et al.*, 1997; H. O. Onaran *et al.*, 2000). Experimentos han mostrado que diferentes ligandos pueden estabilizar diferentes conformaciones del receptor, desvaneciendo la idea de hay una solo estado del receptor activado en el agonismo (Kenakin *et al.*, 2010). Así, un mecanismo que describe la selectividad funcional para un agonista sería en la forma de estabilización de conformaciones específicas dependientes del ligando que va a interactuar selectivamente, acoplándose con proteínas celulares para inducir la activación de procesos de señalización (Kenakin,

2005). En la Figura 4 se muestra un ejemplo mostrando un GPCR y dos vías de señalización que pueden mediarse por estos receptores.

2.2 Herkinorina

Salvia divinorum es una planta usada en prácticas ancestrales por los indígenas de la Sierra Mazateca del estado de Oaxaca para producir experiencias alucinógenas (Valdés *et al.*, 1983). El compuesto activo aislado de esta planta, la salvinorina A, es un diterpeno de tipo neoclerodano (Ortega *et al.*, 1982) altamente selectivo para KOR y el primero en conocerse que no tiene un átomo de nitrógeno básico en su estructura. Este hallazgo marcó una nueva era en el campo de los receptores opioides, ya que previo a esto se pensaba que la interacción de un grupo amino cargado positivamente con la cadena lateral del aminoácido D^{3.32} en la hélice TM3 era esencial para en el reconocimiento de receptores opioides.

Durante la generación de análogos de la salvinorina A se encontró una molécula a la cual se le cambió el grupo acetiloxi de la salvinorina A por un grupo benziloxi. Dicho análogo fue nombrado como herkinorina (Figura 5), [(2S,4aR,6aR,7R,9S,10aS,10bR)-9-(benzoiloxi)-2-(3-furanil)dodecahidro-6a,10b-dimetil-4,10-dioxo-2H-nafto-[2,1-c]piran-7-ácido carboxílico metil éster] (Harding *et al.*, 2005). Este cambio resultó en la caída de afinidad hacia KOR (K_i 90 nM frente 1.9 nM de la salvinorina A), una mejor afinidad para DOR (K_i 1170 nM frente 5790 nM) y una marcada mejora en la afinidad hacia MOR (K_i 12 nM vs >1000 nM). Además, la actividad medida en los tres receptores mediante los ensayos con [³⁵S]-GTP γ S (GTP se une al complejo de proteína G para generar señal) encuentra que la herkinorina pierde actividad respecto a la salvinorina A en KOR (EC_{50} 1320 nM vs 40 nM), sin actividad en DOR e inesperadamente fue agonista en MOR (EC_{50} 500 nM). Así, se obtuvo el primer agonista de MOR carente de un átomo de nitrógeno básico en su estructura.

En estudios posteriores se encontró que la herkinorina conduce a muy poca fosforilación, no recluta β -arrestina2 y no es un buen internalizador, aun si se sobre expresa GRK2, quien sí logra que la morfina internalice al receptor cuando dicha cinasa es sobre expresada (C. E. Groer *et al.*, 2007). Además, un dato relevante es que la salvinorina A, ha mostrado que induce internalización de KOR en la célula (Al-Hasani *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2005), mientras la herkinorina no lo hace con MOR, indicando modos de unión muy distintos en los dos receptores. Agonistas que no inducen interacción entre el receptor y β -arrestina2 o subsecuentes internalizaciones son candidatos terapéuticos prometedores ya que podrían disminuir efectos secundarios no deseados.

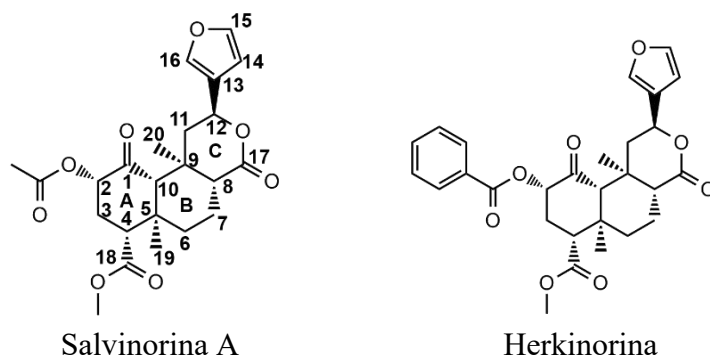


Figura 5. Comparación estructural entre el producto natural salvinorina A y su análogo herkinorina. La diferencia substancial se encuentra en la presencia del sustituyente en el C2-benziloxi en la herkinorina.

2.3 Métodos computacionales en sistemas biológicos

Los sistemas biológicos son tan complejos que pueden interactuar generando diversos comportamientos coherentes, selectivos y multifuncionales en los seres vivos. A pesar de que la biología molecular ha logrado descubrir multitud de hechos tales como secuencias genómicas o propiedades en proteínas, no ha llegado por sí sola a interpretar dichos sistemas, ya que no resultan ser puramente intuitivos. Así, una combinación de aproximaciones experimentales y computacionales es necesaria para resolver las dudas (Kitano, 2002).

La biología computacional es la disciplina llamada en estos casos. Ésta puede implementarse de dos formas: la primera, basándose en el descubrimiento desde el conocimiento (minería de datos), extrayendo los patrones ocultos desde información experimental masiva almacenada en bases de datos, dejando hipótesis como resultados. Y la segunda en análisis basados en simulaciones los cuales ponen a prueba las hipótesis con experimentos *in silico* dando predicciones que pueden ser verificadas con estudios *in vitro* o *in vivo* (Kitano, 2002).

Por otra parte, lo anterior se conecta con el diseño racional de fármacos, su optimización y generación de tratamientos. En donde sus primeras etapas se basa en diseñar ligandos que tengan un efecto deseado sobre un objetivo molecular, en el entendimiento de la unión a este objetivo mediante la búsqueda de interacciones que forman un sitio de unión específico y en la determinación afinidades entre el ligando y el objetivo. En todo caso intentando controlar las incertidumbre de los procedimientos para generar buenas predicciones (Kuntz, 1992; Lawrenz, 2011).

Métodos computacionales aplicados comúnmente en dichas disciplinas son búsquedas por similitud, cribado virtual de alto rendimiento, modelos de farmacóforo, modelos QSAR, acoplamiento moleculares automatizados (*docking*), simulaciones moleculares, entre otros (Sakkiah *et al.*, 2012).

2.3.1 *Docking* y Alineamiento flexible de moléculas pequeñas

2.3.1.1 Alineamiento flexible

Esta herramienta es comúnmente utilizada para hacer búsquedas y comparaciones con base a similitud estructural, la cual hace puntajes de características estructurales análogas, por ejemplo grupos funcionales. Para comenzar el análisis por similitud estructural en tres dimensiones es necesario que las moléculas bajo estudio estén alineadas respecto a una molécula de referencia. Es ahí donde programas como Molecular Operating Environment (MOE) utilizan métodos de alineamiento de moléculas pequeñas, en este caso un alineamiento flexible basado en la *densidad de probabilidad de características* de una molécula dada, detallado en el anexo A (Labute *et al.*, 2001).

El alineamiento flexible ha sido implementado como una herramienta en la ubicación inicial de tetra péptidos agonistas de KOR, con cerca de 22 enlaces rotables, en su sitio alostérico (tratamiento *pre-docking*) para una posterior búsqueda conformacional del sistema involucrando aminoácidos importantes, con base a campos de fuerzas y modelos de solvatación continuos. Esto debido a que el método de *docking* usado no logró obtener una conformación razonable y coherente con la información de la literatura mientras que el alineamiento si lo hizo (Martinez-Mayorga, 2013). Estudios de *docking* sencillos y rápidos de moléculas con un alto número de enlaces rotables (mayor de 10) no logran abarcar una búsqueda lo suficientemente exhaustiva para encontrar modos de unión adecuados (López-Vallejo *et al.*, 2012;

Yongye *et al.*, 2010). Explicado porque el número de enlaces rotatable (grados de libertad conformacionales) incrementa el número de conformeros requeridos para representar su espacio conformacional. La exploración entonces del espacio conformacional utilizando métodos computacionales puede llegar a ser una tarea difícil y consume tiempo. Lo cual es cierto si la búsqueda comienza lejos del sitio de unión. Indicando la importancia de puntos de partidas de *docking* cerca del sitio de unión (Joung *et al.*, 2012). Así, el alineamiento de moléculas pequeñas puede darse como puntos de partidas en estudios de modelado posteriores.

2.3.1.2 Docking

Los estudios de *docking* son ampliamente utilizados para sugerir modos de unión de moléculas de interés y/o para la selección de compuestos que se llevaran a ensayos biológicos. El estudio consiste en dos etapas de cálculo: la primera, la búsqueda de los posibles modos de unión en el sitio de interés de la macromolécula, usando *algoritmos de muestreo*. la segunda etapa, es el puntaje calculado para cada modo de unión de la molécula, utilizando funciones de puntaje (X.-Y. Meng *et al.*, 2011).

Algoritmos de emplazamiento y funciones de puntaje han sido recopilados en revisiones de la literatura (X.-Y. Meng *et al.*, 2011). Destacándose lo siguiente:

Algunos algoritmos de emplazamientos pueden ser de tipo algoritmos de correspondencia (*matching algorithms*) basados en la forma del ligando en la proteína usando características de forma e información química, algoritmos de construcción incremental (*incremental construction*) basados en la fragmentación del ligando entre sus enlaces rotatables, emplazando un primer fragmento para luego añadir los fragmentos restantes incrementalmente, algoritmos desde métodos de Monte Carlo emplazando de forma estocástica al ligando con base a rotaciones de enlaces y rotación/traslación de cuerpo rígido, algoritmos genéticos basados en métodos estocásticos, dinámicas moleculares basada en el progreso en pequeñas etapas del movimiento del sistema teniendo problemas en barreras conformacionales energéticas altas y siendo eficaces en optimizaciones locales (más refinamiento luego de otros emplazamientos). Ejemplos con base en los programas usados se encuentran en el anexo A.

Las funciones de puntaje pueden ser basadas en campos de fuerzas, funciones basadas en extensiones a los campos de fuerza, funciones empíricas construidas ajustando los coeficientes que acompañan los términos de la energía respecto de complejos a los que se le conoce bien su energía de unión, funciones basadas en el conocimiento construidas para favorecer contactos preferidos y penalizar interacciones repulsivas o funciones de consenso de puntajes (*consensus scoring*) el cual combina varias funciones de puntaje. Pueden encontrarse más funciones de puntaje, algunos ejemplos están en los *docking* de ICM y MOE del anexo A.

La primera etapa, el emplazamiento, conduce generalmente a modos de unión razonables aunque en algunos casos se usan refinamientos para mejorar la orientación y conformación usando métodos de emplazamiento mejores que los anteriores (refinamientos). Sin embargo, la etapa de puntaje tiene un margen de error mayor para el *docking* tradicional, la diferencia entre los valores de puntaje obtenidos no permite discernir entre modos de unión de una molécula o la afinidad de una molécula respecto de otra. En el caso de búsqueda virtual basada en *docking* tradicional, la falla de los métodos de puntaje conduce a falsos positivos o falsos negativos (Brenk *et al.*, 2006). Por lo tanto, se hace evidente la necesidad de tratamientos más rigurosos para los cálculos de la energía de unión proteína-ligando y su afinidad. En algunos casos se recalcula el puntaje (re-puntaje) considerando funciones de puntajes mejores a las

anteriores con términos de energía más explícitos como términos a los puentes de hidrógeno, desolvatación, entropía, etc. Cuando se requiere la comparación de pocas moléculas (del orden de 5 comparado con los cientos o miles de moléculas en estudios de *docking* tradicional) es posible realizar cálculos de energía libre usando moléculas de aguas explícitas en simulaciones de dinámicas moleculares. Estos cálculos son computacionalmente más demandantes ya que incluyen muestreos de los movimientos del sistema pero permiten una estimación muy cercana a los valores experimentales y por ende, permiten discernir entre modos de unión estructuralmente equivalentes pero energéticamente distinguibles (Boyce *et al.*, 2009).

2.3.2 Dinámicas moleculares y energías libres de unión proteína-ligando

2.3.2.1 Dinámica Molecular

La energía de una molécula hablando a niveles atómicos es más precisa calculada desde la mecánica cuántica resolviendo un Hamiltoniano $H\Psi = E\Psi$. Muy usado en el estudio de geometrías y reactividad de las moléculas (Friesner *et al.*, 1998). Sin embargo, el uso de dinámica molecular (Mecánica Molecular) la cual trata el movimiento de las moléculas de una forma clásica, gana terreno en sistemas y en escalas de tiempos biológicamente relevantes. Ésta trata a los átomos enlazados como esferas cargadas conectadas con resortes armónicos dependientes del tipo de conexión y para los átomos no enlazados están correlacionados a través de interacciones vistas como fuerzas van der Waals y electrostáticas. Todo genera un campo de fuerza, *force field* (Karplus *et al.*, 2002; Lawrenz, 2011; Paquet *et al.*, 2015). En el anexo A se encuentra un ejemplo de un campo de fuerza.

Las fuerzas ∇U_i pueden ser computadas por ejemplo por movimientos de Newton para cada átomo i con una posición r y masa m_i .

$$-\nabla U_i = m_i \frac{d^2 r_i}{dt^2} \quad (2.1)$$

La ecuación 2.1 es integrada numéricamente obteniendo velocidades y posiciones en etapas de tiempos a través de posibles diferentes algoritmos (Grubmüller *et al.*, 1991). Donde se usan condiciones periódicas de frontera (PBC) para simular la fase del agregado molecular, *bulk* (H. Zhao *et al.*, 2008). Llevados en ensambles con moléculas y temperatura constantes, volumen constante (NVT) o presión constante (NPT), presión y volumen son controlados a través de ajustes dinámicos del tamaño de celda unitaria y re-escalando las coordenadas atómicas (Feller *et al.*, 1995). Mientras para controlar la temperatura el sistema es conectado a un baño térmico virtual que puede remover energía cuando sea necesario (Evans *et al.*, 1985). Como se menciona en dinámicas de Langevin la integración numérica y el control de la temperatura se hacen en el mismo momento a través de una fuerza de fricción disipadora y de la fuerza aleatoria R , resolviendo la ecuación 2.2 (Feller *et al.*, 1995; Paquet *et al.*, 2015).

$$-\nabla U_i - \gamma \frac{dr_i}{dt} + R(t) = m_i \frac{d^2 r_i}{dt^2} \quad (2.2)$$

Donde $-\nabla U_i$ es la fuerza del átomo i , el término $-\gamma \frac{dr_i}{dt}$ una fuerza de fricción, γ es una frecuencia de colisión, m_i es la masa del átomo i , r_i es la ubicación del átomo i y $R(t)$ es una fuerza aleatoria obtenida desde un tipo de distribución Gaussiana.

Si se asume una buena descripción del sistema, la hipótesis ergódica de la ecuación 2.3, mantiene a un observable el tiempo suficiente para proporcionar una probabilidad de distribución en el equilibrio.

$$\bar{A}_t = \langle A \rangle_{ensemble} \quad (2.3)$$

En este sentido la probabilidad de distribución del observable en los métodos de cálculo de energía libre alquímicos es seguida a lo largo de coordenadas de reacción especiales (λ) que puede dejar la energía libre de enlace entre proteína-ligando.

2.3.2.2 Cálculos de energía libre alquímicos

Se basan en *transformaciones alquímicas* porque en esencia es la realización del sueño inaccesible de los alquimistas de transmutar la materia (Chipot *et al.*, 2007).

Esto puede convertir una molécula en otra y determinar una energía relativa entre dos sistemas. O simplemente llevar a una molécula de una fase a otra pudiendo calcularse energías absolutas.

Con base a lo recopilado por Gilson y colaboradores (Gilson *et al.*, 1997) se dice que los cálculos describen una aproximación en el cual un sistema, pasa a través de una serie de intermediarios no físicos para poder calcular la diferencia de energía libre entre dos estados físicos relevantes.

El método de doble-desacoplamiento para el cálculo de la energía libre absoluta (Figura 6) usa dos sistemas, uno donde el ligando se encuentra con la proteína y otro en el que se encuentra libre rodeado de moléculas de agua, los dos sistemas se unen a través de un ciclo termodinámico. El método hace modificaciones al ligando a través de parámetros λ generando una especie de coordenada de reacción en cada sistema. Al final de ciclo se está llevando el ligando del sistema con la proteína hasta un sistema sólo con agua.

Las modificaciones (λ) del hamiltoniano del sistema son hechas a los átomos del ligando variando términos de la energía potencial del campo de fuerza usado (ver anexo A). Para el caso de métodos de doble-desacoplamiento, los términos del ligando que son escalados en etapas sucesivas hasta cero son los correspondientes a los no enlazantes entre el ligando y el entorno (van der Waals y electrostáticas) transformando al ligando en una molécula no interactuante. Para el desacoplamiento del ligando en la proteína se tiene un estado con el ligando unido a la proteína y otro estado no unido a la proteína (Figura 6). Según el ciclo termodinámico es necesario desacoplar una segunda vez dejando un estado rodeado de moléculas de agua para llevarlo a un estado no interactuante.

Las energías libres pueden corresponder energía libre de Helmholtz cuando se usa un ensamble NVT o energía libre de Gibbs para el ensamble NPT (Y. Meng *et al.*, 2011). En este último caso con la diferencia de energía entre el sistema donde el ligando se desacopla de la proteína ($\Delta G_{proteina}$) y el sistema donde el ligando se desacopla de un medio acuoso (ΔG_{Agua}) podrá obtenerse la energía libre de unión proteína-ligando ($\Delta G_{Unión}$).

Hay métodos en los cuales se puede encontrar la diferencia entre dos estados de cada sistema, pero dan un pobre acercamiento de la energía si, por ejemplo, no hay un solapamiento entre ellos.

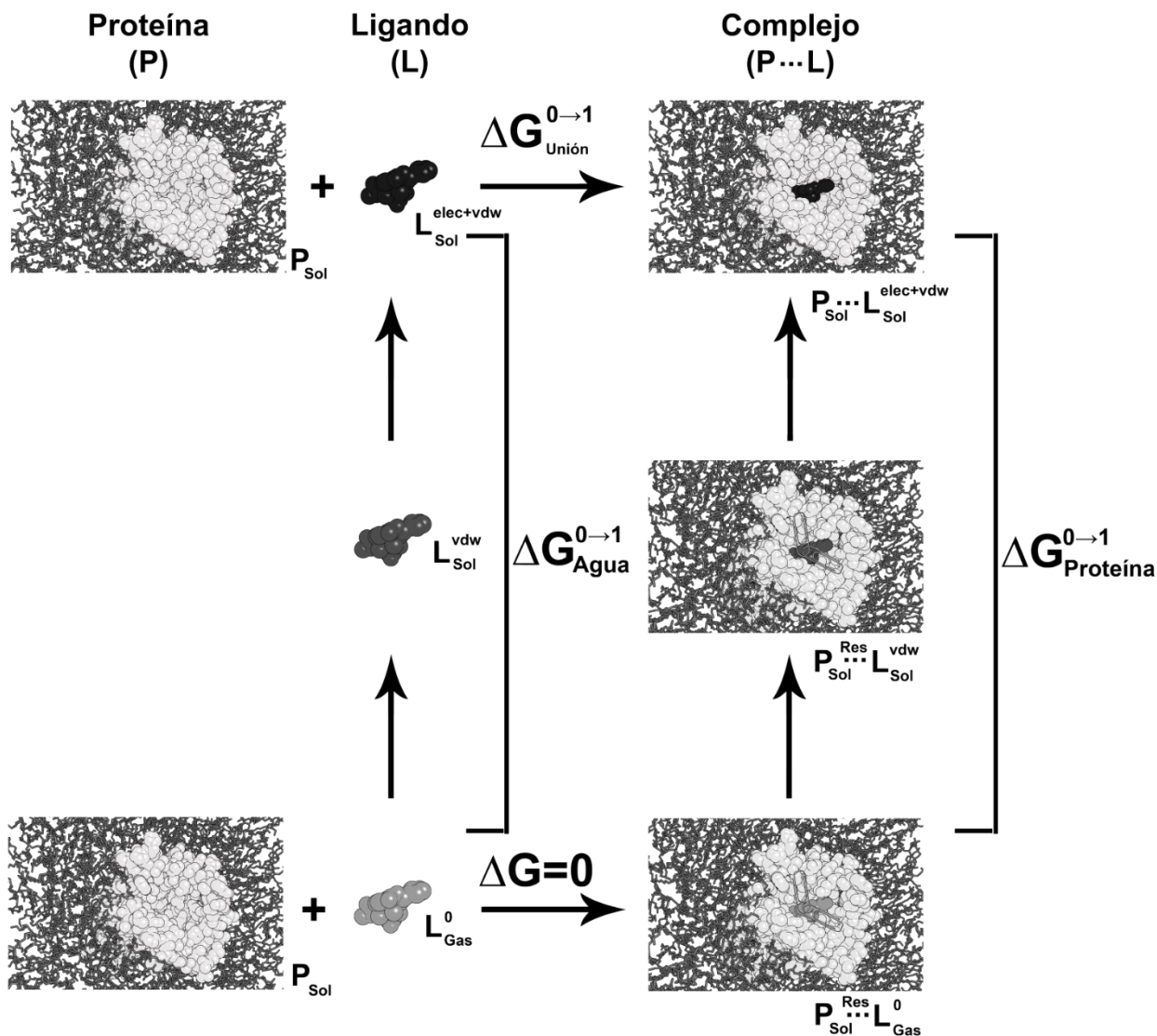


Figura 6. Ciclo termodinámico para el cómputo de la energía libre absoluta alquímica ($\Delta G_{Unión}^{0 \rightarrow 1} = \Delta G_{Proteína}^{0 \rightarrow 1} - \Delta G_{Agua}^{0 \rightarrow 1}$). Representados en dos sistemas en el que el ligando se acopla/desacopla rodeado de moléculas de agua (ΔG_{Agua}) y otro acoplado/desacoplado en un complejo proteína-ligando ($\Delta G_{Proteína}$). Los superíndices indican hacia que lugar toma sentido las interacciones en donde el “0” representa el estado del ligando no interactuante y “1” al ligando interactuando totalmente con el sistema.

Como el estado interactuante y el no interactuante, en cada uno de los dos sistemas, están alejados y no presenta solapamiento entre sí, hace que se requieran estados intermedios, λ_i , cercanos uno del otro hasta conectar los estados extremos. El método comúnmente usado para el cómputo de la energía libre de un sistema, teniendo todos los intermedios, es llamado el *Bennett Acceptance Ratio*, BAR (Bennett, 1976; Klimovich *et al.*, 2015).

2.3.3 Estudios entre las moléculas de interés y el receptor opioide Mu implementando métodos computacionales

Estudios computacionales realizados en MOR y demás receptores opioides están enfocados en modos de unión, modelos QSAR, modelos del farmacóforo, sitios alostéricos, cálculos energéticos, entre otros. En este apartado nos enfocaremos en estudios de *docking* molecular, alineamiento, dinámicas moleculares y energía libre con moléculas de aguas explícitas. Las moléculas abordadas son la morfina, DAMGO, herkinorina y naloxona, las cuales son la parte central de este trabajo.

Herkinorina.

La herkinorina es una molécula interesante por su propiedad de no causar reclutamiento de las arrestinas e internalización del receptor. Estudios de *docking* clásicos de la herkinorina han sugerido modos de unión en MOR haciendo comparaciones con su análogo estructural, la salvinorina A, el cual es un ligando agonista selectivo para KOR, del que se tiene mucha más información experimental. Distintos modos de unión de la salvinorina A se han propuesto, los primeros usando modelado molecular proponen que el grupo furano presente en su estructura, según los datos experimentales encontrados, está orientado hacia el residuo Y^{7.43} de KOR, en la parte central del receptor (Kane *et al.*, 2006; Vortherms *et al.*, 2007; Yan *et al.*, 2005). Mientras que algunos otros modos de unión usando *docking* molecular proponen que la salvinorina A, tanto en KOR como en MOR, emplazaría al grupo furano hacia la parte extracelular, ubicando a los grupos sustituyentes de las posiciones C2 y C4 de su estructura hacia la parte central del receptor (Bartuzi *et al.*, 2015; Polepally *et al.*, 2014). Sin embargo, la orientación de este grupo C2 y C4 en modelos que parecen llevar esta última idea de orientación de la molécula, no encuentran una convergencia hacia residuos en específicos. En uno de estos últimos modelos (de los pocos en la literatura), la salvinorina A sirve como plantilla y comparación para el *docking* de la herkinorina dentro de MOR (Bartuzi *et al.*, 2015). Ahora, también se pueden hacer observaciones desde análogos de la salvinorina A como comparación, a quienes se le conoce su afinidad hacia MOR, KOR y DOR y sus modos de unión propuestos (Polepally *et al.*, 2014).

La dinámica molecular de la herkinorina usando como plantilla la orientación de la salvinorina A en MOR, indica que es posible que la herkinorina pueda estar en el sitio ortostérico (zona en la que normalmente se fija un ligando en la proteína) y no modular de una manera puramente alostérica en MOR (Bartuzi *et al.*, 2015). Sin embargo, en dicho trabajo la elección de la *pose* inicial dentro de MOR se basó en la cercanía del grupo benziloxi con el aminoácido C321^{7.38}, importante para algunos análogos sulfurados de la salvinorina A (Yan *et al.*, 2009). Así, la posición final de la herkinorina en la dinámica ancló al grupo benziloxi entre los aminoácidos W318^{7.35} y Y299^{6.54}. A pesar de los estudios realizados aún no es claro como puede ser el modo de unión para la salvinorina A, lo que deja un campo un poco más complicado para la correcta ubicación de la herkinorina dentro de MOR.

DAMGO.

DAMGO (Tyr-D-Ala-Gly-N-Me-Phe-Gly-ol), el cual es un péptido agonista selectivo para MOR, se ha estudiado usando dinámicas moleculares de agonistas y antagonistas selectos. Las ubicaciones de DAMGO en MOR generalmente se escogen desde *docking* clásico, aunque hay emplazamientos basados en estudios de farmacóforo y afinidades evaluadas por mutagénesis. Estos modelos han resaltado la importancia de la interacción iónica de la amina cuaternaria con el grupo aspartato D147^{3.32}. Además, el

grupo fenol de DAMGO se ubica en una forma *cis* respecto a su cadena principal, interaccionando principalmente con el residuo H297^{6.52}, hipótesis generada por relación entre estudios de quelación de zinc en histidinas y mutagénesis del aminoácido (Bartuzi *et al.*, 2015; Shim *et al.*, 2013). A pesar de que esta misma configuración de DAMGO se relaciona con un antagonista tipo péptido cristalizado con DOR (Fenalti *et al.*, 2015), las dinámicas con DAMGO muestran elevada variación de su conformación respecto de la inicial, vista a través de su RMSD estructural y del cambio en ángulos diedros selectos, sugiriendo que la flexibilidad de DAMGO dificulta los estudios.

Un estudio reciente de dinámica molecular mostró la influencia del sodio alostérico en D114^{2.50} en presencia de moduladores alostéricos positivos de la señalización como BMS986122 y del agonista (R)-metadona, también selectivo para MOR como DAMGO. BMS986122 afecta positivamente la afinidad y la señalización de algunos ligandos como (S)-metadona, la cual no es tan eficaz por sí sola como su homólogo R. Estos modelos teóricos predicen que los moduladores favorecen las interacciones de los agonistas con el receptor, por estabildades observadas, mientras el ion sodio puede interrumpir dichas interacciones. Los resultados conducen a que la transmisión de la señal alostérica podría ocurrir en W^{7.35} y Y^{7.53} ubicados en TM7 (Bartuzi *et al.*, 2016; Livingston *et al.*, 2014).

Morfina y naloxona.

Dada la relevancia histórica, terapéutica y estructural de la morfina y la naloxona, estas han sido estudiadas desde diferentes perspectivas. En particular, estudios de modelado molecular utilizando las estructuras cristalográficas de los receptores opioides recientemente publicadas han proveído de información estructural detallada de procesos de reconocimiento molecular y de la activación de estos receptores. Por ejemplo, diferencias en contactos y movimientos específicos de aminoácidos entre agonistas y antagonistas, diferencias en la inclusión del sodio alostérico, movimientos transmembranales para la activación, entre otros (Shang *et al.*, 2014; Shim *et al.*, 2013).

Contactos importantes disminuidos por la morfina frente a antagonistas o agonistas parciales se encuentran en los aminoácidos I322^{7.39} y Y326^{7.43} (Shim *et al.*, 2013).

Aspectos importantes encontrados son el movimiento del egreso del sodio desde su sitio alostérico en D^{2.50}. Investigado más a fondo en estudios en DOR, el cual ha sido el receptor opioide cristalizado con el ion sodio en este lugar, aunque en su estado inactivo. Este sodio está en un sitio alostérico cercano a D^{2.50} y N^{3.35} y migra en presencia de un ligando agonista de DOR hacia la parte extracelular desde dos vías, una por TM3 y otra por TM2, además del egreso por la parte intracelular entre TM2 y TM7, con porcentajes de migración desde un número de dinámicas procesadas de 16, 14 y 15 %, respectivamente (Shang *et al.*, 2014). También, se han observado que las densidades de probabilidad espaciales en los tres receptores opioides respecto al tiempo de la dinámica cuando el sodio entra en ausencia de ligando tiene zonas importantes de permanencia en los residuos D^{3.32} y el más importante D^{2.50} (Shang *et al.*, 2014).

Estudios relevantes son los realizados sobre las moléculas de agua en el receptor cuando la morfina e hidromorfina, que son análogos cercanos estructuralmente hablando, están presentes en el sitio ortostérico (zona en la que normalmente se fija un ligando en la proteína). Se muestra la permanencia de moléculas de agua que hacen puente entre el aminoácido H297^{6.52} y estos ligandos en MOR (Cong *et al.*, 2015). Este puente de interacción es encontrado para el agonista BU72 en el cristal de MOR activo (Huang *et al.*, 2015).

Además, uno de los pocos cálculos de energía alquímicas hechas en receptores opioides se realizó para comparar la energía libre relativa entre la morfina y hidromorfina, en donde la calculada estaba en 0.8 *kcal/mol* en dirección de la transformación de la dihidromorfina a morfina, mientras que diferencia relativa experimental fue de 0.4 *kcal/mol* (Cong *et al.*, 2015). Aun así, se observa que en sus dinámicas el aminoácido W296^{6.51} en presencia de la morfina adopta una posición que no está en acuerdo con el cristal de MOR activo resuelto a la postre. Para resaltar, en dicho estudio no incluyeron el sodio alostérico de MOR para el cálculo de energías enunciadas.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo general

Desarrollar modelos estructurales de la unión ligando-receptor hacia la elucidación de la selectividad funcional en el receptor opioide Mu

3.2 Objetivos específicos

Diferenciar los cambios estructurales del receptor opioide mu y los modos de unión entre la morfina, DAMGO y la herkinorina. Los análisis realizados serán: contactos entre los ligandos y el receptor, modos funcionales, helicidad, ángulos diedros de aminoácidos relevantes y la distribución de las moléculas de agua dentro del receptor opioide mu.

Proponer bases iniciales de la señalización causadas por la morfina y DAMGO en eventos anteriores al acoplamiento de las macromoléculas intracelulares.

Proponer un modo de unión para la herkinorina que explique los procesos iniciales en señalización en el receptor opioide mu hacia el reclutamiento de arrestinas.

4. METODOLOGÍA

Las moléculas estudiadas fueron: la morfina, naloxona, DAMGO y herkinorina. Con especial interés en la herkinorina. Todas las moléculas fueron alineadas a los ligandos co-cristalizados para estudios posteriores de *docking* o directamente en dinámica molecular. La morfina y la naloxona pasan a las dinámicas moleculares directamente desde el alineamiento flexible debido a su similitud estructural con los ligandos cristalográficos, la cual se muestra más adelante en la sección 5.1. El resumen metodológico está en la Figura 7.

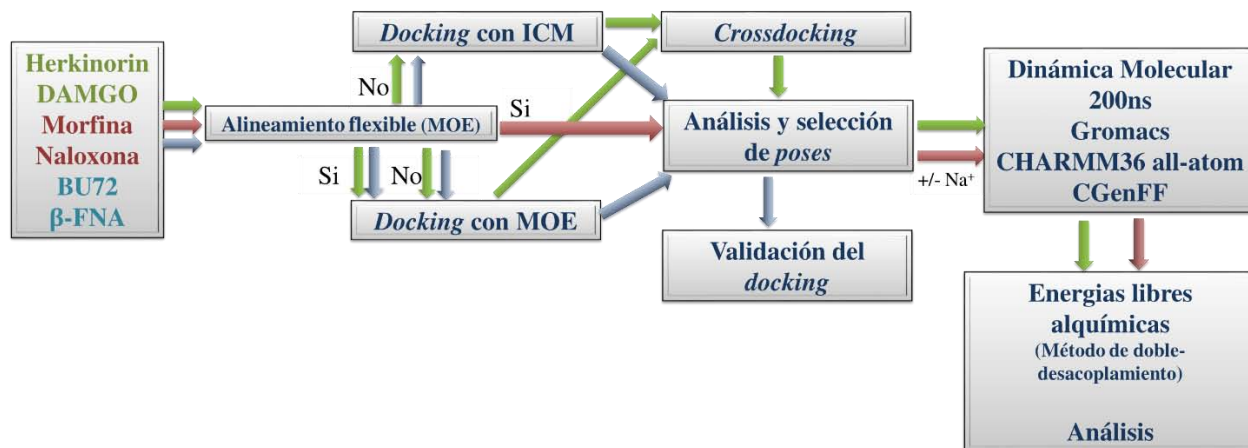


Figura 7. Diagrama de flujo de las metodologías realizadas sobre las moléculas estudiadas.

4.1 Alineamientos flexibles de moléculas pequeñas en MOR

El programa utilizado fue *Molecular Operating Environment* (MOE), desarrollado por *Chemical Computing Group Inc.* El cálculo terminó cuando las conformaciones consideradas iguales ($RMSD < 0.5 \text{ \AA}$) sumaban más de 50 en 1000 iteraciones. Se descartan las conformaciones con puntajes más grandes que 15.0 kcal/mol respecto al puntaje mínimo. Las conformaciones fueron escogidas haciendo rotaciones aleatorias de los enlaces rotables simples con un límite de configuraciones de 100, la orientación se encontró minimizando la función de similitud $-kT \cdot \log(F) + U$, donde F es la característica de medida de similitud referente a densidades de propiedades entre pares de átomos (Tabla A-1, Anexo A.1) y U es la energía potencial promedio desde el campo de fuerza MMFF94x (Labute *et al.*, 2001). Los parámetros dentro de F para cada propiedad son $\alpha = 1$ y los \mathcal{W} 's seleccionados por defecto (Tabla A-1). La minimización es realizada con dos etapas continuas del método *steepest decent* y terminó cuando el gradiente RMS fue menor a 0.01. Los potenciales fijos serían el ligando cristalográfico en el receptor activo o inactivo, con protonación a pH 7. Las estructuras alineadas fueron los agonistas DAMGO, herkinorina, morfina y el antagonista naloxona seleccionando el mejor puntaje.

4.2 Docking de agonistas de MOR

El *docking* fue realizado para DAMGO y la herkinorina, ya que la morfina y naloxona se alinearon perfectamente con las estructuras de los ligandos co-cristalizados con los receptores activo e inactivo, respectivamente. Las estructuras de MOR fueron obtenidas del *Protein Data Bank* (www.pdb.org). Se utilizaron dos programas de *docking*, MOE e ICM, los cuales presentaron mejores resultados que otros programas. En todos los casos se hizo *docking* con rígido, donde se eliminó cualquier componente

diferente de los átomos del receptor para dar más libertad al ligando dentro del sitio activo. En la búsqueda conformacional los ligandos fueron libres de rotar y cambiar su conformación. A manera de validación, con ambos programas, se realizó el *docking* de los ligandos cristalográficos BU72 y β -FNA, en sus respectivos receptores. Los ligandos agonistas fueron acoplados utilizando MOR en estado activo, código PDB 5C1M, tomando la secuencia desde el aminoácido M65 hasta F347. El ligando antagonista β -FNA fue acoplado al MOR en estado inactivo, código PDB 4DKL, desde M65 hasta I351. Para los receptores fueron eliminados los componentes no proteicos.

4.2.1 Docking con MOE

El *docking* fue realizado con el programa *Molecular Operating Environment* (MOE), desarrollado por *Chemical Computing Group Inc.* Como primer paso se optimizaron los hidrógenos mediante el campo de fuerza MMFF94x, dejando fijos a los demás átomos en sus coordenadas originales. El sitio de unión que se exploró fue el generado automáticamente seleccionando los aminoácidos del cálculo de la interacción entre proteína-ligando para BU72 o β -FNA respecto al receptor activo e inactivo, respectivamente.

Los aminoácidos en el sitio de unión se identifican en dos pasos: primero los que tienen una fuerte interacción con el ligando, tales como interacciones de enlaces de hidrógeno que se calculan con base a conocimientos previos (como diccionario) según *Labute* (Labute, 2001) y el segundo a los aminoácidos del receptor que se encuentran cerca al ligando, pero cuyas interacciones con el ligando son débiles, tales como interacciones hidrofóbicas o electrostáticas colectivas con base a una distancia definida de 4.5 Å (Clark *et al.*, 2006). Los aminoácidos se enlistan en la Tabla 3. La región donde se realiza el *docking* será encontrada como el tamaño de la caja suficiente para englobar a estos aminoácidos.

Tabla 3. Aminoácidos en el receptor opioide mu para definir el sitio de unión en MOE.

| Aminoácidos Cristal Activo | | | | | | | | | |
|-------------------------------------|------------------------|----------------------|------------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|--|
| Q124 ^{2.60} | W133 ^(ECL1) | V143 ^{3.28} | I144 ^{3.29} | D147 ^{3.32} | Y148 ^{3.33} | M151 ^{3.36} | V236 ^{5.42} | W293 ^{6.48} | |
| I296 ^{6.51} | H297 ^{6.52} | V300 ^{6.55} | W318 ^{7.35} | I322 ^{7.39} | Y326 ^{7.43} | | | | |
| Aminoácidos cristal Inactivo | | | | | | | | | |
| D147 ^{3.32} | Y148 ^{3.33} | M151 ^{3.36} | T218 ^(ECL2) | E229 ^{5.35} | K233 ^{5.40} | V236 ^{5.42} | F237 ^{5.43} | W293 ^{6.48} | |
| I296 ^{6.51} | H297 ^{6.52} | V300 ^{6.55} | K303 ^{6.58} | W318 ^{7.35} | I322 ^{7.39} | G325 ^{7.42} | Y326 ^{7.43} | | |

Para DAMGO y la herkinorina se usaron las coordenadas de las estructuras alineadas (originales en caso del ligando cristalográfico) y no alineadas al ligando cristalográfico BU72. En los ligandos cristalográficos se usaron su coordenada original y una coordenada aleatoria. Para todos los casos se realizaron dos procedimientos de *docking*.

4.2.1.1 Primer Docking (D1)

En el primer *docking* se utilizó *Alpha triangle* como método de emplazamiento (MOE, 2010). Se impuso que mínimo se realizará 8×10^6 iteraciones y que no se sobrepasará un máximo de 5×10^7 iteraciones. La opción de puntaje fue *London dG* (Corbeil *et al.*; MOE, 2010). Para más detalle consultar el Anexo A.2.1. Al final de la evaluación se seleccionó el mejor puntaje.

Para mejor interpretación se nombrarán a los resultados del *docking* referente a si se alinearon las moléculas de estudio al ligando cristalográfico (D1-A) o si vienen de coordenadas aleatorias (D1-S).

4.2.1.2 Segundo *Docking* (D2)

En el segundo *docking* (D2-MOE) se usaron dos etapas continuas. La primera aplicando *Alpha Triangle* y *London dG* para el emplazamiento y la función de puntaje, con los mismos parámetros del primer *docking* D1-MOE. Y la segunda, donde las 30 mejores salidas de D1-MOE se les realizó un esquema de refinamiento por mecánica molecular con MMFF94x.

En esta etapa se utilizó un parámetro que excluye aminoácidos a más de 6 Å de distancia del ligando para acelerar el cálculo, una restricción tipo *tether* (distancia átomo-punto en el espacio) de 10 kcal/mol y un criterio de terminación con un gradiente RMS de 0.01 y 500 iteraciones. Nuevamente, se le realiza el puntaje a cada orientación con la función *London dG*. Al final se seleccionan el mejor puntaje de esas 30 poses. Se nombraron a los resultados de *docking* referente a las moléculas alineadas o coordenadas originales (ligandos cristalográficos) con prefijo D2-A. Las salidas desde puntos aleatorios de la molécula serán con prefijo D2-S. Por último, se compara los puntajes entre D1-A, D1-S, D2-A y D2-S, seleccionándose el mejor de los cuatro.

4.2.2 *Docking* con Molsoft (ICM)

Modelamiento molecular basado en mecánica de coordenadas interna, ICM (Schapira *et al.*, 1999) usando la versión ICM-3.8.4. Se realizó únicamente con la estructura no alineada y desde una posición aleatoria para los ligandos cristalográficos del receptor. El sitio de unión se estableció con el método independiente del ligando llamado *ICM PocketFinder* (Ruben Abagyan *et al.*, 2009; An *et al.*, 2005). Esto mediante un potencial con átomos de prueba en un entramado en tres dimensiones espaciado a 0.5 Å, el cual rodea toda la proteína. Más detalles en el anexo A.

Los aminoácidos que se seleccionaron (Tabla 4) fueron los del sitio de unión calculado anteriormente y que estuviese más cercano a las coordenadas del ligando cristalográfico. La región donde se realiza el *docking* fue el tamaño de la caja suficiente para englobar a estos aminoácidos.

Los términos de la energía para las minimizaciones se basaron en el campo de fuerza en todos los átomos *ECEPP/3* (Némethy *et al.*, 1992) con una constante dieléctrica dependiente de la distancia, además de adicionar términos para la energía de solvatación y contribución entrópica (R Abagyan *et al.*, 2013; Ruben Abagyan, Totrov, *et al.*, 1994; Wesson *et al.*, 1992). Se llevó a cabo un procedimiento de minimización desde *Biased Probability Monte Carlo, BPMC* (Ruben Abagyan & Totrov, 1994; M Totrov *et al.*, 1997; Zhong *et al.*, 2014). La unión se evaluó mediante función de puntaje *ICM ligand binding score* en todos los átomos (Schapira *et al.*, 1999; Maxim Totrov *et al.*, 1999; Zhong *et al.*, 2014). Para más información ver anexo A.3. Terminado el proceso se selecciona el mejor resultado de la lista, más los que concuerde con trabajos y referencias anteriores. Las salidas se renombrarán con el prefijo D-ICM.

Tabla 4. Aminoácidos en el receptor opioide mu para definir el sitio de unión en ICM.

| Aminoácidos receptor activo | | | | | | | | |
|--------------------------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|
| A117 ^{2.53} | D147 ^{3.32} | Y148 ^{3.33} | M151 ^{3.36} | K233 ^{5.39} | V236 ^{5.42} | F237 ^{5.43} | W293 ^{6.48} | I296 ^{6.51} |
| H297 ^{6.52} | V300 ^{6.55} | I322 ^{7.39} | G325 ^{7.42} | Y326 ^{7.43} | | | | |
| Aminoácidos receptor inactivo | | | | | | | | |
| D147 ^{3.32} | N150 ^{3.35} | M151 ^{3.36} | K233 ^{5.39} | V236 ^{5.42} | F237 ^{5.43} | W293 ^{6.48} | I296 ^{6.51} | H297 ^{6.52} |
| V300 ^{6.55} | I301 ^{6.56} | I322 ^{7.39} | G325 ^{7.42} | Y326 ^{7.43} | | | | |

4.3 Dinámica molecular

Esencialmente fue un sistema proteína-ligando incluido en una bicapa lipídica, rodeado por moléculas de agua e iones Na⁺ y Cl⁻ a una concentración fisiológica. Siguiendo las etapas descritas en las subsecciones siguientes.

4.3.1 Preparación del receptor

4.3.1.1 Receptor activado de MOR

Desde las coordenadas del PDB con código 5C1M de la estructura de MOR activa resuelta por difracción de rayos X y construida con la secuencia de *Mus musculus* (Huang *et al.*, 2015). A la cual se le removió todo aquello que no fuese ligando o receptor (Figura 8.1), incluyendo las moléculas de aguas cristalizadas. Se usó la secuencia desde el aminoácido Metionina M65 hasta la fenilalanina F347, colocando un grupo acilo en el extremo N-terminal y un grupo amida para el extremo C-terminal. Se mantuvo el puente disulfuro entre las cisteínas C140 y C217. Los estados de protonación se realizaron a pH 7, excepto para el aminoácido de ácido aspártico D114^{2.50}, al cual fue dejado con carga neutra en sistemas de la herkinorina, morfina y DAMGO (Huang *et al.*, 2015). Además, para observar la dependencia del ion sodio cerca de D114^{2.50} (Bartuzi *et al.*, 2016; Cheng *et al.*, 2016), solamente en los sistemas de la morfina y DAMGO, se emplazó un ion Na⁺ cerca de este aminoácido, pero está vez dejando su aspartato con carga negativa. El campo de fuerza utilizado para la proteína fue CHARMM36 incluyendo todos los hidrógenos, generado en línea desde CHARMM-GUI (Brooks *et al.*, 2009; Jo *et al.*, 2007; Jo *et al.*, 2008; Jo *et al.*, 2009; Lee *et al.*, 2016; Wu *et al.*, 2014).

El hecho de colocar una carga neutra en el aminoácido D114^{2.50}, cuando no se incluyó el sodio alostérico, fue para que la región alostérica permaneciera con carga neutra, porque en las simulaciones con sodio alostérico estuvieron presente D114^{2.50} cargado negativamente y un ion sodio contrarrestando dicha carga. El hecho de mantener con carga neutra al sitio alostérico en las simulaciones con y sin presencia de ion sodio, hace los resultados comparables.

4.3.1.2 Receptor inactivo de MOR

Desde las PDB con código 4DKL de la estructura de MOR inactiva resuelta por difracción de rayos X y construida desde la secuencia de *Mus musculus* (Manglik *et al.*, 2012). Removiendo igualmente todo aquello que no fuese ligando o receptor. Las aguas de cristalización y la lisozima T4 del receptor también fueron removidas. Se usó la secuencia de aminoácidos desde la metionina M65 hasta la isoleucina I351. Los seis aminoácidos faltantes del lazo intracelular ICL3 (secuencia MLSGSK), fueron agregados con

ProMod Versión 3.70 implementado en línea por SWISS-MODEL (Arnold *et al.*, 2006; Benkert *et al.*, 2011; Biasini *et al.*, 2014). Para los extremos N-terminal y C-terminal, se añadieron un grupo acilo y un grupo amida, respectivamente. De igual forma, se mantuvo el puente disulfuro entre las cisteínas C140 y C217. Y los estados de protonación se basaron en un pH 7 y se emplazó un átomo de sodio en cercanías al aminoácido de ácido aspártico D114^{2.50} que tuvo carga negativa (Bartuzi *et al.*, 2016; Cheng *et al.*, 2016; Huang *et al.*, 2015). Como antes, el campo de fuerza utilizado para la proteína fue CHARMM36 incluyendo todos los hidrógenos, generado en línea desde CHARMM-GUI (Jo *et al.*, 2008; Jo *et al.*, 2009).

4.3.2 Ligandos

Para la morfina y naloxona se usa la pose obtenida en el alineamiento flexible de *MOE* con referencia al ligando del receptor activado y el ligando del receptor inactivo, respectivamente. Para la herkinorina se selecciona la orientación D-ICM-1 (Figura 8.3) y D-ICM-10, desde el *docking* con ICM. Para DAMGO se usaron las poses D-ICM-1, D-ICM-2 y D-ICM-24 desde ICM. El campo de fuerza seleccionado fue *CHARMM General Force Field* (CGenFF) versión 1.0.0 y una versión de topología 3.1 (Vanommeslaeghe *et al.*, 2010; Vanommeslaeghe & MacKerell, 2012; Vanommeslaeghe, Raman, *et al.*, 2012) implementado en línea por CHARMM-GUI, el cual usa los servicios de ParamChem. CGenFF fue validado haciendo una minimización y una dinámica NPT de 4 ns de la estructura cristalina del clorhidrato de morfina anhidro (Gelbrich *et al.*, 2012). Siguiendo los parámetros descritos para la producción de la dinámica de 200 ns, excepto que se usó 173 K para la temperatura (cercana a la experimental) cambiando el termostato por V-rescale debido al tamaño pequeño de la celda, el baróstato de Parrinello-Rahman con una comprensibilidad de $1.0 \times 10^{-6} \text{ Bar}^{-1}$, acoplamiento isotrópico con tiempos de 2 ps y con un rango corto de 0.35 Å para las interacciones no enlazantes. El RMSD durante los 4 ns es constante (Figura 9.A). El volumen de la celda (Figura 9.B) en la dinámica fue de $1630 \pm 169 \text{ Å}^3$ valor comparable al experimental de $1515.04 \pm 0.09 \text{ Å}^3$ (Gelbrich *et al.*, 2012).

4.3.3 Construcción del sistema

4.3.3.1 Complejo proteína-ligando

Este sistema fue hecho con la ayuda del constructor de membranas de bicapa lipídica implementado en línea por CHARMM-GUI (Jo *et al.*, 2008; Jo *et al.*, 2009), desde el receptor activado 5C1M o el inactivo 4DKL ya preparados. Mediante minimizaciones y compactaciones de la membrana, ésta se va acoplando al receptor o proteína que se seleccione, teniendo cuidado de no tener traslapes entre las moléculas. Para la membrana de bicapa lipídica (Figura 8.4) se escogieron los lípidos 1-palmitoil, 2-oleoil-sn-glicero-3-fosfolina, POPC, con fase de transición de gel-liquido cristalino de 271 K, 1-palmitoil-2-oleoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina, POPE, con fase de transición 298 K (Tieleman *et al.*, 1998) y colesterol (CHL), usados en una proporción 2:2:1 molar de POPC:POPE:CHL (Grossfield *et al.*, 2008). El campo de fuerza de los lípidos fue de CHARMM36 (*all-atom*). Se agregaron iones de Na^+ y Cl^- (Figura 8.6) para obtener una concentración 150 mM y una carga neutra y se hidrató el sistema de aguas del tipo TIP3 (Figura 8.5). Esto con la ayuda del constructor de membrana en línea. Por último, se añadió las coordenadas del ligando correspondiente antes preparado, y las coordenadas del receptor, lípidos, iones y aguas son iguales para cada sistema.

4.3.3.2 Hidratación del bolsillo de unión y del canal interno del receptor

Ya que el constructor de membrana de CHARMM falla en la hidratación del canal interno del receptor donde igualmente está el bolsillo de unión de los ligandos, se realizó una etapa de hidratación del receptor tanto activo como inactivo. Esta consistió en simulaciones las cuales se tuvo al receptor con restricciones rodeado solamente de aguas tipo TIP3 e iones Na^+ y Cl^- a 150 mM y carga neutra, en una caja donde el receptor se ubicó en su centro. Para las simulaciones las restricciones armónicas usadas en el receptor fueron de posición a un punto con valor de $239 \text{ kcal}/\text{\AA}^2$ ($100000 \text{ kJ}/\text{nm}^2$) para todos los átomos. El proceso pasó por una minimización del sistema con el método de *steepest decent* y dinámicas consecutivas de dos ensambles NVT y NPT a 310 K con tiempos de 25 ps y 100 ps , respectivamente (ver producción de la dinámica) hasta completar alrededor de 1 ns , donde ya no se observaron cambios o movimientos en las aguas de hidratación del canal interno (Figura 8.2). Usando el programa GROMACS versión 5.0.4 (Berendsen *et al.*, 1995; Hess *et al.*, 2008) y el campo de fuerzas CHARMM36 (*all-atom*). Luego estas aguas fueron incluidas en el sistema y en su topología. Esto también fue de utilidad para reemplazar un agua por el ion Na^+ en cercanías al aminoácido D114^{2.50}, en la preparación del receptor.

4.3.4 Producción de la dinámica molecular

Cada simulación fue realizada en paralelo usando GROMACS versión 5.0.4. Primero se realizó una minimización con el método de *steepest decent* usando las restricciones mencionadas en la Tabla 5. Luego se realizaron etapas de equilibración 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 controlada por el termostato de Berendsen con tiempo constante de 1 ps y 1 Bar de presión usando el baróstato de Berendsen semiisotrópico cada 5 ps y una compresibilidad de $4 \times 10^{-5} \text{ Bar}^{-1}$. Esto usando restricciones de la Tabla 5. La etapa de equilibración 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 (Sin problemas en la energía cinética y sus fluctuaciones) termostato de Nose-Hoover a una temperatura de 310 K cada 1 ps y el baróstato de Parrinello-Rahman semiisotrópico 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 equilibración y con tiempos de 200 ns cada una. Todas la dinámicas se integraron con el algoritmo *leap-frog*, se mantuvieron las distancias de los hidrógenos (Constricciones) usando el algoritmo LINCS, tres grupos de acoplamiento de la temperatura (receptor-ligando, lípidos y solvente-iones), las interacciones no enlazantes fueron finalizadas (*cut-off*) con un radio de 12 \AA 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* (*LJ*) hasta un valor de cero, entre distancias de 10 \AA de radio hasta el corte de finalización de 12 \AA (*cut-off*).

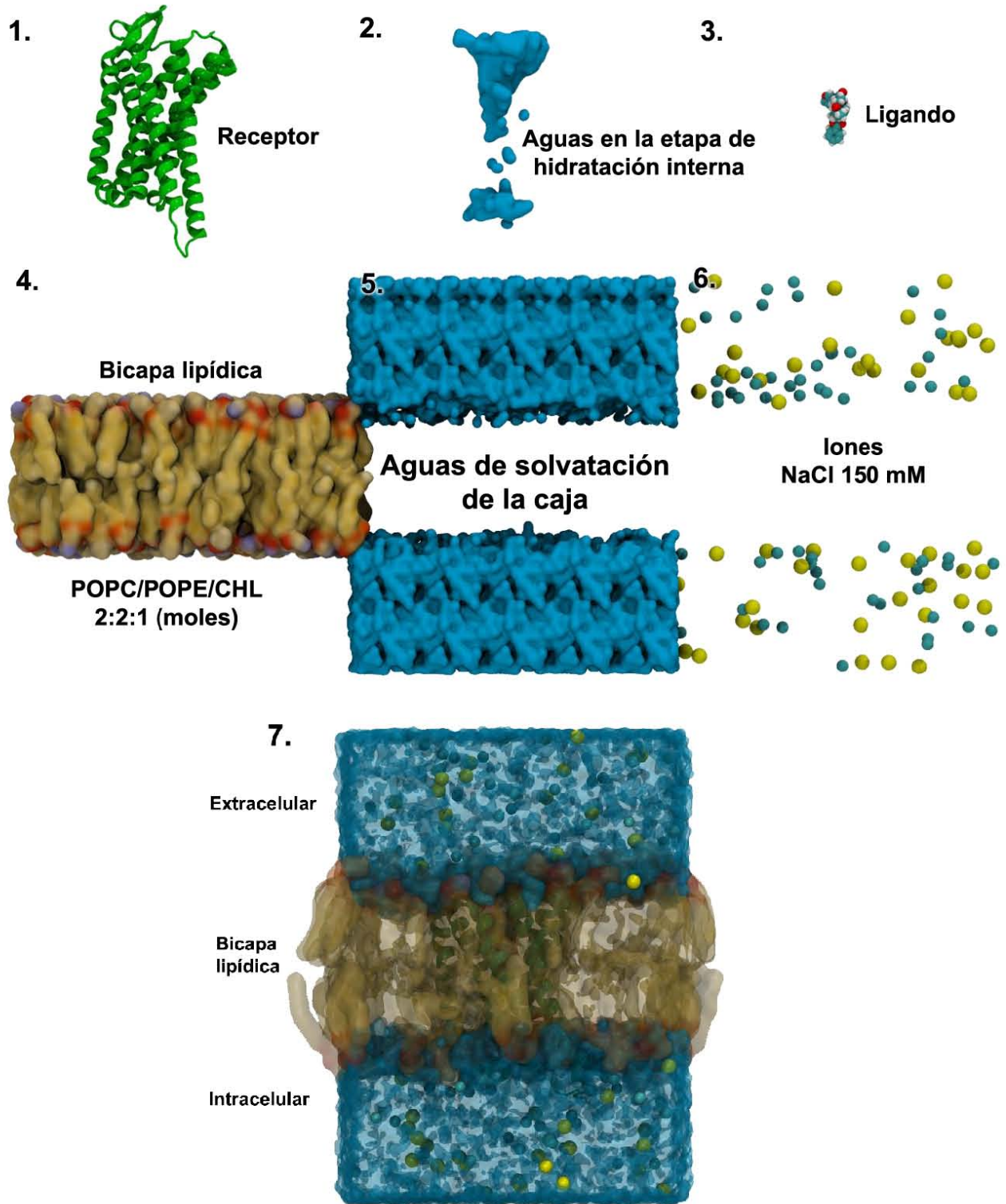


Figura 8. Etapas de la construcción de los sistemas para el cálculo de dinámicas moleculares en MOR. En donde 1, es la etapa de preparación del receptor activo o inactivo. 2, etapa de hidratación del canal interno en los receptores activo e inactivo. 3, etapa de preparación del ligando. 4, composición de la membrana lipídica usada. 5 y 6, son las etapas de solvatación y los iones añadidos al sistema.

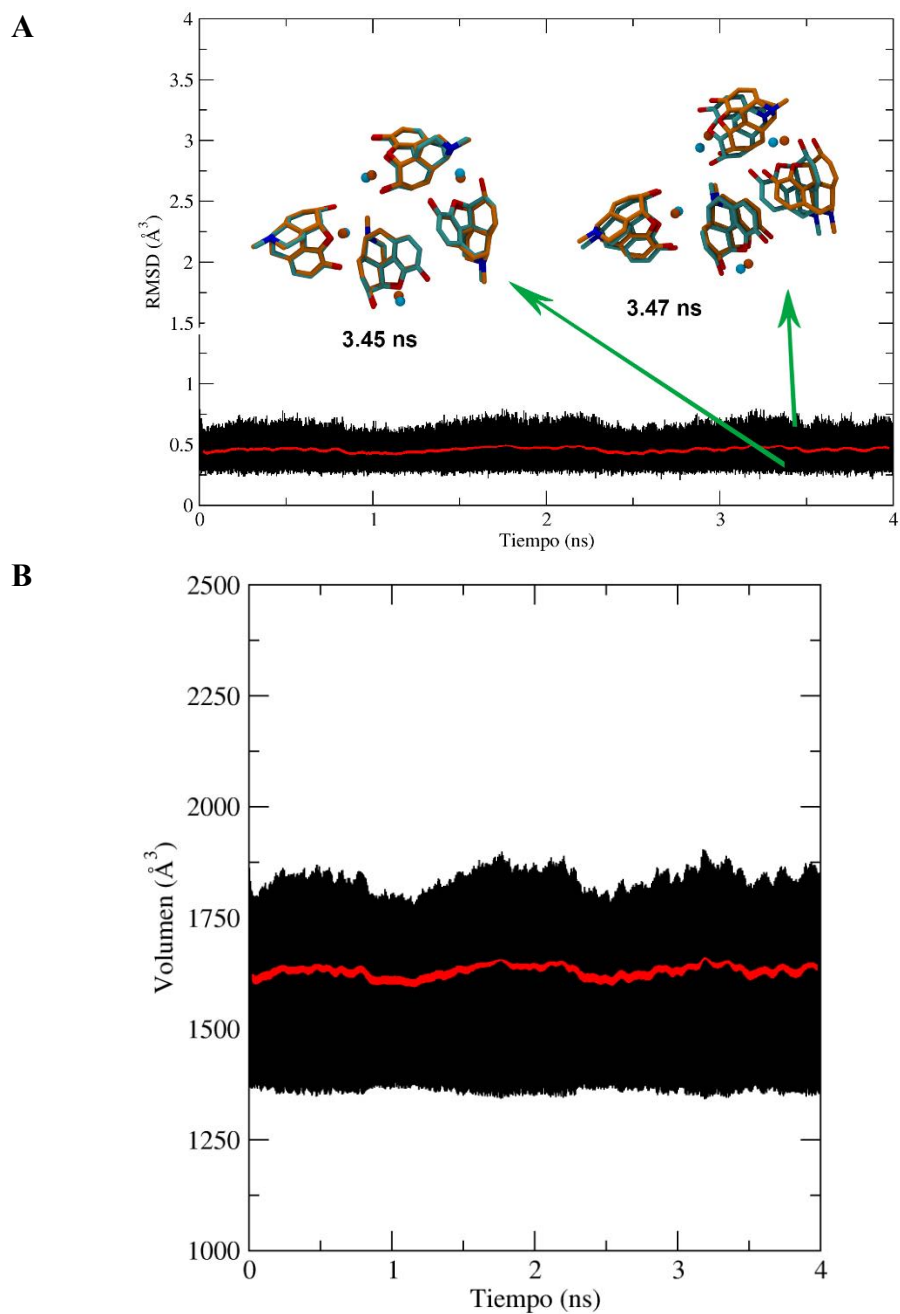


Figura 9. Validación del campo de fuerza de moléculas orgánicas pequeñas de CHARMM (CGenFF). (A) Mostrándose en equilibrio durante 4 ns la posición de las moléculas de clorhidratado de la morfina en su empaque cristalino. (B) Y la tendencia del volumen de la celda $1630 \pm 169 \text{ \AA}^3$ comparable al experimental de $1515.04 \pm 0.09 \text{ \AA}^3$ (Gelbrich et al., 2012).

Tabla 5. Etapas y restricciones usadas en el proceso de estabilización de los sistemas en las dinámicas moleculares.

| Etapa | Valores de la constante k del potencial armónico en las restricciones impuestas | | | | |
|-----------------------------------|---|---------------------------------------|--|--------------------------------------|------------------------------------|
| | Receptor (MOR) | | POPC, POPE y CHL | | Ligandos |
| | $kcal/\text{Å}^2$ (kJ/nm^2)* | $kcal/\text{Å}^2$ (kJ/nm^2)* | $kcal/\text{Å}^2$ (kJ/nm^2)** | $kcal/\text{Å}^2$ (kJ/nm^2)** | $kcal/\text{Å}^2$ (kJ/nm^2) |
| | Átomos pesados de la cadena lateral | Átomos pesados de la cadena principal | Átomo P en POPC y POPE, Átomo O en CHL | Diedros en POPC y POPE | Átomos pesados |
| Minimización (Steepest decent) | 4.78 (2000) | 9.56 (4000) | 2.39 (1000) | 2.39 (1000) | 9.56 (4000) |
| Equilibración 1 (NVT, 25 ps) | 4.78 (2000) | 9.56 (4000) | 2.39 (1000) | 2.39 (1000) | 9.56 (4000) |
| Equilibración 2 (NVT, 25 ps) | 2.39 (1000) | 4.78 (2000) | 2.39 (1000) | 0.96 (400) | 4.78 (2000) |
| Equilibración 3 (NPT, 25 ps) | 1.20 (500) | 2.39 (1000) | 0.96 (400) | 0.48 (200) | 2.39 (1000) |
| Equilibración 4 (NPT, 100 ps) | 0.48 (200) | 1.20 (500) | 0.48 (200) | 0.48 (200) | 1.20 (500) |
| Equilibración 5 (NPT, 100 ps) | 0.12 (50) | 0.48 (200) | 0.10 (40) | 0.24 (40) | 0.48 (200) |
| Equilibración 6 (NPT, 100 ps) | 0.00 (0) | 0.12 (50) | 0.00 (0) | 0.00 (0) | 0.12 (50) |
| Equilibración 7 (NPT, 10 ns) | 0.00 (0) | 0.00 (0) | 0.00 (0) | 0.00 (0) | 0.00 (0) |
| Producción (NPT, 200 ns) | 0.00 (0) | 0.00 (0) | 0.00 (0) | 0.00 (0) | 0.00 (0) |

Restricción desde potenciales armónicos de la forma $U(x) = k(x - x_0)^2/2$. Donde $U(x)$ es la energía potencial, k es la constante elástica de resorte y “ x ” es el valor de propiedad a restringir respecto de “ x_0 ”. Los valores de k son reportados en $kcal/\text{Å}^2$ y entre paréntesis se encuentran en kJ/nm^2 .

* Sin tener en cuenta los hidrógenos, y imponiendo restricciones armónicas de posición a un punto en cada átomo.

** Para POPC y POPE se realizó sobre el átomo de Fosforo, mientras que en CHL se fijó sobre su alcohol usando restricciones armónicas de posición al plano y-z, teniendo en cuenta que el receptor se alinee al eje z. Además, dos restricciones armónicas para los ángulos diedros en POPC y POPE, el primero fue para cada C3-C1-C2-O21 con valores de $\varphi=120$ y $\Delta\varphi=2.5$, cerca de los grupos éster y el segundo para cada C28-C29-C210-C211 $\varphi=0$ y $\Delta\varphi=0$, en los dobles enlaces cis.

4.4 Cálculos de la energía libre absoluta de la unión proteína-ligando en MOR

Para el cálculo de esta energía libre se realizaron dos etapas separadas: la primera de dinámicas usando el método de desacoplamiento del ligando en un sistema ligando-receptor y la segunda del desacoplamiento del ligando en dinámicas de un sistema ligando solvatado. Este método se le conoce como la aproximación de doble-desacoplamiento (Gilson *et al.*, 1997).

4.4.1 Dinámicas de doble-desacoplamiento

Ya fuese acoplando al ligando en el sistema ligando-receptor o en ligando-agua, cada una consistió en un primer grado de acoplamiento λ_i sobre las interacciones de V_{dw} de la molécula y su entorno con intervalos $\Delta\lambda = 0.05$, donde $\lambda = 0$ se refiere a la molécula no interactuante y $\lambda = 1$ a la molécula con todas sus interacciones de V_{dw} con su ambiente, pero sin interacciones electrostáticas con el entorno. Un segundo grado de acoplamiento λ_j sobre las interacciones electrostáticas con $\Delta\lambda = 0.05$, donde $\lambda = 0$ se refiere a una molécula sin sus interacciones electrostáticas con su entorno, pero sí de V_{dw} y $\lambda = 1$ a la molécula que tiene todas sus interacciones no enlazantes con su ambiente.

Cada simulación, λ_i o λ_j fue precedida de una minimización de la energía usando el método de *steepest decent*, equilibración NVT de 100 ps , equilibración NPT de 100 ps y una dinámica libre de 1 ns usando el método de Langevin (integrador de dinámicas estocásticas SD) con intervalos de integración de 2 fs , a 310 K controlados desde el mismo integrador cada 1 ps y 1 Bar de presión usando el baróstato de Parrinello-Rahman semiisotropico cada 1 ps . Los demás parámetros fueron similares a las dinámicas largas de 200 ns producción. El cómputo de la energía libre de cada sistema, se realizó con el método de *Bennett acceptance ratio* (BAR), el cual tiene en cuenta los vecinos hacia atrás y delante de cada valor de λ (Bennett, 1976; Klimovich *et al.*, 2015). Ver anexo A.6.

4.4.2 Restricciones en el sistema receptor-ligando

Además, para asegurar convergencia de los cálculos se realizó una restricción usando un potencial armónico ($U(d) = K(d - d_0)^2/2$) a la distancia (d) entre el centro de masa del correspondiente ligando y un centro de masa sobre aminoácidos seleccionados de la proteína (Tabla 6) que pudiese estar aproximadamente a 2 Å del centro de masa del ligando. Esto implícitamente mantiene al ligando en un volumen restringido que será aproximado al volumen de su sitio de unión $V_{Bolsillo}$ (Lawrenz *et al.*, 2012). Se escogió $7,17 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{Å}^{-2}$ ($30,0 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{Å}^{-2}$) como restricción en todas las distancias de los centros de masa (δd_L). Valor respecto a la libertad de movimiento de la herkinorina en el sitio activo, medida por la variación de δd_L , calculada según el *rmsd* de los últimos 50 ns de la producción larga de 200 ns y la ecuación $K = 3RT/\langle\delta d_L^2\rangle$, donde $\langle\delta d_L^2\rangle = \langle(d - d_0)^2\rangle = \langle rmsd^2\rangle$ (Roux *et al.*, 1996). No se varió las restricciones ya que no se observó una relación de aumento de la energía libre del complejo al aumentar la restricción a $11,95 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{Å}^2$ ($50,0 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{Å}^2$), las energías libres dan cercanas con las dos restricciones por lo que la convergencia de los cálculos llegan a ser similares y la corrección entonces será influenciada más por el $V_{Bolsillo}$. Es necesario corregir la energía libre de unión proteína-ligando debido a la restricción para que el ligando no interactuante (gas ideal) esté en el volumen del sitio activo y no en el volumen de su fase “*bulk*”, dicha restricción está representada en el segundo término para la energía en la ecuación 4.1 (Gilson *et al.*, 1997; Lawrenz *et al.*, 2012):

$$\Delta\bar{G}_{Proteína}^{(0\rightarrow1)} = \int_0^1 \frac{\sum_{i=1}^N \langle \frac{\delta U}{\delta \lambda} \rangle_{\lambda,i}}{N} d\lambda + RT \text{Ln} \left(\frac{V_{Bolsillo}}{V^o} \right) \quad (4.1)$$

Donde U es la energía potencial, λ es la etapa de desacoplamiento, V^0 es el volumen estándar, $V_{Bolsillo}$ es el volumen del sitio activo.

Para corregir la energía libre $\Delta\bar{G}_{Proteína}^{(0\rightarrow1)}$, la restricción sobre el movimiento del ligando no interactuante fue removida restando el valor $RTLn(V_{Bolsillo}/V^0)$ al valor total de la energía libre en la proteína, que sería la pérdida de energía por pasar el ligando no interactuante de su volumen restringido hacia el volumen de la fase (Lawrenz *et al.*, 2012). El volumen restringido $V_{Bolsillo}$ fue calculado explícitamente con el programa *trj_cavity* basado en un enmallado en 3D de voxeles (píxeles de volumen), haciendo la diferencia entre el volumen que rodera al receptor $V_R(t)$ y el volumen que rodea al receptor-ligando $V_{R-L}(t)$, usando el parámetro de búsqueda en 2 direcciones (opción *-dim*) sobre un entramado tridimensional, recomendado para búsquedas de sitios de unión en una proteína (Paramo *et al.*, 2014). Así, se tendrá un volumen dependiente del tiempo $V_{Bolsillo}(t)$. La trayectoria a tener en cuenta fue 1 ns de la dinámica restringida del ligando con todas sus interacciones.

Generalmente, se tienen que realizar correcciones de largo alcance por usar puntos de corte para el término de V_{dw} en sistemas no isotrópicos. Frecuentemente no se usan distancias de más de 10 Å (valores mayores aumentan el tiempo de cálculo) para los cortes de la energía, teniendo que añadir entre 1 ó 2 kcal/mol a la contribución de la afinidad según el punto de corte escogido (Shirts *et al.*, 2007). Sin embargo, en nuestros sistemas, para el punto de corte seleccionado de 12 Å, no fue necesario usar dicha corrección, debido a que los valores de la contribución de la energía fueron menores que 0.1 kcal/mol según el método de EXP-LR (Shirts *et al.*, 2007). Estos son menores que las desviaciones estándar de las energías calculadas.

Tabla 6. Aminoácidos seleccionados en MOR para el cálculo del centro de masa usado en la restricción de la distancia ente proteína y ligando dependiendo del ligando usado

| Ligando | Aminoácidos de MOR | Ligando | Aminoácidos de MOR |
|-------------|--|----------|--|
| Herkinorina | A117 ^{2.53} , Q124 ^{2.60} , N127 ^{2.63} , V143 ^{3.28} , I144 ^{3.29} , D147 ^{3.32} , Y148 ^{3.33} , M151 ^{3.36} , K233 ^{5.39} , W293 ^{6.48} , I296 ^{6.51} , H297 ^{6.52} , V300 ^{6.55} , K303 ^{6.58} , W318 ^{7.35} , I322 ^{7.39} , G325 ^{7.42} y Y326 ^{7.43} . | Naloxona | A117 ^{2.53} , Q124 ^{2.60} , N127 ^{2.63} , V143 ^{3.28} , I144 ^{3.29} , D147 ^{3.32} , Y148 ^{3.33} , M151 ^{3.36} , K233 ^{5.39} , V236 ^{5.42} , W293 ^{6.48} , I296 ^{6.51} , H297 ^{6.52} , V300 ^{6.55} , K303 ^{6.58} , W318 ^{7.35} , G325 ^{7.42} y Y326 ^{7.43} . |
| Morfina | A117 ^{2.53} , N127 ^{2.63} , V143 ^{3.28} , I144 ^{3.29} , D147 ^{3.32} , Y148 ^{3.33} , M151 ^{3.36} , K233 ^{5.39} , V236 ^{5.42} , W293 ^{6.48} , I296 ^{6.51} , H297 ^{6.52} , V300 ^{6.55} , K303 ^{6.58} , W318 ^{7.35} , I322 ^{7.39} , G325 ^{7.42} y Y326 ^{7.43} . | DAMGO | A117 ^{2.53} , Q124 ^{2.60} , N127 ^{2.63} , V143 ^{3.28} , I144 ^{3.29} , D147 ^{3.32} , Y148 ^{3.33} , M151 ^{3.36} , K233 ^{5.39} , V236 ^{5.42} , W293 ^{6.48} , I296 ^{6.51} , H297 ^{6.52} , V300 ^{6.55} , K303 ^{6.58} , W318 ^{7.35} , I322 ^{7.39} , G325 ^{7.42} y Y326 ^{7.43} . |

4.5 Análisis generales de las dinámicas

4.5.1 Análisis de modos funcionales (FMA)

Se obtuvo la visualización del movimiento máximamente correlacionado del ensamble-ponderado, *ewMCM*, *ensemble-weighted maximally correlated motion*. *ewMCM* es más dependiente de los componentes principales (PCs) y del mapa energético de la proteína que sólo el movimiento correlacionado máximamente, *MCM*, *maximally correlated motion* (Hub *et al.*, 2009). Para más detalle ver el anexo A.7. *ewMCM* es calculado desde un vector *a* optimizado y correlacionado a una función que en nuestro caso es el RMSD del esqueleto del receptor (-N-C_α-CO-) en el tiempo de la dinámica. El vector *a* está construido con base a PCs obtenidos de los vectores propios después de diagonalizar la matriz de covarianza *C* de la trayectoria de los 200 ns. Para cada configuración se seleccionó un número de PCs que tuviesen buenos coeficientes de correlación tanto en los modelos construidos, como en la validación cruzada (Hub *et al.*, 2009). Para la construcción del modelo se tomaron los primeros 160 ns, mientras los últimos 40 ns sirvieron para hacer la validación cruzada del modelo.

4.5.2 Helicidad

Fue calculada desde la rutina en GROMACS 5.0.4 llamada *gmx hélix*, basándose en los ángulos diedros Φ y Ψ (respecto al eje de rotación N-C_α y C_α-C_{C=O}, respectivamente) y en una hélice conformada de por lo menos por tres aminoácidos que asemejan estos ángulos a valores ideales de hélice (Bystroff *et al.*, 2003; Hirst *et al.*, 1994, 1995). Para cada aminoácido se calculó el porcentaje de tiempo, durante los 200 ns, en los que se encontró dentro de una estructura de α -hélice.

4.5.3 Ángulos diedros

Los ángulos diedros en el tiempo para un aminoácido selecto fueron extraídos a través de la rutina *gmx angle* de GROMACS haciendo índices de los ángulos (χ_1 y/o χ_2) de las cadenas laterales de los aminoácidos seleccionados importantes en el sitio alostérico y ortostérico. Tomándose una distribución en el tiempo.

4.5.4 Interacción proteína ligando

Para los alineamientos y *docking*: Cada configuración de receptor-ligando fue llevada al programa MOE y se cómputo la rutina de interacciones de proteína-ligando para obtener los diagramas de contacto representados en 2D. La rutina realiza dos pasos: el primero para encontrar interacciones del ligando con los aminoácidos, los iones y el solvente, las cuales son interacciones fuertes tales como puentes de hidrógeno, esto teniendo en cuenta los tipos de átomos, las distancias y los ángulos entre ellos relacionándolos con datos colectados experimentalmente. El segundo paso para aminoácidos y iones que interactúan débilmente o difusamente con el ligando como interacciones hidrofóbicas y electrostáticas, teniendo en cuenta principalmente distancias y átomos pesados del ligando (MOE, 2010).

Dinámica molecular: Las interacciones del ligando durante los 200 *ns* de la dinámica se calcularon con la rutina de González-Andrade y colaboradores aplicada en el programa VMD (González-Andrade *et al.*, 2016). Ésta selecciona aminoácidos del receptor que están en un rango de por lo menos 4.0 Å a cualquier átomo del ligando de una trayectoria con intervalo de 0.5 *ns*. Por último, se eliminó contactos menores a 5 % de tiempo respecto de la dinámica total.

4.5.5 Ocupación de moléculas de agua dentro del receptor

Fue calculado con el programa *trj_cavity* basado en un entramado en tres dimensiones de voxeles (píxeles de volumen), encontrando cavidades en el receptor usando el parámetro de búsqueda de enmallado en 6 direcciones rodeando a la proteína (opción *-dim*), recomendado para cavidades internas (Paramo *et al.*, 2014). Las moléculas de agua que se solapan con las cavidades encontradas son las únicas consideradas. A estas aguas se les asigna una ocupación en una región sin distinguirlas. Se obtiene entonces una densidad de probabilidad según la población en una región durante los 200 *ns* de las dinámicas moleculares.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 Moléculas estudiadas

En este trabajo se estudiaron cuatro moléculas con afinidad conocida al receptor opioide mu (MOR): la morfina, naloxona, DAMGO y herkinorina. Con especial interés en la herkinorina ya que tiene baja fosforilación, no recluta β -arrestina2 y no promueve internalización del receptor en la célula. La morfina a pesar de que difícilmente recluta la β -arrestina2, genera poca fosforilación, activa caminos como GRK5 que puede provocar desensibilización y, al sobreexpresar GRK2 en este sistema, comienza a reclutar β -arrestina2 lo que provoca internalización. DAMGO recluta las β -arrestinas de tipo 1 y 2 además de que internaliza a MOR. Finalmente, la naloxona se usó como ligando antagonista de referencia. Los ligandos cristalográficos BU72 y β -FNA fueron incluidos a manera de validación de los estudios de *docking* en MOR en estado activo e inactivo, respectivamente. La estructura de las moléculas, su afinidad experimental y tipo de ligando, se muestran en la Tabla 7. La morfina, naloxona y DAMGO han sido extensamente estudiados y, en este trabajo, fueron utilizados como punto de comparación para los estudios de *docking*, dinámica molecular y energía libre. También, se comparan datos reportados de la salvinorina A, la cual fue el primer agonista conocido del receptor opioide kappa (*KOR*) sin tener un nitrógeno positivo en su estructura. En la búsqueda de análogos de la salvinorina A, se obtuvo la herkinorina, que resultó ser el primer agonista de MOR que al igual que la salvinorina A no tiene un nitrógeno positivo en su estructura. La salvinorina A y la herkinorina, son estructuras diterpénicas con un índice de similitud de Tanimoto de 0.96 respecto al descriptor topológico de pares de átomos, Tabla 8.

5.2 Alineamiento molecular

Como primer paso, DAMGO, la herkinorina y la morfina fueron alineados al ligando cristalográfico BU72 de MOR en el estado activo (código PDB 5C1M), dejando fijas las coordenadas del cristal. El alineamiento consistió en la optimización de la conformación y la orientación de la molécula con base a una función construida de varias densidades de propiedad (Labute *et al.*, 2001). Para la naloxona, siendo esta un antagonista de MOR, la molécula que se utilizó como su referencia fue el ligando cristalográfico β -FNA de MOR en el estado inactivo.

El modo y el sitio en el que un ligando es reconocido por una macromolécula es generalmente propuesto mediante estudios de *docking*. El cual, como primer paso obtiene un espacio conformacional del ligando para lo cual existen diversos algoritmos y como segundo paso el cálculo de una función de puntaje que intenta correlacionar la conformación con la energía de unión proteína-ligando. La exploración del espacio conformacional desde métodos computacionales puede llegar a ser una tarea difícil y tardada, lo cual es cierto si la búsqueda comienza lejos del sitio de unión, recalando la importancia de puntos de partida de *docking* cerca al sitio de unión (Joung *et al.*, 2012). Para optimizar el paso de la búsqueda conformacional en estudios previos han propuesto y realizado exitosamente un alineamiento molecular flexible como tratamiento *pre-docking*, este paso es requerido cuando los modelos obtenidos por *docking* no logran encontrar una *pose* inicial razonable frente a lo reportado anteriormente (Martinez-Mayorga *et al.*, 2013).

Tabla 7. Moléculas estudiadas y referenciadas en este trabajo.

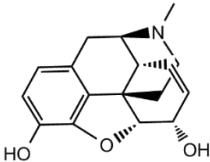
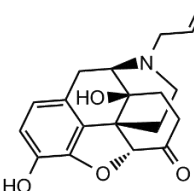
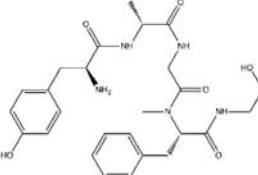
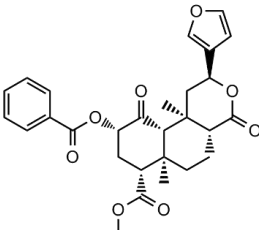
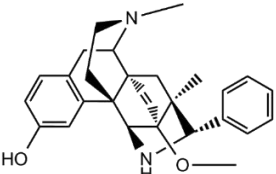
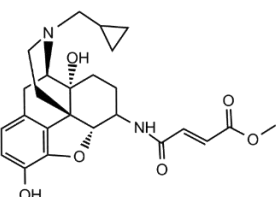
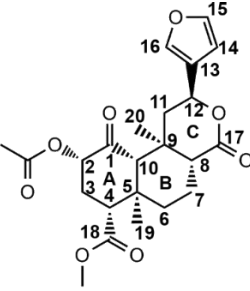
| Nombre | Estructura | Tipo de ligando* |
|---------------|--|--|
| Morfina |  <p>The structure shows the pentacyclic morphinan skeleton of morphine, featuring a phenolic ring with a hydroxyl group at the 3-position and a secondary amine bridgehead.</p> | Agonista |
| Naloxona |  <p>The structure is similar to morphine but includes a propyl group on the nitrogen bridgehead and a ketone group at the 6-position.</p> | Antagonista |
| DAMGO |  <p>The structure is a peptide agonist consisting of a morphine core with a complex peptide chain attached to the 3-position.</p> | Agonista (péptido) |
| Herkinorina |  <p>The structure is a complex terpenoid molecule with multiple stereocenters and various functional groups, including a furan ring and a benzoyl ester.</p> | Agonista (terpeno) |
| BU72 |  <p>The structure is a morphine derivative with a benzoyl group at the 6-position and a propyl group on the nitrogen bridgehead.</p> | Agonista (co-cristalizado con MOR) |
| β-FNA |  <p>The structure is a morphine derivative with a propyl group on the nitrogen bridgehead and a propyl ester group at the 6-position.</p> | Antagonista (co-cristalizado con MOR) |
| Salvinorina A |  <p>The structure is a complex terpenoid molecule with a highly branched carbon skeleton, numbered 1 through 20, and several oxygen-containing functional groups.</p> | Selectivo para el receptor opioide kappa |

Tabla 8. Similitud estructural para las moléculas estudiadas en este trabajo.

| Molécula | Similitud estructural (Fracción)* | | | | | | |
|----------------------|-----------------------------------|--------------|--------------|--------------------|----------------|-----------------|----------------------|
| | <i>BU72</i> | <i>B-NFA</i> | <i>DAMGO</i> | <i>Herkinorina</i> | <i>Morfina</i> | <i>Naloxona</i> | <i>Salvinorina A</i> |
| <i>BU72</i> | 1.00 | 0.67 | 0.61 | 0.48 | 0.85 | 0.48 | 0.49 |
| <i>β-FNA</i> | 0.67 | 1.00 | 0.73 | 0.61 | 0.68 | 0.65 | 0.62 |
| <i>DAMGO</i> | 0.61 | 0.73 | 1.00 | 0.55 | 0.57 | 0.54 | 0.57 |
| <i>Herkinorina</i> | 0.48 | 0.61 | 0.55 | 1.00 | 0.49 | 0.80 | 0.96 |
| <i>Morfina</i> | 0.85 | 0.68 | 0.57 | 0.49 | 1.00 | 0.55 | 0.51 |
| <i>Naloxona</i> | 0.48 | 0.65 | 0.54 | 0.80 | 0.55 | 1.00 | 0.84 |
| <i>Salvinorina A</i> | 0.49 | 0.62 | 0.57 | 0.96 | 0.51 | 0.84 | 1.00 |

* Valores calculados con PowerMV versión 0.61 (K. Liu et al., 2005) desde un descriptor topológico de pares de átomos y similitud de Tanimoto (Willett, 2006). Estos descriptores topológicos son basados en la información de las moléculas, lo que hacen que tengan más bits resolución (Sheridan et al., 1996).

Cabe mencionar que el paso de alineamiento genera conformaciones similares a la molécula de referencia que pueden no ser relevantes para la molécula bajo estudio, y de ser posible deberá ser confrontado con información estructural contenida en la literatura. Si el alineamiento no es exitoso, puede deberse a que la molécula de referencia y la molécula bajo estudio son estructuralmente diferentes, y por ende, no comparten características farmacofóricas similares (Martinez-Mayorga et al., 2013).

En este trabajo utilizamos esa estrategia para enfocar la búsqueda conformacional de las moléculas de interés dentro del sitio de unión de MOR como punto de partida para los estudios de *docking* o directamente en simulaciones de dinámica molecular.

Si esto sucede, las salidas de los alineamientos en nuestro trabajo servirán como puntos de partida para el *docking*, indicándose cuándo se realizan. Este procedimiento disminuye el esfuerzo computacional y aumenta la probabilidad de encontrar una conformación cercana a la verdadera.

5.2.1 Alineamiento de la morfina y naloxona sobre los ligandos cristalográficos de MOR

En el caso de los alineamientos para la morfina y naloxona se tuvieron conformaciones que encajaron bien con los grupos espaciales de los ligandos cristalizados de MOR. Esto debido a contar con estructuras cíclicas tipo morfina, obteniendo valores de similitud estructural de 0.85 entre la morfina y BU72 y de 0.65 entre la naloxona y β-FNA (Tabla 8). Estos valores de similitud son bajos debido a que los descriptores con los que se realizó el cálculo (Tabla 8) poseen buena resolución (disminuyen valores de similitud entre moléculas) lo que disminuye el límite de aceptación para estructuras similares. También, BU72 y β-FNA tienen sustituyentes en el esqueleto básico morfínico que pueden disminuir los valores de similitud (Figura 10).

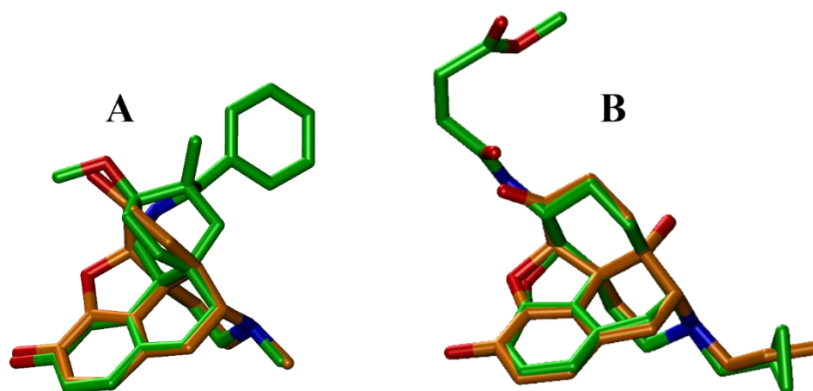


Figura 10. Alineamiento flexible para la morfina y naloxona. Los resultados de la morfina (A) y naloxona (B) son coloreados en verde frente a su referencia específica en MOR, BU72 y βFNA (naranja), respectivamente.

Por el lado de la morfina (Figura 10.A) las interacciones y contactos calculados desde MOE (ver sección 2.2.1 *Docking en MOE*) comparadas con las calculadas para el agonista BU72 son iguales exceptuando las interacciones que realiza el sustituyente fenilo en BU72, como el puente $H - \pi$ entre el aminoácido I144^{3.29} y este grupo, o los contactos con los aminoácidos V143^{3.28}, W133^{ECL1} y Q124^{2.60}. Los demás contactos para BU72 están presentes en la conformación para la morfina. Se destaca, entre las interacciones con aminoácidos de contacto para la morfina y BU72 en MOR, la interacción iónica entre la amina cuaternaria de la molécula y el aminoácido D147^{3.32}, dicha interacción es una de las principales y más conocidas sobre ORs, comprobada por estudios de mutagénesis, afinidad y en los mismos datos cristalográficos de ORs (Huang *et al.*, 2015; Mansour *et al.*, 1997; Surratt *et al.*, 1994). El contacto con H297^{6.52} de igual forma se encuentra relevante en dichos estudios y la morfina logra contactarlo de igual forma en nuestro posicionamiento. Para BU72 existe un puente $H - \pi$ entre el aminoácido V300^{6.55} así como en las interacciones calculadas para la morfina, también el antagonista β-FNA logra realizar dicha interacción hidrofóbica, Tabla 9 (Manglik *et al.*, 2012). Se mencionan algunos contactos hidrofóbicos importantes para ligandos cristalográficos BU72 y β-FNA como en I296^{6.51}, W318^{7.35} y I322^{7.39}, los cuales están calculados en las interacciones de MOE para el alineamiento de la morfina (Tabla 9).

En el caso de la naloxona sucede algo similar respecto a su referencia cristalográfica como en la morfina, sus interacciones calculadas con MOE son similares a β-FNA, no involucrando la parte de los aminoácidos que interaccionan con el sustituyente unido covalentemente a MOR (Figura 10.B, Tabla 9). También se encuentra la interacción iónica entre la amina cuaternaria de la naloxona y el aminoácido D147^{3.32} y el contacto entre la H297^{6.52} y el anillo aromático de su esqueleto, reportado en datos cristalográficos para β-FNA y experimentalmente por mutagénesis de MOR con la naloxona (Fowler *et al.*, 2004; Surratt *et al.*, 1994). Esto por tener esqueletos tipo morfínico. Dado que las conformaciones de estos dos ligandos están de acuerdo a datos experimentales y modelos computacionales (Shim *et al.*, 2013) y teniendo en cuenta que no hay ningún traslape entre las moléculas alineadas y el receptor, estas conformaciones son elegidas como punto de inicio de las dinámicas moleculares. Omitiéndose estudios de *docking* para la morfina y naloxona.

Tabla 9. Interacciones proteína-ligando calculadas desde MOE para la morfina, naloxona después del alineamiento flexible con sus referencias cristalográficas BU72 y β -FNA de MOR.

| Moléculas | Interacciones proteína-ligando 2D | Moléculas | Interacciones proteína-ligando 2D |
|----------------|-----------------------------------|-------------------------------|-----------------------------------|
| <i>BU72</i> | | <i>β-FNA</i> | |
| <i>Morfina</i> | | <i>Naloxona</i> | |

Para conocer el tipo de interacción en 2D ver Anexo B.

5.2.2 Alineamiento de DAMGO y la herkinorina al ligando cristalográfico de MOR en su conformación activa

Los alineamientos de DAMGO y la herkinorina fueron coherentes con los grupos farmacofóricos de BU72. Observándose, en ambos casos, buena superposición de los grupos aromáticos (fenilo para la herkinorina, *p*-hidroxifenilo y fenilo en DAMGO), de los átomos oxígeno para la herkinorina y de nitrógeno en DAMGO en especial del grupo amino cuaternario respecto al de BU72. La herkinorina emplaza un oxígeno de un carbonilo en la posición de esta amina cuaternaria del ligando cristalizado (Figura 11).

Las interacciones de la herkinorina y DAMGO con los aminoácidos de MOR respecto a BU72 incluyen los que están cercanos al grupo fenilo de este ligando cristalográfico, contrario a lo que ocurre con la morfina y naloxona. Antes de discutir más sobre los aminoácidos que están haciendo contacto y de los que concuerdan con estudios experimentales y de modelamiento molecular previos, hay que notar que en el caso de la herkinorina el grupo furano no es colocado adecuadamente dentro del sitio de unión haciendo

que se encuentre a una distancia de 1.63 Å del aminoácido I296^{6.51}, traspasando los límites de contacto, obteniéndose distancias de contacto de enlaces covalentes. En el caso de DAMGO su cadena peptídica se emplaza a una distancia muy corta de Y148^{3.33} (1.29 Å). Esto se observa en el diagrama de interacciones proteína-ligando calculado (Tabla 10), donde los grupos que pasan el límite de proximidad con la proteína se colorean en rojo. Así, es mejor realizar estudios de *docking* molecular para DAMGO y la herkinorina, discutir sus interacciones y la elección de una conformación después de dicho cálculo. Estas conformaciones alineadas serán las entradas al cálculo de *docking* cuando se indique.

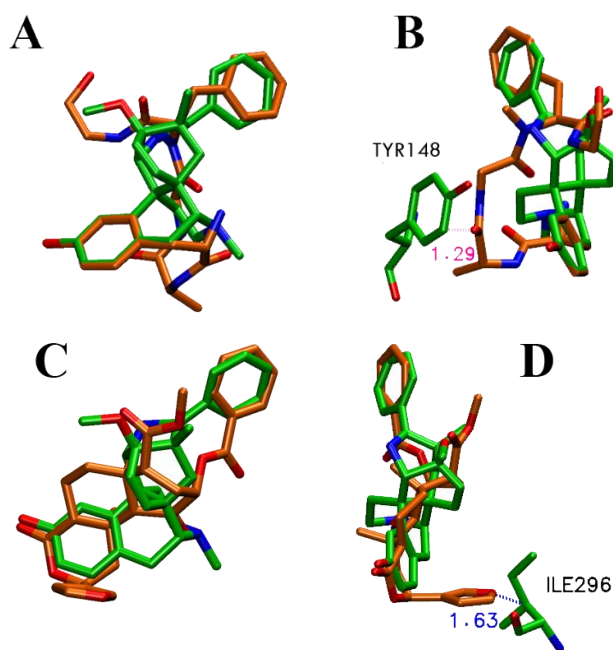


Figura 11. Alineamiento flexible para DAMGO y la herkinorina. Los resultados en DAMGO (A y B) y la herkinorina (C y D) son coloreados en verde, respecto de la referencia en MOR, BU72 (naranja). Las figuras B y D muestran los aminoácidos en donde se solapan DAMGO y la herkinorina al pasar los límites de contacto.

5.3 Docking

Los estudios de *docking* realizados se enfocaron al sitio ortostérico (zona en la que normalmente se fija un ligando en la proteína) y su vecindad en MOR, que incluye aminoácidos antes mencionados en la metodología (Tablas 3 y 4), dependiendo del estado activo o inactivo y del programa usado. Para el *docking* del estado activo las moléculas de entrada fueron DAMGO, la herkinorina y el ligando cristalográfico BU72. En el estado inactivo sólo se realizó el *docking* del ligando cristalográfico β -FNA. También, se tiene en cuenta que en el programa MOE se realizaron estudios desde las estructuras alineadas al ligando cristalográfico y estructuras con posiciones aleatorias al sitio activo del receptor. Esto porque se encontró dependencia del resultado final del *docking* referente a su posición inicial, tanto para el algoritmo de emplazamiento usado en esta metodología (*Alpha Triangle*) como para el algoritmo *Triangle Matcher*, el cual se usó sólo para comprobar dicha dependencia, ya que tiene un procedimiento similar de emplazamiento que *Alpha Triangle* (MOE, 2010). Caso contrario, el programa *Molsoft* sólo necesitó de la coordenada aleatoria para la entrada al *docking* ya que su procedimiento de emplazamiento BPMC no se resultó que fuese dependiente de la posición inicial alimentada.

Tabla 10. Interacciones proteína-ligando para DAMGO y la herkinorina después del alineamiento flexible, respecto de su referencia en MOR, BU72.

| Moléculas | Interacciones Proteína-Ligando 2D | Moléculas | Interacciones Proteína-Ligando 2D |
|-----------|-----------------------------------|-------------|-----------------------------------|
| BU72 | | Herkinorina | |
| DAMGO | | | |

Para conocer el tipo de interacción en 2D ver Anexo B.

Como primer resultado de comparación entre los dos métodos ICM y MOE se calculó la desviación media cuadrática (RMSD), para cada uno, de la posición de los átomos sin incluir hidrógenos del mejor resultado del *docking*, según los valores de puntajes de los ligandos cristalográficos teniendo referencia las coordenadas originales del cristal. En el cual para la conformación activa, el ligando BU72 tiene un valor de RMSD de 0.85 Å en D-ICM y de 5.71 Å para MOE-D2-A (Figuras 12.A y 12.C). Para la conformación inactiva se tiene que el ligando β -FNA emplaza a 2.64 Å en D-ICM y a 3.02 Å para MOE-D2-A (Figuras 12.B y 12.D). En este resultado en particular, no se tuvo en cuenta el enlace covalente entre β -FNA y el receptor en el aminoácido K233^{5,39} y el grupo sustituyente del ligando fue libre de rotar, así, omitiendo el sustituyente que enlaza covalentemente al receptor, se obtienen 1.01 Å para D-ICM y 1.62 Å para MOE-D2-A (Figuras 12.B y 12.D). En este sentido ICM encuentra la mejor ubicación respecto a las referencias, resaltando que los valores de *RMSD* menores que 1.5 o 2.0 Å se consideran aceptables y satisfactorios respecto a datos cristalográficos (Hevener *et al.*, 2009).

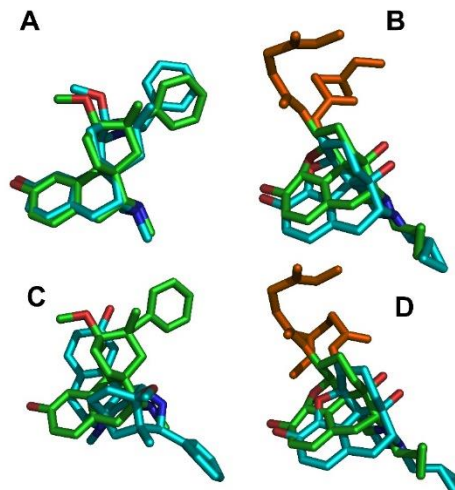


Figura 12. Validación del docking a través ligandos cristalográficos. De BU72 realizado en ICM (A). Para β -FNA en ICM (B). De BU72 hecho en MOE desde el resultado D2-A (C). Y β -FNA desde MOE desde el resultado D2-A (D). El color verde representa a las coordenadas originales del ligando cristalográfico, el azul resultado del docking y naranja es sustituyente que se une covalentemente al aminoácido K233^{5,39} de β -FNA en el receptor inactivo.

5.3.1. Docking de la herkinorina en MOR

Los modos de unión de la herkinorina-D-ICM-1 y la herkinorina-MOE (D2-S) coinciden en el esqueleto cíclico básico de la herkinorina, la diferencia principal entre ambos resultados fue la orientación del grupo metil éster de C4, la del carbonilo del grupo benzoiloxi en C2 y del grupo furano (Figura 13). Estas diferencias hacen que el *RMSD* de 1.24 Å esté aumentado, aunque siga considerándose aceptable por ser menor de 1.5 Å (Hevener *et al.*, 2009). Se realizó entonces una referencia cruzada, donde la salida de MOE fue usada como estructura de partida en ICM y viceversa. En este experimento, ICM logró reproducir su resultado inicial mientras que con MOE no se obtuvo el resultado del primer ensayo de *docking*. Así que, para continuar explorando el modo de unión de la herkinorina en MOR se tendrá en cuenta a ICM como pieza principal en la discusión de los emplazamientos, siendo la herkinorina-D-ICM-1 (posición 1 en la lista de resultados) clave en el estudio. Este y otros resultados de ICM tienen que ser comparados con información acerca de la herkinorina y sus análogos, para tomar la orientación más razonada en el receptor.

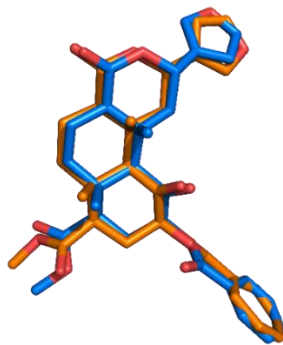


Figura 13. Estructuras superpuestas que recibieron los mejores puntajes de calificación en los estudios de docking en MOR para de la herkinorina usando los programas ICM y MOE. Mostrándose a la herkinorina-D-ICM-1 (azul) y la herkinorina-MOE-D2-S (naranja).

La herkinorina surgió como derivado de la salvinorina A, teniendo una similitud estructural de 0.96 (calculada en *PowerMV v0.61*, mostrado en la Tabla 8). La herkinorina tiene más afinidad hacia el receptor opioide mu, afinidad más baja para kappa y nula para delta (Harding *et al.*, 2005), mientras que, la salvinorina A es agonista selectivo para el receptor opioide kappa (Roth *et al.*, 2002). La estructura de ambas moléculas se muestra en la Figura 14, se muestra también la estructura del ligando co-cristalizado con MOR en estado activo. Cabe destacar la interacción iónica con el aminoácido D147^{3.32}, entre el grupo aspartato y el átomo de nitrógeno positivo del ligando, BU72. Aunque la mayoría de interacciones son hidrofóbicas por naturaleza, se agrega una interacción hidrofílica mediada por agua entre el alcohol de BU72 con H297^{6.52}, Y148^{3.33} y K233^{5.39} (Huang *et al.*, 2015). Dada la ausencia del átomo de nitrógeno positivo en la salvinorina A y su análogo la herkinorina, es de esperarse un sitio y modo de unión distinto a los morfinaos, en particular, y a los ligandos aminérgicos, en general. Dado el potente efecto agonista y selectivo para KOR de la salvinorina A y su peculiar estructura, se han realizado un gran número de estudios de su farmacología (Butelman *et al.*, 2015), relaciones estructura-actividad (Béguin *et al.*, 2008), su farmacóforo (Munro *et al.*, 2005) y los detalles estructurales de su interacción con KOR (Kane *et al.*, 2006; Yan *et al.*, 2005).

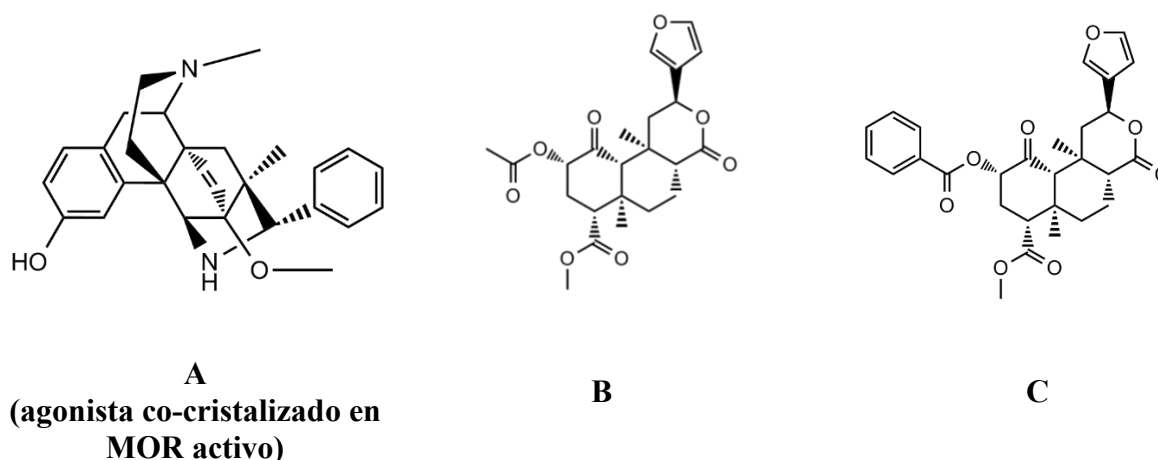


Figura 14. Comparación estructural entre BU72 (A), la salvinorina A (B) y la herkinorina (C).

Como primera aproximación, es posible asumir que la salvinorina A y sus análogos tendrán un modo de unión común en KOR. Incluso, puede extrapolarse a un modo de unión en MOR y, con base en las diferencias en la secuencia de ambos receptores, ver estructuralmente la selectividad hacia KOR. De manera análoga, puede postularse que la herkinorina tiene un modo de unión similar a la salvinorina A y entender, desde esa perspectiva, su preferencia por MOR sobre KOR y DOR. Sin embargo, se debe tener en cuenta que la salvinorina A, ha mostrado que induce internalización de KOR en la célula (Al-Hasani *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2005), mientras la herkinorina no lo hace con MOR, lo que también puede indicar modos de unión muy distintos en los dos receptores, los cuales involucren regiones que no solamente abarquen los aminoácidos que dan la selectividad hacia un receptor entre la salvinorina A y la herkinorina.

Se han propuesto distintos modos de unión para la salvinorina A en KOR (Bartuzi *et al.*, 2015; Kane *et al.*, 2006; Polepally *et al.*, 2014; Vortherms *et al.*, 2007; Yan *et al.*, 2005). Estos modelos coinciden en sus interacciones relevantes en aminoácidos específicos pero difieren en algunas de ellas. Más aún estos modelos coinciden en el sitio de unión pero difieren en el modo de unión de la salvinorina A en KOR. Específicamente, en la orientación general de la salvinorina A: (i) en donde modelos ubican al grupo

furano de la molécula hacia la zona intracelular del receptor; (ii) en otros modelos, el grupo furano se orienta hacia la zona extracelular del receptor.

Los estudios de *docking* realizados en este trabajo usando ICM encuentran ambas soluciones. Siendo la de mejor puntaje aquella que orienta el grupo furano hacia la parte extracelular del receptor, nombrada antes como la herkinorina-D-ICM-1 (posición 1 en la lista de resultados, Figura 15.D), la cual está en acuerdo con lo reportado por Polepally (Polepally *et al.*, 2014) y Bartuzi (Bartuzi *et al.*, 2015). Para contrastar ambas orientaciones, se discute también el modo de unión obtenido en la décima posición de D-ICM, relacionada a los trabajos de Yan (Yan *et al.*, 2005) Kane (Kane *et al.*, 2006) y Vortherms (Vortherms *et al.*, 2007), esta orientación será llamada la herkinorina-D-ICM-10, siendo la primera en la lista con dicha conformación (Figura 16.D).

5.3.1.1 Pose D-ICM-1 de la herkinorina en MOR

Una orientación de la salvinorina A relacionada con la herkinorina-D-ICM-1 es propuesta en un trabajo de acoplamiento molecular en MOR, usando un receptor construido con la secuencia de aminoácidos de humano y plantillas de cristales de la familia de GPCRs (*G protein-coupled receptor*), siendo la más importante la de MOR en su estado inactivo, código PDB: 4DKL (Bartuzi *et al.*, 2015). Bartuzi y colaboradores reportan posibles modos de unión de ligandos conocidos de MOR, utilizan modelado por homología, *docking* y dinámica molecular. Los sistemas que estudian son: La proteína sin ligando y unida a la morfina, DAMGO y la herkinorina. Además, con el fin de explorar sitios de unión alostéricos, exploran el modo de unión de la salvinorina A, THC y cannabidiol en presencia y en ausencia de DAMGO.

La Tabla 11 resume las interacciones sugeridas y descritas por Bartuzi y colaboradores. Los primeros cuatro grupos de interacciones se refieren a la afinidad, selectividad, y sitio de unión, respectivamente.

Dada la similitud estructural entre la salvinorina A y la herkinorina, Bartuzi y colaboradores asumen un modo de unión igual entre ambas estructuras, y analizan la modulación y activación de MOR por la herkinorina. Hay que recordar que la salvinorina A es selectiva a KOR, mientras la herkinorina es selectiva a MOR, con algo de afinidad por KOR y que cambios sutiles en la estructura pueden cambiar drásticamente una orientación de un análogo. Según su hipótesis, Bartuzi y colaboradores (Bartuzi *et al.*, 2015), la herkinorina emplazaría al grupo furano en cercanías de la TM7 y TM2 entre los aminoácidos H319^{7.36}, W318^{7.35} y Y128^{2.64} (Figura 15.A), mientras que nuestro modelo de la herkinorina-D-ICM-1 (Figuras 15.D y 15.E) lo hace hacia TM3 entre V143^{3.28} y I144^{3.29}, TM2 con Q124^{2.60} y ECL1 en W133^{ECL1}. Bartuzi y colaboradores argumentan que W318^{7.35} está involucrado en selectividad en MOR y algunos estudios mencionan que en el homólogo Y313^{7.35} en KOR puede presumirse interacción hidrofóbica con la salvinorina A y dar su selectividad para KOR (Kane *et al.*, 2006; Yan *et al.*, 2005). Pero la herkinorina-D-ICM-1 también hace contacto con este aminoácido desde su esqueleto hidrocarbonado (Figura 15.E). Además, nuestra posición de la herkinorina-D-ICM-1 ubica al grupo furano cerca del lugar donde BU72 emplaza su grupo fenilo en el cristal activo 5C1M, visto en las Figuras 15.C, 15.D y 15.E (Huang *et al.*, 2015). Para BU72 el diagrama de proteína-ligando realizado en MOE (Figura 15.C, Tabla 12) muestra que ese grupo fenilo interacciona con los aminoácidos en TM3, TM2 y ECL1 (V143^{3.28}, I144^{3.29}, Q124^{2.60} y W133^{ECL1}) como lo hace la herkinorina-D-ICM-1.

Siguiendo el esquema y la posición de la salvinorina A, la herkinorina emplazaría al grupo C2-benzoiloxi en cercanía de TM6 y TM7 entre los aminoácidos Y299^{6.54} y W318^{7.35} después del estudio de sus dinámicas. Además, en los inicios de la dinámica este sustituyente interacciona con el aminoácido C321^{7.38}

(C315^{7.38} en KOR) similar al grupo acetiloxi de la salvinorina A. Se ha encontrado que análogos sulfurados en esa posición C2 de la salvinorina A pueden formar enlaces disulfuro con el aminoácido C315^{7.38} en KOR, siendo selectivos a este receptor (Yan *et al.*, 2009). En contraste, nuestro modelo de la herkinorina-D-ICM-1 ubica al grupo C2-benzoiloxi de la herkinorina hacia TM7 en el aminoácido Y326^{7.43} realizando una interacción hidrofóbica tipo $\pi - \pi$ entre los anillos aromáticos del receptor y el ligando. Esto va en acuerdo con la retención de la afinidad de la salvinorina A cuando se muta Y320F comparada con Y320A en KOR, prediciendo una interacción hidrofóbica (Kane *et al.*, 2006). Lo anterior se puede ver a más detalle en las Figura 15.A, 15.D y 15.E.

Por otra parte, Polepally y colaboradores diseñaron análogos de la salvinorina A y proponen sus modos de unión mediante *docking* molecular y selectividad sobre los receptores MOR, KOR y DOR. Reportando también un modelo de unión para la salvinorina A en KOR (código PDB 4DJH) que les sirve de comparación con sus moléculas propuestas (Polepally *et al.*, 2014). Como se muestra en la Figura 15.B proponen que el grupo furano de la salvinorina A y de algunos análogos sustituidos en C2 están hacia TM2, ECL1 y ECL2, haciendo contactos con los aminoácidos V118^{2.63}, W124^{ECL1} y C210^{ECL2} (N127^{2.63}, W133^{ECL1} y C217^{ECL2} en MOR). Para destacar visualizan otros aminoácidos cercanos al grupo furano sobre la hélice TM3 que incluyen a V134^{3.28} e I135^{3.29} en KOR. Esto está de acuerdo con nuestro modelo de la herkinorina-D-ICM-1 el cual emplaza al grupo furano en cercanías de TM3 y los aminoácidos V143^{3.28} y I144^{3.29} en MOR (V134^{3.28} e I135^{3.29} de KOR) y en contacto con ECL1 y ECL2 W133^{ECL1} y C217^{ECL2} de MOR (W124^{ECL1} y C210^{ECL2} en KOR). Sin embargo, el modelo de la salvinorina A indica que el grupo acetiloxi de la posición C2 está en un sitio hacia TM3 en contacto con los aminoácidos D138^{3.32} Y139^{3.33} y M142^{3.36} de KOR (D147^{3.32}, Y148^{3.33} y M151^{3.36} en MOR). También, algunos de sus análogos dejan el sustituyente en C2 alejado más de 7 Å del aminoácido C315^{7.38}, antes mencionado como importante para otros análogos sulfurados. No obstante, el grupo C-2 benzoiloxi para la herkinorina-D-ICM-1 está hacia TM7 y principalmente el aminoácido Y326^{7.43} en MOR (Y320^{7.43} de KOR) como antes se menciona, donde también puede hacer contacto con M151^{3.36} (M142^{3.36}) igual que la salvinorina A. Hay que destacar la cercanía en el receptor activo e inactivo de MOR (código PDB 5C1M y 4DKL, respectivamente) entre D147^{3.32} y Y326^{7.43}.

Por otra parte, el sustituyente metil éster en C4 de la salvinorina A, el cual es el mismo grupo funcional en la herkinorina, emplaza en un sitio formado por los aminoácidos V108^{2.53}, T111^{2.56}, W287^{6.48} y Y320^{7.43} (A117^{2.53}, T120^{2.56}, W293^{6.48} and Y326^{7.43} en MOR) de las hélices TM2, TM6 y TM7. Mientras la herkinorina lo hace más precisamente hacia la hélice TM6 en el aminoácido H296^{6.52} el cual ha sido encontrado importante tanto en cristales como en pérdidas de afinidad por mutagénesis (Huang *et al.*, 2015; Manglik *et al.*, 2012; Spivak *et al.*, 1997).

5.3.1.2 Pose D-ICM-10 de la herkinorina en MOR

Otros modelos de unión de la salvinorina A dentro de KOR han sido propuestos en años anteriores a la obtención de la estructura por cristalografía de rayos-X, del estado inactivo, en el año 2012. Dichos modelos se han desarrollado mediante metodologías de modelado por homología y mediante la incorporación de información experimental como mutagénesis y afinidades en receptores quiméricos (Kane *et al.*, 2006; Vortherms *et al.*, 2007; Yan *et al.*, 2005). Estos modelos se muestran de manera esquemática en las Figuras 16.A y 16.B (Kane *et al.*, 2006; Yan *et al.*, 2005). Cabe destacar que estos modelos concuerdan en que el furano de la salvinorina A está cercano al aminoácido Y320^{7.43} de KOR (Y326^{7.43} de MOR). Sin embargo, Yan y colaboradores destacan la posibilidad de interacciones de puentes de hidrógeno entre el furano y los aminoácidos Y320^{7.43} y el Y119^{2.64} de KOR (Y326^{7.43} y Y1282⁶⁸ de

MOR). Esta hipótesis es desmentida por Kane y colaboradores, argumentando que los aminoácidos Y119^{2.64} y Y320^{7.43} se encuentran separados por $\sim 15 \text{ \AA}$ en el receptor, imposibilitando la formación de dichas interacciones. La retención de la afinidad de Y320F comparada la mutación Y320A, sugiere que se favorece una interacción hidrofóbica con el furano de la salvinorina A. El resultado obtenido de la herkinorina-D-ICM-10 (Figura 16.D y 16.E) muestra la posibilidad de una interacción $\pi - \pi$ entre el grupo furano de la herkinorina con el aminoácido Y326^{7.43} en MOR (Homólogo para Y320^{7.43} de KOR).

Tabla 11. La salvinorina A, interacciones importantes para su selectividad sobre KOR y estudio en MOR.

| Interacciones importantes | Efecto |
|---|--|
| KOR: Q115 ^{2.60} Y119 ^{2.64} Y312 ^{7.35} Y313 ^{7.36} I316 ^{7.39} Y320 ^{7.43} | Listado de mutaciones realizadas en KOR que apoyan la participación de los aminoácidos con la salvinorina A en la activación del receptor. |
| Y312 ^{7.35} (KOR) Y313 ^{7.36} (KOR) W318 ^{7.35} (MOR) H319 ^{7.36} (MOR) | Selectividad |
| Grupo acetiloxi de la salvinorina A en proximidad a C321 ^{7.38} (MOR), C315 ^{7.38} (KOR) | <i>Docking</i> de la salvinorina A: Análogos sulfurados se unen covalentemente. |
| Y326 ^{7.43} (MOR), Y320 ^{7.43} (KOR) Anillo de furano interacciona con H319 ^{7.36} , W318 ^{7.35} , Y128 ^{2.64} (interacción con anillo aromático) | Análisis de los contactos más evidentes de la salvinorina A con el receptor MOR luego de la dinámica de Bartuzi y colaboradores (2015). |
| Grupo 2-acetiloxi anclado en I322 ^{7.39} | |
| W318 ^{7.35} parece importante en el reconocimiento de la selectividad de los subtipos de los ORs por neoclerodanos. | |

(Bartuzi *et al.*, 2015)

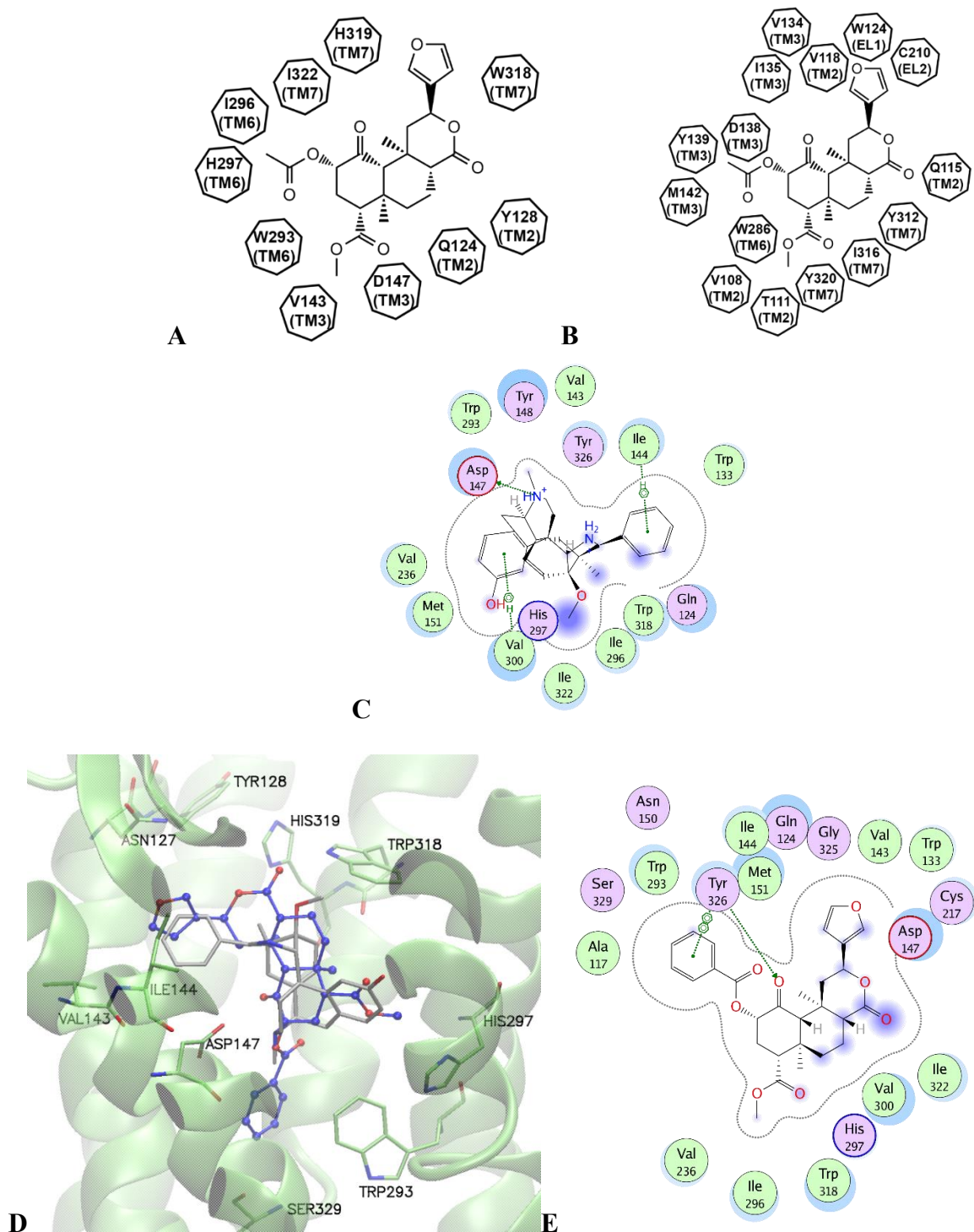


Figura 15. Comparación del resultado de docking de la herkinorina-D-ICM-1 con modelos cercanos. (A) Contactos de la salvinorina A en MOR por Bartuzi y colaboradores (Bartuzi et al., 2015). (B) Contactos de la salvinorina A en KOR por Polepally y colaboradores (Polepally et al., 2014). (C) Interacciones del ligando BU72 con la proteína calculadas desde MOE. (D) Ubicación de herkinorina-D-ICM-1 en MOR (azul) con referencia a las coordenadas del ligando BU72 del cristal (gris). (E) Aminoácidos de contacto de la herkinorina-D-ICM-1 desde interacciones proteína-ligando por MOE. Para conocer el tipo de interacción en 2D ver Anexo B.

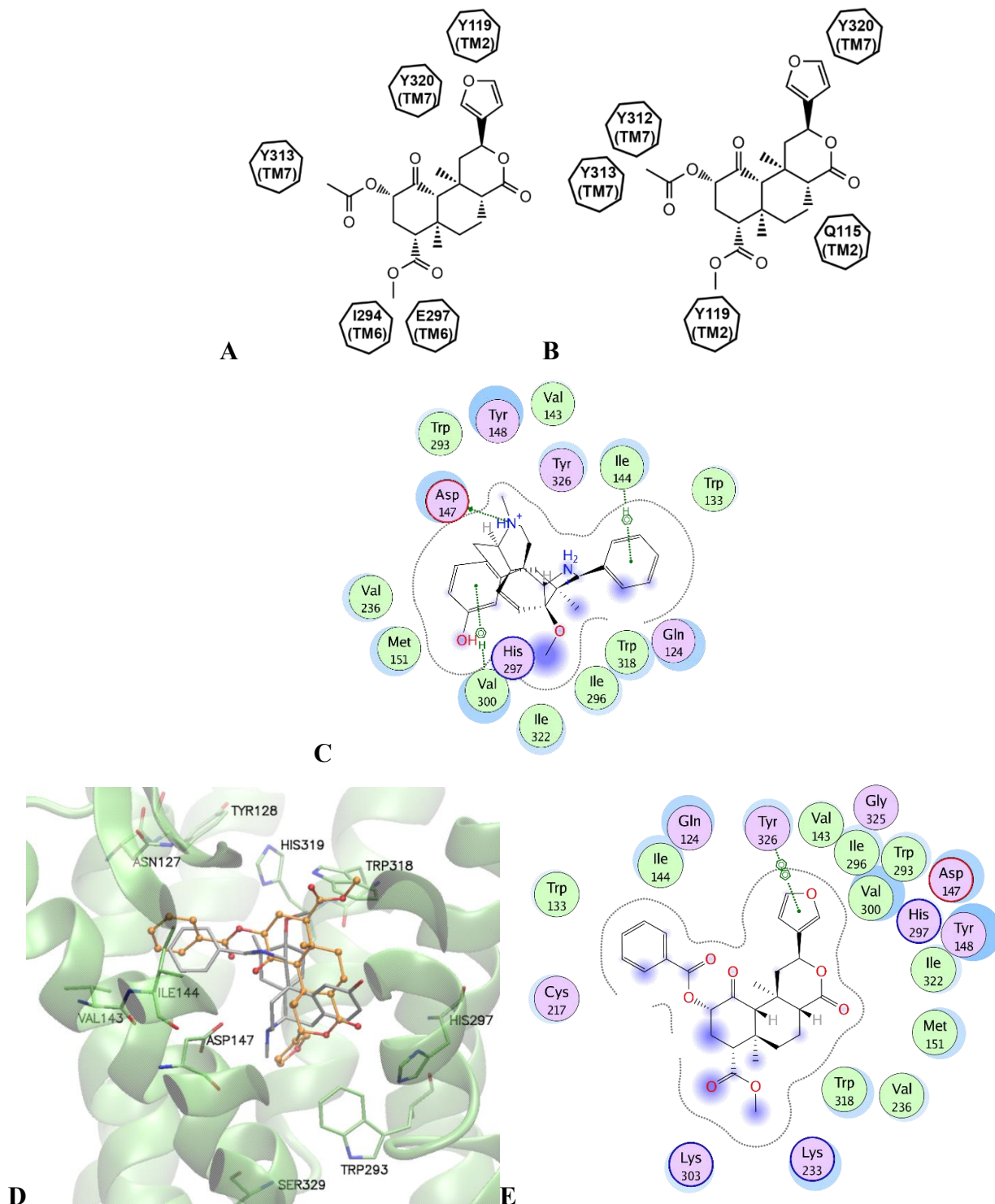


Figura 16. Comparación del resultado de docking de la herkinorina-D-ICM-10 frente a modelos cercanos. (A) Contactos de salvinorina A en KOR por Yan y colaboradores (Yan et al., 2005). (B) Contactos de la salvinorina A en KOR por Kane y colaboradores (Kane et al., 2006). (C) Interacciones del ligando BU72 con la proteína calculadas desde MOE. (D) Ubicación de la herkinorina-D-ICM-10 en MOR (naranja) con referencia a las coordenadas del ligando BU72 del cristal (gris). (E) Aminoácidos de contacto de la herkinorina D-ICM-10 desde interacciones proteína-ligando por MOE. Para conocer el tipo de interacción en 2D ver Anexo B.

Por otro lado, Yan y colaboradores (Yan et al., 2005), disponen la ubicación del grupo C2-acetiloxi de la salvinorina A en interacción hidrofóbica con Y313^{7.36} sobre TM7 de KOR (W318^{7.36} para MOR; Figura 16.A). Explicado por la retención de la afinidad cuando se muta Y313F y por la disminución de la afinidad cuando se cambia Y313A. También, discuten que el análogo 2-tiosalvinorina B no cambia su afinidad mutando Y313C o C315S, prediciendo que el grupo sustituyente que contenga –SH terminal en la posición C2 debe estar cerca de Y313^{7.36}. Una doble mutación en Y313C/C315S hace que disminuya la afinidad de la salvinorina A sustentando esta hipótesis. Kane y colaboradores (Kane et al., 2006) llegan a esa misma conclusión, de que el sustituyente C2 debe estar cerca de Y313^{7.36} en KOR, al observar una retención en la afinidad cuando sustituyen Y313F en KOR, añadiendo que el grupo 2-acetiloxi de la salvinorina A podría, también interaccionar con Y312^{7.36} sobre TM7 (H319^{7.36} en MOR) debido a la cercanía su cercanía con Y313^{7.36}. Nuestra orientación de la herkinorina-D-ICM-10 en MOR, emplaza al sustituyente C2-benzoiloxi en una región diferente a la discutida (Figuras 16.D y 16.E). Este grupo sustituyente en C2 de la herkinorina está en la cercanía de los aminoácidos V143^{3.28}, I144^{3.29}, Q124^{2.60}, W133^{ECL1} y C217^{ECL2}; dicho grupo sustituyente está, entonces, en el sitio donde el agonista BU72 del cristal activado 5C1M (código PDB) ubica a su fenilo y tiene interacciones (según interacciones proteína-ligando por MOE) con cuatro aminoácidos (V143^{3.28}, I144^{3.29}, Q124^{2.60} y W133^{ECL1}) con los que el sustituyente en C2 de la herkinorina-D-ICM-10 también contacta (Figuras 16.C y 16.E, Tabla 12). Además, se encuentra que la herkinorina-D-ICM-10 puede hacer contacto con posible interacción hidrofóbica entre el sustituyente C4 o su esqueleto tricíclico carbonado con el aminoácido W318^{7.35} (Y313^{7.35} en KOR). Los modelos anteriores ponen énfasis en contactos hidrofóbicos en la ubicación de los grupos funcionales pero hay que recordar que la salvinorina A y la herkinorina pueden participar en interacciones hidrofóbicas en su esqueleto cíclico carbonado.

Una última posible orientación para discutir es la de un análogo de la salvinorina A (Figura 17) que resultó selectivo para MOR, realizado como aproximación de aceptores de Michael en la posición C2 (Polepally *et al.*, 2014). Este sustituyente en C2 contiene un grupo 3-piridil de un carbonilo α - β -insaturado. El grupo piridil lo disponen hacia el aminoácido N127^{2.63} en TM2 desde modelado molecular usando el receptor MOR inactivo (4DKL, en el PDB), dicho aminoácido es encontrado clave en la selectividad entre MOR y DOR (Minami *et al.*, 1996). Además, se visualizan cerca de este grupo a los aminoácidos W133^{ECL1} y C217^{ECL2}. La herkinorina-D-ICM-10, también presenta estos últimos dos contactos con el sustituyente C2-benzoiloxi. En el caso del grupo furano del análogo que sintetizaron, se discute interaccionando con el aminoácido Y326^{7.43} y W293^{6.48} en las TM7 y TM6, respectivamente. La herkinorina-D-ICM-10, realiza una interacción $\pi - \pi$ entre su furano y el aminoácido Y326^{7.43} (Figura 16.E). Además, W293^{6.48} aparece cercano de la herkinorina-D-ICM-10 y su furano. Para el sustituyente C4 del esqueleto base de la salvinorina A, tanto en su análogo y en la herkinorina-D-ICM-10 se ubican en los alrededores de W318^{7.35}.

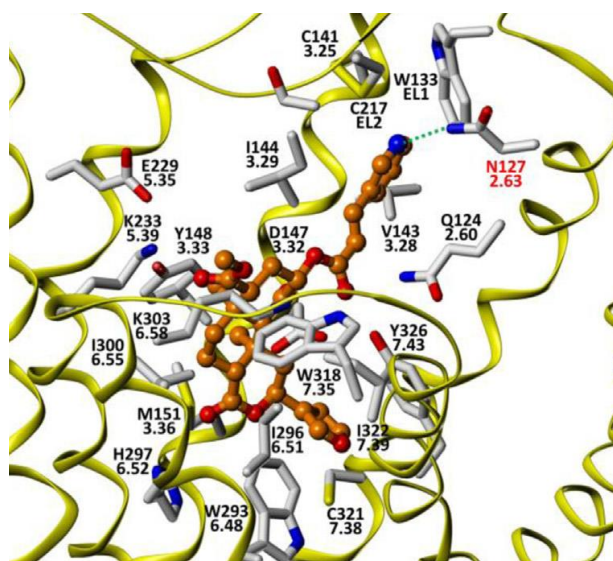


Figura 17. Modelo de unión putativo de un análogo de la salvinorina A con el sustituyente 3-piridil de un carbonilo α - β -insaturado en C2 sobre MOR (Polepally et al., 2014)

Tabla 12. Interacciones proteína-ligando calculadas desde MOE para las poses de la herkinorina seleccionadas en este trabajo.

| Molécula | Aminoácidos |
|--------------------------------|--|
| Ligando co-cristalizado | Q124 W133 V143 I144 D147 Y148 M151 V236 W293 I296 H297 V300 W318 I322 Y326 |
| Herkinorina-D-ICM-1 | A117 Q124 W133 V143 I144 D147 Y148 N150 M151 C217 V236 W293 I296 H297 V300 W318 I322 G325 Y326 S329 |
| Herkinorina-D-ICM-10 | Q124 W133 V143 I144 D147 Y148 M151 C217 K233 V236 W293 I296 H297 V300 K303 W318 I322 G325 Y326 |

La ausencia de contactos con MOR para la herkinorina-D-ICM-1, la herkinorina-D-ICM-10 y el ligando cristalográfico BU72, se representa en colores. En donde, una coloración roja indica los contactos presentes en la herkinorina-D-ICM-1 y la herkinorina-D-ICM-10 y ausentes para el ligando cristalográfico BU72. Una coloración verde para los contactos presentes sólo en la herkinorina-D-ICM-1 y ausentes para la herkinorina-D-ICM-10 y BU72. Y por último, una coloración azul para los contactos presentes en la herkinorina-D-ICM-10 y ausentes en la herkinorina-D-ICM-1 y BU72.

Comparando las poses D-ICM-1 y D-ICM-10 de la herkinorina, se observa que pueden generar un mapa de contactos similar con los aminoácidos de MOR (Tabla 12, Figuras 15.E y 16.E), revelándose principalmente interacciones hidrofóbicas del ligando debidas a sus sustituyentes aromáticos o a su estructura cíclica carbonada. La posición de la herkinorina-D-ICM-1 tiene contactos únicos en los aminoácidos A117^{2,53}, N150^{3,35} y S329^{7,46} (Tabla 12); este sitio está ubicado más internamente en el

receptor y hace contactos con el sustituyente C2-beziloxi de la herkinorina. Se ha encontrado que la mutación S329A hace que DAMGO pierda actividad efectiva, mientras que la morfina y fentanil la aumentan, así que puede ser una interacción clave en la herkinorina (Pil *et al.*, 2003). Por otra parte, la herkinorina-D-ICM-10 tiene contactos únicos con K233^{5.39} y K303^{6.58} (Figura 16.E y Tabla 12); este último aminoácido se orienta hacia la parte extracelular del receptor e interacciona con el sustituyente –COOCH₃ de la posición C4 de la herkinorina. Se observaron experimentos donde al cambiar en KOR los aminoácidos E297K (homólogo de K303^{6.58} en KOR), Y313H, Y312W y S310V se puede tener las mismas afinidades con DAMGO que cuando se utiliza a MOR nativo, sugiriendo ser clave en selectividad (Seki *et al.*, 1998). La selección de alguna de las posiciones ayudará para discernir la ubicación de análogos de la salvinorina A con características especiales como selectividad y las diferentes rutas de en la cascada de señalización que pueden desencadenar. Aquí, se propone un estudio más detallado con dinámicas moleculares y cálculos de energías absolutas de unión entre proteína y ligando.

5.3.2 *Docking* de DAMGO en MOR.

Si comparamos los mejores modos de unión respecto a los puntajes de ICM y MOE, encontramos que estas dos conformaciones obtenidas de DAMGO tienen una diferencia de 7.88 Å entre las *poses* DAMGO-D-ICM-1 y DAMGO-MOE-D1-A. Sin embargo, la segunda mejor *pose* en los resultados de ICM (DAMGO-D-ICM-2) se observa que va en un sentido similar al resultado de DAMGO-MOE-D1-A, con un RMSD de 4.01 Å. Las orientaciones se pueden ver en la Figura 18. El resultado indica que DAMGO-D-ICM-1 y DAMGO-D-ICM-2 o DAMGO-MOE-D1-A también tienen que estar en cuenta para los estudios de dinámica molecular de DAMGO. Pero basados en los resultados de emplazamiento de los ligandos cristalográficos y de los resultados del *docking* cruzado para la herkinorina entre ICM y MOE, para los estudios posteriores se elegirán las conformaciones y orientaciones provenientes sólo de ICM.

Por otra parte, la discusión acerca de la orientación de DAMGO en estudios previos de *docking* y dinámica molecular indican que la tirosina de esta molécula se orienta en dirección al aminoácido H297^{6.52} y su amina primaria hacia D147^{3.32}, hecho obtenido al usar el agonista etorfina en MOR como plantilla para DAMGO (Shim *et al.*, 2013) o por resultados de *docking* molecular basados en datos experimentales recolectados (Bartuzi *et al.*, 2015). Además, un cristal inactivo de DOR que enlaza al péptido antagonista DIPP-NH₂, el cual posee una estructura similar DAMGO presenta la característica de una conexión entre el grupo fenol y H297^{6.52} mediante puentes de hidrógeno pasando por dos moléculas de aguas (Fenalti *et al.*, 2015). En este sentido, las *poses* DAMGO-D-ICM-1 y DAMGO-D-ICM-2 para DAMGO pueden interactuar con D147^{3.32}, pero no cumplen el requisito del fenol hacia H297^{6.52}. La primera *pose* en ICM que es similar al modelo es DAMGO-D-ICM-24, por lo que también fue considerada para los estudios de dinámica molecular.

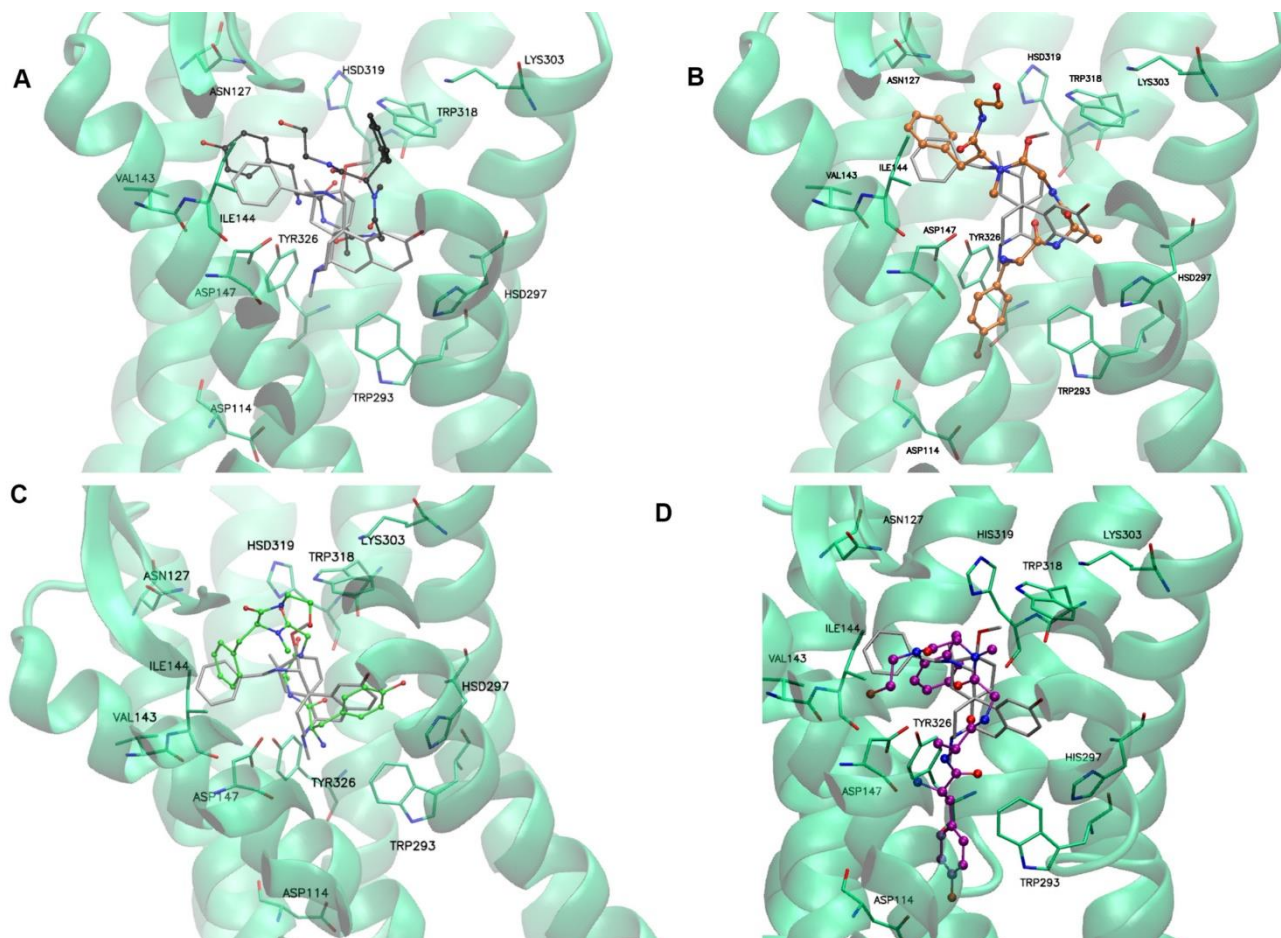


Figura 18. Orientación de las poses del docking de DAMGO en MOR. (A) DAMGO-D-ICM-1, (B) DAMGO-D-ICM-2, (C) DAMGO-D-ICM-24 y (D) DAMGO-MOE-DI-A.

5.3.2.1 DAMGO-D-ICM-1 en MOR

Este modo de unión encontrado llama la atención por ubicar al grupo fenol de la tirosina de DAMGO de una manera similar que el grupo fenilo del ligando cristalográfico BU72, ubicándose en los alrededores de V143^{3.28} y I144^{3.29} de la TM3 (Figura 19). Así, mismo se encuentra que el aminoácido N127^{2.63} a pesar de que no hace contacto, está en las inmediaciones del grupo fenol. Este aminoácido fue encontrado como relevante para la selectividad entre DOR y MOR, debido que DAMGO sí se une a DOR al mutar L108^{2.63}N, recordando que DAMGO es selectivo para MOR (Minami *et al.*, 1996). Por otra parte, contactos con el aminoácido H297^{2.52} son importantes para mantener la afinidad de algunos agonistas, en especial de DAMGO (Spivak *et al.*, 1997). En este modelo, DAMGO-D-ICM-1, no se generan contactos directos pero no se descarta la posibilidad de interacciones mediadas por moléculas de agua entre el ligando y el receptor como se observa en el cristal en el estado activo de MOR (Huang *et al.*, 2015). Respecto al aminoácido Y326^{7.43}, cuando se muta por un aminoácido Y326F decrece la afinidad de DAMGO, indicando una posible interacción de puente de hidrógeno con el ligando (Pil *et al.*, 2003), la cual se observa en el gráfico de contactos de MOE para DAMGO-D-ICM-1. Una diferencia en el reconocimiento de la selectividad de DAMGO entre KOR y MOR se debe a los aminoácidos K303^{6.58}, S310^{ECL3}, V316^{7.33}, W318^{7.35} y H319^{7.36} según mutaciones en KOR y la recuperación de la afinidad de DAMGO (Seki *et al.*, 1998). Guiándonos por los contactos mostrados de DAMGO-D-ICM-1 se encuentra

5.3.2.3 DAMGO-D-ICM-24 en MOR

Esta conformación (Figura 21.A) resultó particularmente interesante ya que presenta una configuración *cis* entre el fenol de DAMGO y su cadena principal, esto es observado experimentalmente en el péptido DIPP-NH₂ co-cristalizado en el estado inactivo de DOR con PDBID 4RWA (Figura 21.B) y 4RWD (Fenalti *et al.*, 2015). Otros estudios ha propuestos modos de unión en MOR y DOR para péptidos agonistas, que tienen características compartidas con DAMGO. Dichos modos de unión vienen desde modelos por homología construidos con plantillas de cristales de GPCRs, dinámica molecular y *docking* los cuales ubican igualmente al grupo fenol de las moléculas hacia el aminoácido H297^{6.52} y en posición *cis* respecto a su cadena principal (H. I. Mosberg *et al.*, 2002; Henry I. Mosberg *et al.*, 2013; L. C. Purington *et al.*, 2011). DAMGO-D-ICM-24 genera un contacto con el aminoácido implicado en selectividad, W318^{7.35}, pero deja de tener contacto con el aminoácido N127^{2.63} igualmente importante en la selectividad de este ligando hacia MOR. Por otro lado, el grupo amonio cuaternario a pesar de estar cerca del aminoácido D147^{3.32} se muestra en una dirección hacia M151^{7.36}. A pesar de esto es la conformación que puede acercarse más al resultado cristalográfico de DOR, sin olvidar que se trabaja en su análogo MOR.

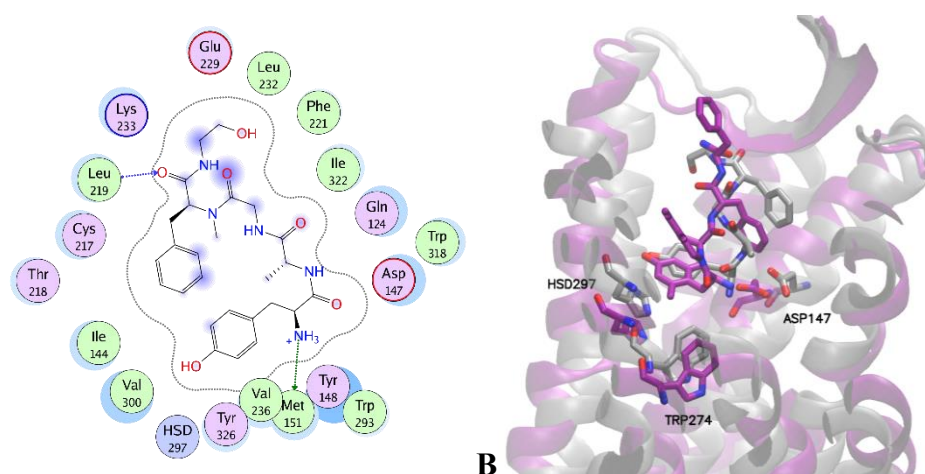


Figura 21. DAMGO-D-ICM-24 y referentes cristalográficos. (A) Contactos de DAMGO en la conformación D-ICM-24 en MOR. (B) Comparación entre DAMGO en MOR (gris) y DIPP-NH₂ en DOR (4RWA, violeta). El mapa de interacción se muestra en el Anexo B.

5.4 Dinámicas moleculares

Los estudios de alineamiento y *docking* (secciones 5.2 y 5.3) fueron realizados para la selección de los puntos de partida para las simulaciones de dinámica molecular. Para la morfina y naloxona se seleccionaron aquellas obtenidas desde las orientaciones de los alineamientos flexibles. Para DAMGO y la herkinorina se usaron las poses obtenidas del *docking* de ICM nombradas como DAMGO-D-ICM-1, DAMGO-D-ICM-2 y DAMGO-D-ICM-24 y herkinorina-D-ICM-1 y herkinorina-D-ICM-10. Cabe mencionar que para la morfina, DAMGO y herkinorina se utilizó MOR en el estado activo, mientras para la naloxona se usó el estado inactivo.

En todas las dinámicas moleculares del receptor MOR, en su conformación activa, tuvieron el mismo sistema de coordenadas iniciales tanto del receptor, la membrana lipídica (POPC/POPE/CHL), las coordenadas de moléculas de agua de hidratación dentro del receptor, moléculas de agua del entorno y

para los iones. La dinámica en el receptor inactivo presenta diferentes ubicaciones de las moléculas de la membrana, moléculas de agua e iones respecto al receptor activo. Se añadió Na^+ en cercanías de D114^{2.50} para MOR activo e inactivo, que es predicho para algunos receptores de la familia en cristalografía de alta resolución como Adenosina A2A, β 1-adrenérgico y DOR como se discute en algunos trabajos (Bartuzi *et al.*, 2016; Cheng *et al.*, 2016). Se encontró que para DOR el Na^+ se ubica entre D^{2.50}, N^{3.35} y S^{3.39} que de igual manera están presentes MOR. Cuando no se añadió Na^+ en el receptor activado, el aminoácido D114^{2.50} fue puesto neutro como sugieren algunos trabajos (Huang *et al.*, 2015).

La hidratación del interior del receptor, antes de emplazar al ligando, permitió obtener resultados consistentes y confiables, tanto en el estado activo como en el inactivo. La hidratación requirió un tiempo de simulación de 1 ns para generar posiciones y orientaciones consistentes de las moléculas de agua dentro de las estructuras de MOR.

Las dinámicas moleculares en general se observaron estables excepto en el sistema de la herkinorina-D-ICM-10 y el sistema de DAMGO-D-ICM-2. El estudio de las dinámicas moleculares en la morfina y DAMGO-D-ICM-24 colocando o no Na^+ en cercanía de D114^{2.50} desprotonado y protonado, respectivamente, ayuda para soportar al sodio como modulador en la activación y la transición de los caminos de señalización de proteína-G y hacia a caminos de señalización de las β -arrestinas, propuesto desde datos para DOR (Katritch *et al.*, 2014). El estudio de las *poses* herkinorina-D-ICM-1 y herkinorina-D-ICM-10 fue hecho en ausencia de Na^+ y se justifica debido a que la herkinorina-D-ICM-1 ubica al sustituyente benziloxi en el sitio alostérico del sodio y porque la herkinorina-D-ICM-10 dio una energía libre de unión pobre, la cual podría disminuir aún más agregando el sodio alostérico como se encontró en la morfina y DAMGO-D-ICM-24, sustentado además experimentalmente por encontrarse dependencia de la concentración de sodio en algunos agonistas.

Para DAMGO se estudió la dinámica con y sin Na^+ usando a D114^{2.50} desprotonado y protonado, respectivamente, para DAMGO-D-ICM-1 y DAMGO-D-ICM-24. La primera por ser la más cercana a la energía experimental de unión proteína-ligando y la segunda por ser la configuración más cerca a lo encontrado en los datos cristalográficos de DOR. DAMGO-D-ICM-2 ubica un grupo fenol en el sitio alostérico del sodio impidiendo el estudio en presencia de sodio en dicho sitio. En todas las *poses* de DAMGO se predicen energías libres de unión más elevadas que a la referencia experimental, detallada más adelante.

Los cálculos de las energías absolutas de unión proteína-ligando tienen resultados a discutir en la orientación de la morfina y DAMGO especialmente cuando se presenta o no el ion Na^+ en cercanías de D114^{2.50} desprotonado o protonado, respectivamente. Los cálculos de energía libre para las conformaciones de la herkinorina ayudaron a distinguir entre los dos modos de unión propuestos, mientras la cercanía con el valor experimental hace que la balanza gire hacia uno de estos. Para DAMGO se encuentra que los valores de la energía libre calculados para todas las configuraciones, no correspondieron con el valor experimental, aun teniendo una ubicación coherente con algunos datos experimentales de cristalografía y de mutagénesis de MOR. En la naloxona y su configuración con Na^+ , el resultado de la energía fue comparable con lo experimental, sin embargo, no se indagó configuraciones sin sodio alostérico como en la morfina y DAMGO, porque se tenía más interés en la activación de MOR que en su estado inactivo.

El estudio de los contactos, movimientos de algunos residuos, desplazamientos de hélices y lazos de MOR para la herkinorina, morfina y DAMGO, que se mostraran más adelante, abren paso a la observación y deducción de los inicios de la activación del receptor que al final producirán diferentes rutas de señalización y actividad.

5.4.1 Seguimiento estructural, conformaciones y orientaciones de los complejos receptor-ligando

Los puntos finales de cada dinámica fueron comparados respecto de los *docking* iniciales calculando su RMSD, gracias al alineamiento de los esqueletos del receptor (-N-C α -CO-) de los sistemas. Se encontró que la naloxona fue el ligando que menos cambió respecto a la *pose* predicha por el del *docking* (0.747 Å), mientras la configuración que más varió respecto su referencia fue la *pose* herkinorina-D-ICM-10 (5.900 Å). La morfina, en ausencia y presencia de sodio, tuvo valores cercanos de RMSD entre ellos, pero la diferencia está en que en presencia de sodio la estructura de la morfina se adentra un poco en el receptor. La configuración de DAMGO con menos cambio fue DAMGO-D-ICM-1 ya fuese en ausencia o presencia de sodio. DAMGO-D-ICM-24, en ausencia o presencia de sodio, tuvieron mayor cambio respecto de su conformación inicial, comparado con las demás configuraciones de este ligando (DAMGO-D-ICM-1, DAMGO-D-ICM-1+Na⁺ y DAMGO-D-ICM-2). Para la herkinorina se encontró que herkinorina-D-ICM-1 permaneció más cercana al *docking* que herkinorina-D-ICM-10. Esto se representa en la Tabla 13.

Las dinámicas realizadas de la morfina emplazando o no un ion sodio en cercanías de D114^{2.50} desprotonado y protonado, respectivamente, tuvieron un comportamiento similar en el RMSD tanto para el esqueleto del receptor de MOR, como para el propio ligando (Figuras 22.A y 22.B). En ambos sistemas (+Na⁺ y -Na⁺) el esqueleto del receptor se observa un aumento controlado, el cual puede ser esperado por la búsqueda de una nueva conformación activa. El RMSD del ligando morfina varía muy poco teniendo o no el sodio presente y llegan a un equilibrio lo que puede ser problemático para la selección del sistema más real. Además, éste comportamiento no explica la dependencia del sodio en la familia de GPCR, discutida en la literatura (W. Liu *et al.*, 2012; Miller-Gallacher *et al.*, 2014).

Para la herkinorina, las configuraciones herkinorina-D-ICM-1 y herkinorina-D-ICM-10 se dispuso de una carga neutra para el aminoácido D114^{2.50} porque no se emplazó el ion Na⁺ en su vecindad, como ya se explicaba antes en 5.4. Se sabe que la herkinorina no genera fosforilación del receptor, ni reclutamiento de β -arrestina2 en MOR y no produce internalización del receptor en la célula (C. E. Groer *et al.*, 2007). El efecto en la dependencia de sodio en el ambiente de la mutación del aminoácido N131^{3.35} por valina o alanina en DOR (N150^{3.35} de MOR) puede explicar el reclutamiento de las arrestinas (Katritch *et al.*, 2014) y conllevar a una internalización como lo sugieren algunos trabajos (C. E. Groer *et al.*, 2007), mecanismo que puede estar asociado en la generación de dependencia y tolerancia (Keith *et al.*, 1998). En este caso, herkinorina-D-ICM-1 emplazó su grupo C2-benzoiloxi en el lugar donde se ubicó el ion sodio en las dinámicas de la morfina y naloxona (Figura 23). Esto sugiere que el grupo C-2 benziloxi puede estabilizar mejor al aminoácido N150^{3.35}. Así, el resultado representa una ventaja respecto a D-ICM-10 de la herkinorina, la cual tiene el espacio suficiente para que el Na⁺ pueda acomodarse, con posibilidades de entrada y salida como en los sistemas de la morfina y DAMGO; lo que posiblemente resulte en reclutamiento de arrestinas.

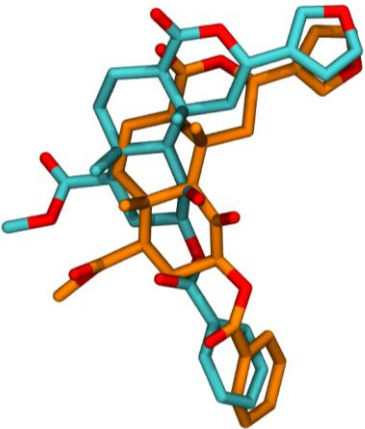
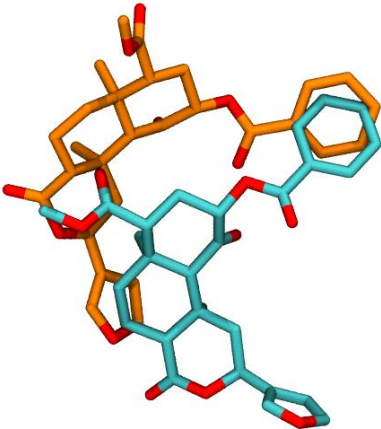


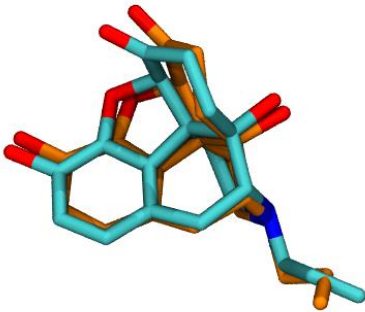
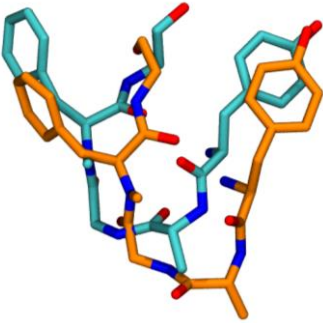
El RMSD del esqueleto del receptor (-N-C α -CO-) de MOR cuando estuvo presente la herkinorina-D-ICM-1 tuvo un aumento constante y controlado, el cual puede suponer los cambios que tiene que hacer el receptor para lograr un nuevo estado activo. Para la herkinorina-D-ICM-10 se observó un cambio más importante cerca de los 100 *ns* (Figura 22.C). El RMSD obtenido para la estructura de la herkinorina-D-ICM-1 tuvo valores más bajos y con menos fluctuaciones que en la conformación de la herkinorina-D-ICM-10 durante los 200 *ns* calculados. Los cambios en el RMSD en la estructura de la herkinorina-D-ICM-10 se deben a que luego de 150 *ns* se generan nuevas conformaciones caracterizadas por el movimiento del grupo furano que se aleja de la orientación propuesta, cerca de Y326^{7,43} (Figura 22.D). Con más detalle, la Figura 24 distingue una transición del grupo furano de la herkinorina-D-ICM-10 desde su punto inicial (verde) y algunos de sus estados intermedios (blanco y azules claros), mientras que algunos estados finales de la dinámica se encuentran alejado al furano más de 4 Å de su posición inicial. La herkinorina-D-ICM-1 conservó sus grupos funcionales espacialmente de inicio (verde) a fin (azul). La poca estabilidad de la herkinorina-D-ICM-10 comenzó a darle peso a la herkinorina-D-ICM-1, además de que en esta última, ya se discutía su cercanía con el aminoácido N150^{3,35}, clave en la actividad de las arrestinas.

En el sistema de la naloxona (Figura 22.E) se observó que el RMSD del esqueleto del receptor tiene un aumento pronunciado luego de los 150 *ns*, que puede deberse a los seis aminoácidos faltantes agregados en el ICL3, (ver a más detalle en los análisis de RMSF). Para el RMSD de la molécula de naloxona, referido a las coordenadas después de equilibrar el sistema, se observó que la conformación en el receptor se mantuvo estable con un par de pequeñas variaciones que no cambian drásticamente las dinámicas moleculares con su valor (Figura 22.F).

Para DAMGO los cambios más pronunciados en el RMSD del esqueleto del receptor (Figuras 22.G y 22.I) están sobre las *poses* DAMGO-D-ICM-1+Na⁺ y en DAMGO-D-ICM-2, mientras la que se observa más estable en las configuraciones de DAMGO-D-ICM-1 (sin Na⁺), DAMGO-D-ICM-24 (sin Na⁺) y DAMGO-D-ICM-24+Na⁺. En principio, DAMGO-D-ICM-24 con y sin sodio alostérico comienzan desde orientaciones sugeridas en trabajos anteriores de dinámica molecular (Bartuzi *et al.*, 2015; Shim *et al.*, 2013) y similar al péptido DIPP-NH₂ en los cristales inactivos de DOR 4RWA y 4RWD (Fenalti *et al.*, 2015). DAMGO-D-ICM-1 fue diferente de DAMGO-D-ICM-1+Na⁺ en el RMSD del esqueleto del receptor a pesar de comenzar de la misma conformación.

Respecto al RMSD de la molécula de DAMGO se observó que DAMGO-D-ICM-24 y DAMGO-D-ICM-1 en ausencia o presencia de sodio presentan una mejor estabilidad durante la dinámica. DAMGO-D-ICM-24 (sin Na⁺) presentó un mayor cambio a su conformación inicial dentro de MOR pero logró estabilidad después de los 50 *ns* (Figuras 22.H y 22.J). La presencia del sodio mejoró la estabilidad desde el inicio de las dinámicas de 200 *ns*, con una mejor estabilización para la configuración DAMGO-D-ICM-24+Na⁺.

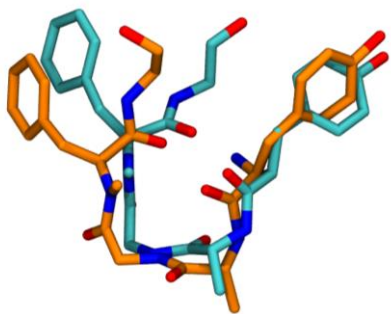
Tabla 13. Comparación entre las posiciones provistas por alineamiento flexible o docking (azul celeste) frente a las posiciones finales luego de 200 ns de dinámica molecular (naranja).

| Herkinorina (D-ICM-1) | Herkinorina (D-ICM-10) |
|---|--|
|  |  |
| 2.094 Å | 5.900 Å |
| Morfina (-Na ⁺) | Morfina (+Na ⁺) |
|  |  |
| 1.764 Å | 1.856 Å |
| Naloxona | DAMGO (D-ICM-1) |
|  |  |
| 0.747 Å | 2.506 Å |

+Na⁺: con sodio alostérico cercano a D114^{2.50} desprotonado.

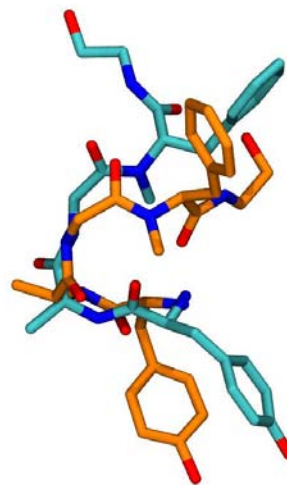
-Na⁺: sin sodio en el sitio alostérico cercano a D114^{2.50} protonado.

DAMGO (D-ICM-1+Na⁺)



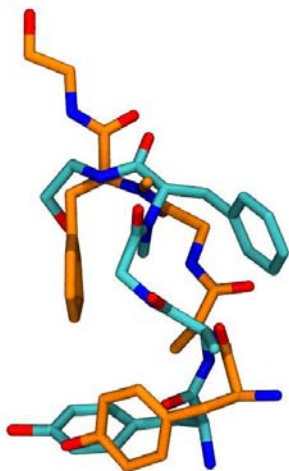
2.246 Å

DAMGO (D-ICM-2)



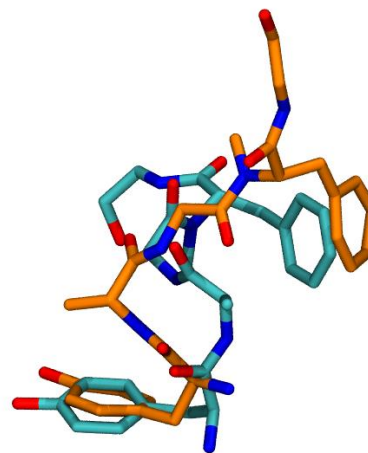
4.400 Å

DAMGO (D-ICM-24)



4.500 Å

DAMGO (D-ICM-24+Na⁺)



5.871 Å

+Na⁺: con sodio alostérico cercano a D114^{2.50} desprotonado.

-Na⁺: sin sodio en el sitio alostérico cercano a D114^{2.50} protonado.

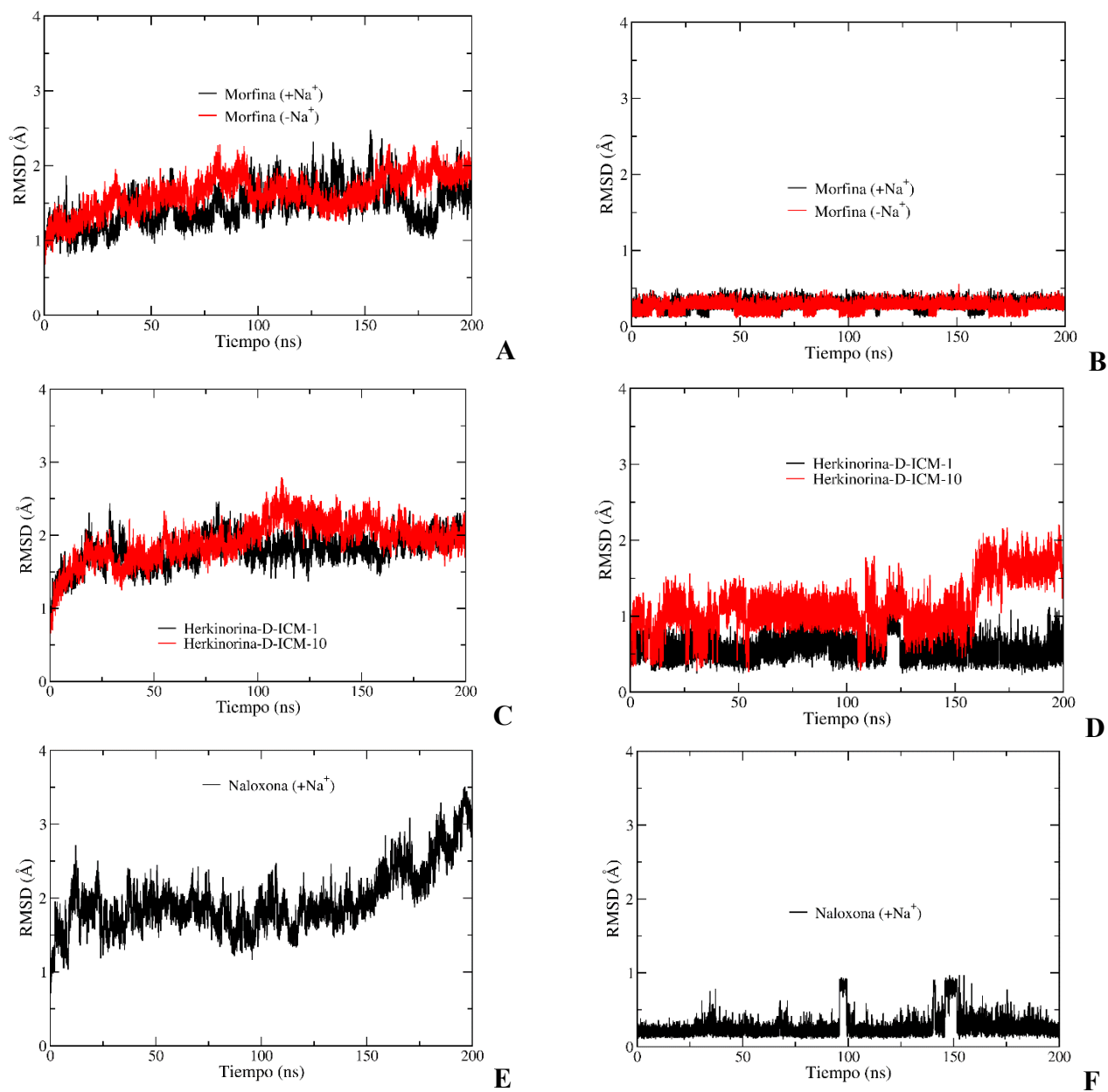


Figura 22. RMSD calculado para el esqueleto (-N-C_α-CO-) de MOR y para cada ligando en su sistema. Las letras A, C, E, G e I representan el RMSD del esqueleto del receptor para el sistema de la morfina, herkinorina, naloxona y DAMGO, respectivamente. Las letras B, D, F, H y J representan el RMSD del ligando para el sistema de la morfina, herkinorina, naloxona y DAMGO, respectivamente. El aumento del RMSD del esqueleto del receptor en la naloxona puede deberse a que el lazo ICL3 tiene una alta fluctuación (ver figura 34). Los RMSD están referidos al punto inicial de los 200 ns de la dinámica molecular luego de las etapas de equilibrio.

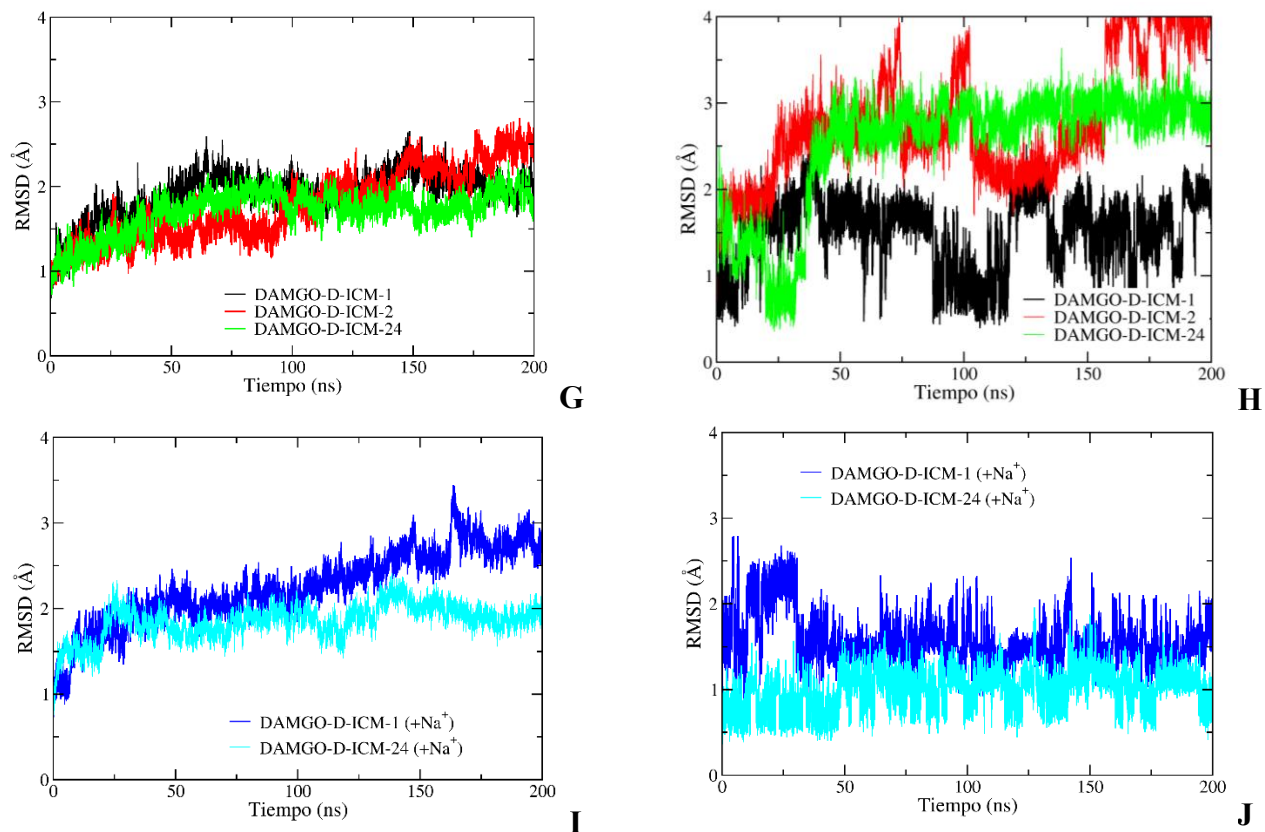


Figura 22. RMSD calculado para el esqueleto (-N-C_α-CO-) de MOR y para cada ligando en su sistema. Las letras A, C, E, G e I representan el RMSD del esqueleto del receptor para el sistema de la morfina, herkinorina, naloxona y DAMGO, respectivamente. Las letras B, D, F, H y J representan el RMSD del ligando para el sistema de la morfina, herkinorina, naloxona y DAMGO, respectivamente. El aumento del RMSD del esqueleto del receptor en la naloxona puede deberse a que el lazo ICL3 tiene una alta fluctuación (ver figura 34). Los RMSD están referidos al punto inicial de los 200 ns de la dinámica molecular luego de las etapas de equilibrio. (Continuación)

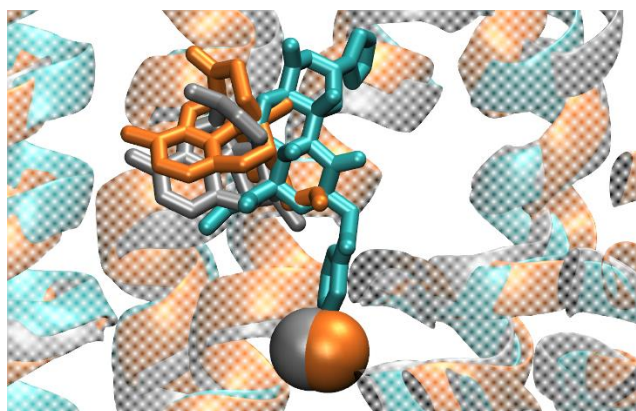


Figura 23. Disposición del ion Na⁺ en las dinámicas de la morfina y naloxona en MOR. La morfina (gris), la naloxona (naranja) y el emplazamiento del grupo C2-benzoiloxi de la herkinorina-D-ICM-1 (cian).

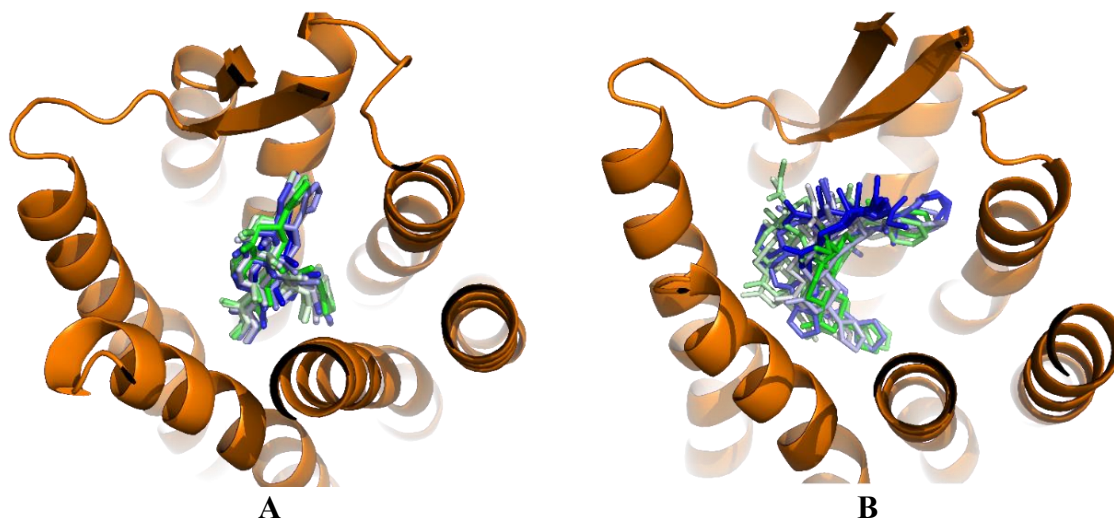


Figura 24. Comportamiento de la herkinorina en sus poses D-ICM-1 (A) y D-ICM-10 (B) dentro de MOR. Los 200 ns se representan por el cambio de color la ubicación de la herkinorina en el receptor, en donde, una coloración verde se usó para las ubicaciones en el inicio de la dinámica, blanco para las de la mitad de la dinámica y azules para las ubicaciones finales.

5.4.2 Cálculo de la energía libre absoluta para la unión proteína-ligando de los agonistas estudiados en MOR

Los valores de la energía libre para la herkinorina y la morfina que se acercaron más a los valores experimentales fueron: herkinorina-D-ICM-1 y morfina+Na⁺. De igual forma, el modelo para la naloxona con un valor más cercano al experimental fue el obtenido en presencia del sodio. Cabe mencionar que no se estudió la naloxona en ausencia de sodio, ya que nuestro estudio se enfoca en la conformación activa del receptor. En estas tres configuraciones, las energías libre calculadas fueron consistentes al tener valores más negativos que los valores experimentales (~ 0.6 kcal/mol más negativos).

Los cambios de la energía libre se apreciaron con mayores diferencias en los sistemas acoplado las interacciones electrostáticas entre el ligando y el entorno ($20 \leq \text{Etapa} \leq 40$). Esto sucedió después de aplicar las interacciones de Van der Waals (Vdw) ya anteriormente acopladas desde $0 \leq \text{Etapa} \leq 20$ y encendidas para el intervalo de $20 \leq \text{Etapa} \leq 40$ (Figuras 25 y 26). La Figura 25 muestra la variación acumulativa de la energía libre. Para obtener el valor real de la energía libre el número graficado debe de ser multiplicado por kT , donde k es la constante de Boltzmann y T la temperatura en escala Kelvin (310 K, en nuestro caso).

5.4.2.1 Volumen del sitio de unión en MOR

Como un primer paso en la corrección de la energía libre del sistema proteína-ligando se necesitó conocer aproximadamente el volumen de confinamiento por haber restringido al ligando en el volumen del sitio activo del receptor. Dicho volumen puede definirse y calcularse desde:

$$V_{Bolsillo}(t) = V_R(t) - V_{R-L}(t) \quad (5.1)$$

El volumen del bolsillo de unión, $V_{Bolsillo}(t)$ fue calculado restandole al volumen que rodea al receptor $V_R(t)$, el volumen que rodea al complejo receptor ligando $V_{R-L}(t)$. Cada volumen cambió con el tiempo de simulación y la resta se hizo en cada punto de dicho tiempo.

Para la herkinorina se observó una diferencia en el volumen del bolsillo de unión entre la herkinorina-D-ICM-1y herkinorina-D-ICM-10. Esta diferencia se reflejó en el RMSD calculado para las dos conformaciones (Figura 22.D), indicando que la herkinorina-D-ICM-1 fue más estable y tuvo mejor complementariedad en el receptor. Por su parte, la herkinorina-D-ICM-10, al generar un volumen más grande, sugirió un acoplamiento menos estable respecto a herkinorina-D-ICM-1. En el caso de las simulaciones de la morfina colocando o no el ion sodio cerca del aminoácido D144^{2.50} desprotonado y protonado, respectivamente, no se encontraron diferencias significativas entre los volúmenes del sitio de unión, algo esperado si la conformación en el interior del receptor fue similar para las dos simulaciones (ver RMSD en la Figura 22.B). Mientras que para DAMGO, a pesar de presentar distintas configuraciones en los inicios de la dinámica, al final de la simulación se obtuvo que el volumen del sitio de unión fue igual para todas sus *poses*, excepto para DAMGO-D-ICM-24+Na, la cual fue significativamente más grande que DAMGO-D-ICM-1 en presencia y ausencia de sodio (Tabla 14).

Por otro lado, como es de esperarse, al ser distintas moléculas, se encontraron diferencias entre los volúmenes del sitio de unión para la herkinorina-D-ICM-1 frente a las conformaciones de la morfina, naloxona o DAMGO. Mientras la morfina y naloxona ocuparon similares volúmenes del bolsillo de unión, al poseer conformaciones y ocupaciones similares (Tabla 14).

Habiendo calculado los volúmenes aproximados del confinamiento de las moléculas, se procedió a calcular el valor del segundo término energético de la energía libre del complejo receptor-ligando (Gilson *et al.*, 1997):

$$\Delta \bar{G}_{Proteína}^{(0 \rightarrow 1)} = \int_0^1 \frac{\sum_{i=1}^N \langle \frac{\delta U}{\delta \lambda} \rangle_{\lambda, i}}{N} d\lambda + RT \ln \left(\frac{V_{Bolsillo}}{V^o} \right) \quad (5.2)$$

Este segundo término de la energía aparece luego de restringir al ligando no interactuante (gas ideal) en el volumen del sitio receptor que es un volumen más pequeño que el de la fase, “*bulk*”. Esto genera una contribución a la energía libre (Gilson *et al.*, 1997). Los resultados se muestran en la (Tabla 14).

5.4.2.2 Energía libre de unión receptor-ligando para la herkinorina en MOR

Se obtuvo una diferencia significativa entre la energía de la herkinorina-D-ICM-1 y la herkinorina-D-ICM-10, de aproximadamente ~ 7.6 kcal/mol (Tabla 15). Estudiar el efecto de incluir al sodio en la región alostérica cerca de D114^{2.50} en la conformación D-ICM-10 no fue necesario porque su energía libre de unión es muy baja, además de que experimentalmente aumentar la concentración de sodio en el medio hace que la afinidad de los agonistas de mu decrezcan y por ende también desfavorece sus energías de unión (Emmerson *et al.*, 1994; Pert *et al.*, 1974; Yabaluri *et al.*, 1997), así se obtendría una energía de unión mucho más desfavorable que la calculada emplazando el sodio en el sitio alostérico, alejándose más de la energía libre experimental como ocurrió para las configuraciones de la morfina y DAMGO-D-ICM-24.

La herkinorina-D-ICM-1 fue más acorde con la energía experimental. Tampoco se estudió la ausencia o presencia de sodio en D-ICM-1 por el emplazamiento del grupo benziloxi en la región alostérica del sodio solapando con la ubicación dicho ion sodio lo que desfavorece la presencia del catión. Esto hace pensar que la conformación de la herkinorina no depende de ese sodio alostérico, que parece ser energéticamente desfavorable (visto en las configuraciones de morfina y DAMGO-ICM-24). La herkinorina-D-ICM-1 podría realizar un control en esta región alostérica con su grupo benziloxi, haciendo el trabajo que hace normalmente el ion sodio para que no se genere señalización vía arrestinas.

5.4.2.3 Energía libre de unión receptor-ligando para la morfina y naloxona en MOR

Con la morfina se encontró algo muy interesante. La conformación energéticamente más favorable fue en la ausencia del sodio en el sitio alostérico por ~ 3.1 kcal/mol (Tabla 15). Diferencia que puede sustentar el hecho de que dinámicas moleculares en el receptor de adenosina A_{2A} en su conformación inactiva, llegan a la conclusión de que los movimientos de las hélices TM3 y TM7 pueden colapsar el sitio de unión del sodio en GPCRs y hacer que este ion migre. También, podría explicar en parte porque la hidromorfina (análogo de la morfina) y la mayoría de agonistas de opioides se unen menos con el receptor cuando se realizan los estudios experimentales variando concentraciones de sodio en el medio (Emmerson *et al.*, 1994; Pert *et al.*, 1974; Yabaluri *et al.*, 1997).

En la morfina, la energía libre más cercana a la experimental fue en la que el sodio está presente con morfina. Esto no quita el hecho de que el ion sodio migre como muestran algunos estudios con dinámicas moleculares, los cuales explican como el sodio puede egresar en el receptor por la parte extracelular y por la zona intracelular (Shang *et al.*, 2014). Suponiendo que el ligando entra en presencia de sodio y luego quizás por estar a favor de la energía libre (la morfina en ausencia de sodio se mostró más afín en nuestro trabajo, Tabla 15) o por atravesar el gradiente electroquímico (~ 3 kcal/mol en favor), el ion salga hacia el interior de la célula (Katritch *et al.*, 2014). Dependerá de alguna forma de la conformación que adopte el receptor en ausencia del sodio alostérico, la cual pueda seguir unida o no a la proteína-G o ser más apta para la unión de otra estructura intracelular como una cinasa, arrestina, etc. El hecho de que la falta de sodio en dicho sitio alostérico pueda llevar al reclutamiento de arrestinas por parte del receptor, como se propone para DOR a través de los estudios de mutagénesis en N^{3.35} por alanina y valina (Fenalti *et al.*, 2014; Katritch *et al.*, 2014), puede explicar la pérdida del ion sodio en presencia de la morfina para que generen pasos subsecuentes en la unión con arrestina, la cual comúnmente no ocurre en condiciones normales pero que es probable bajo ciertas condiciones (C. E. Groer *et al.*, 2007). También, al ser la energía libre más favorable en ausencia de sodio alostérico con la morfina puede que impida que el sodio alostérico vuelva a entrar en el receptor.

La naloxona se estudió en presencia de sodio debido a que en DOR se encuentran cristales con el ion sodio en la región alostérica del aminoácido D^{2.50} es el estado inactivo (Fenalti *et al.*, 2014; Fenalti *et al.*, 2015). Además, resultados experimentales demuestran que la afinidad de antagonistas muy similares a naloxona como la naltreoxona no dependen de la concentración de sodio en el ambiente (Yabaluri *et al.*, 1997), hace pensar que no es necesario en el sitio. Pero, respecto a la activación de los receptores opioides se comenta que en presencia o ausencia de un ligando, está la posibilidad de que se emplace el sodio en dicho sitio alostérico (Katritch *et al.*, 2014; Shang *et al.*, 2014). Entonces, es de importancia estudiar al estado inactivo en presencia de sodio ya que la concentración extracelular lo contiene y es muy probable que esté presente en el receptor antes de que el ligando entre.

La energía libre de unión entre receptor y ligando calculada para la naloxona emplazando el sodio mencionado fue cercana al valor experimental de la energía libre y sigue la misma tendencia para la herkinorina-D-ICM-1 y la morfina+Na⁺ de valores de energía un poco más afines que el valor experimental (~ 0.6 kcal/mol).

5.4.2.4 Energía libre de unión receptor-ligando para DAMGO en MOR

Para DAMGO los resultados de la energía libre de unión no son satisfactorios para las conformaciones estudiadas, al estar alejadas al valor experimental comparado con la herkinorina, morfina y la naloxona. Es posible que los parámetros del campo de fuerza asignados no fueron los suficientes y óptimos, además de que DAMGO tiene más grados de libertad dificultando el muestreo de las dinámicas o puede que haya eventos termodinámicos acoplados con DAMGO, diferentes de la herkinorina y la morfina. Esto sugiere una mejor elección de sistemas en los que esté presente DAMGO y macromoléculas acopladas al receptor, mejor parámetros o conformaciones de DAMGO que sean distintas a D-ICM-1, D-ICM-2 y D-ICM-24. También, se debe tener en cuenta que DAMGO genera, experimentalmente, cambios conformacionales en la región amino terminal del receptor, lo cual es detectado por resonancia magnética nuclear (Huang *et al.*, 2015; Sounier *et al.*, 2015). Hay que tener en cuenta que los aminoácidos amino terminales fueron removidos de la estructura de MOR en nuestras dinámicas.

La *pose* con la energía de unión más cercana a la energía libre experimental fue DAMGO-D-ICM-1, evaluado sin la presencia de sodio, con una diferencia promedio de ~ 10.86 kcal/mol, mostrando más afinidad comparada con la experimental (Tabla 15). La afinidad debe disminuir en presencia de sodio (Emmerson, 1994), pero la configuración DAMGO-D-ICM-1+Na⁺ incluyendo el ion sodio cerca del aminoácido D114^{2.50} desprotonado, tuvo una energía significativamente igual que DAMGO-D-ICM-1 en ausencia de sodio con D114^{2.50} protonado. Las energías libre para las *poses* DAMGO-D-ICM-2 y DAMGO-D-ICM-24 (presencia y ausencia de sodio) se puntuaron más favorables que D-ICM-1. Esto, caso contrario a lo que propone el *docking* de ICM. Según esta nueva forma de colocarlas, DAMGO-D-ICM-24 estaría más afin a MOR. Lo que va en acuerdo con algunos modelos para péptidos en MOR y para DIPP-NH₂ en el cristal 4RWA y 4RWD de DOR (Fenalti *et al.*, 2015). Pero la energía difiere de la experimental en ~ 25.6 kcal/mol. DAMGO-D-ICM-2 ocupa un grupo fenol donde se posiciona el sodio alostérico, así que no se realizó estudios en presencia de este ion en dicho sitio.

Por otra parte, DAMGO-D-ICM-24 en presencia de sodio alostérico desfavorece la energía de afinidad en ~ 10 kcal/mol respecto a su misma configuración en ausencia de sodio. Esto sí logra explicar la disminución de la afinidad cuando se va aumentando la concentración de sodio en el ambiente (Emmerson *et al.*, 1994). Por ser la conformación que representa la dependencia del sodio alostérico y por estar de acuerdo con propuestas anteriores de modelos de unión de DAMGO, la configuración DAMGO-D-ICM-24 se usó para efectos comparativos en este estudio.

Como tal, la presencia y ausencia de sodio en nuestro estudio no podría compararse con los valores de afinidades experimentales, ya que en dichos ensayos se varía la concentración en el ambiente y en nuestro caso la concentración de sodio en el ambiente fue igual, aunque se demuestra la dependencia del ion sodio en el sitio alostérico por el cambio de energía libre principalmente con las configuraciones morfina y DAMGO. Dicha migración del ion sodio se puede incluir en la explicación de los procesos subsecuentes a la activación. Así, como la diferencia relativa de energía libre de DAMGO-D-ICM-24 en presencia y ausencia de sodio alostérico (~ 10 kcal/mol) es mucho más grande que para la diferencia relativa entre la morfina en presencia o ausencia de sodio (~ 3.1 kcal/mol), se podría explicar de una manera cualitativa el

por qué DAMGO recluta más fácilmente arrestina, ya que se favorece la pérdida del sodio alostérico y se favorecería los subsecuentes procesos de la señalización hasta el reclutamiento de las arrestinas y la internalización del receptor.

Tabla 14. Volumen del bolsillo de unión para cada sistema y configuración de los ligandos estudiados mediante la energía libre alquímica dentro del receptor opioide μ .

| Molécula | Volumen alrededor del receptor $V_R(t)$ | Volumen alrededor de la proteína-ligando $V_{R-l}(t)$ | Volumen del bolsillo de unión* $V_{Bolsillo}(t)$ |
|------------------------------------|---|---|--|
| Herkinorina (D-ICM-1) | 71948.34 (2009.37) | 71557.78 (2010.61) | 390.57 (34.17) |
| Herkinorina (D-ICM-10) | 66539.64 (3084.63) | 65978.02 (3079.84) | 561.62 (39.66) |
| Morfina (+ Na ⁺) | 73474.95 (2048.69) | 73206.60 (2048.54) | 268.35 (32.67) |
| Morfina | 67903.44 (2387.35) | 67606.83 (2388.01) | 296.61 (35.96) |
| Naloxona (+ Na ⁺) | 77856.10 (2496.39) | 77595.77 (2493.03) | 260.28 (31.74) |
| DAMGO (D-ICM-1) | 63906.94 (2434.99) | 63430.51 (2431.16) | 476.43 (33.21) |
| DAMGO (D-ICM-1 + Na ⁺) | 70496.94 (2355.07) | 70025.45 (2353.06) | 471.49 (45.48) |
| DAMGO (D-ICM-2) | 63255.28 (2161.69) | 62726.79 (2154.28) | 528.49 (44.40) |
| DAMGO (D-ICM-24+Na ⁺) | 68416.91 (2061.90) | 67834.51 (2057.98) | 582.40 (42.06) |
| DAMGO (D-ICM-24) | 63414.54 (2425.41) | 62895.10 (2422.30) | 519.44 (43.65) |

* $V_{Bolsillo}$ es el promedio de las restas punto a punto en cada tiempo de la dinámica entre V_R y V_{R-l}

Tabla 15. Energía libre alquímica para las uniones receptor-ligando de los sistemas estudiados en MOR.

| Moléculas | Energía libre de Gibbs (kcal/mol) | | | | | Referencia | Radioligando para la afinidad |
|---------------------------------------|---|---------------------------------------|---|---|--|--|-------------------------------|
| | $\Delta G_{Proteina}^{(0 \rightarrow 1)}$ | $\Delta G_{Agua}^{(0 \rightarrow 1)}$ | $-RT \ln \left(\frac{V_{Bolsillo}}{V_o} \right)$ (Corrección) | $\Delta G_{Unión}^{(0 \rightarrow 1)}$ (310 K) | $\Delta G_{Unión}^{Exp. (*)}$ (298 K) | | |
| Herkinorina (D-ICM-1) | -35.23 (1.14) | | 0.89 (0.05) | -11.52 (1.14) | -10.91 (0.20) | (H Xu <i>et al.</i> , 2007) | [35S]-GTP- γ -S |
| Herkinorina (D-ICM-10) | -27.40 (0.55) | -22.83 (0.10) | 0.67 (0.04) | -3.90 (0.56) | -10.80 (0.05) | (Harding <i>et al.</i> , 2005) | [125I]-IOXY |
| | | | | | -10.02 (ND) | (Ji <i>et al.</i> , 2013) | [3H]-DAMGO |
| Morfina (+Na ⁺) | -67.73 (0.23) | | 1.12 (0.08) | -12.88 (0.29) | -12.27 (0.02) | (Schiller <i>et al.</i> , 2000) | [3H]-DAMGO |
| Morfina | -70.95 (0.39) | -53.73 (0.14) | 1.06 (0.08) | -16.17 (0.42) | -11.92 (0.2) | (Mignat <i>et al.</i> , 1995) | [3H]-DAMGO |
| | | | | | -11.71 (0.01) | (Iyer <i>et al.</i> , 2012) | [3H]-DAMGO |
| Naloxona (+ Na ⁺) | -64.67 (0.43) | -50.57 (0.06) | 1.14 (0.08) | -12.97 (0.44) | -12.41 (0.02) | (Peng <i>et al.</i> , 2007) | [3H]-DAMGO |
| | | | | | -11.93 (0.08) | (Magnan <i>et al.</i> , 1982) | [3H]-DAMGO |
| | | | | | -11.89 (ND) | (Lewanowitsch <i>et al.</i> , 2003) | [3H]-DAMGO |
| DAMGO (D-ICM-1) | -84.83 (1.20) | | 0.77 (0.04) | -23.39 (1.24) | | | |
| DAMGO (D-ICM-1 + Na ⁺) | -86.07 (1.23) | -60.68 (0.31) | 0.78 (0.06) | -24.63 (1.27) | -12.91 (0.12) | (Zadina <i>et al.</i> , 1997) | [3H]-DAMGO |
| DAMGO (D-ICM-2) | -89.44 (0.77) | | 0.71 (0.05) | -28.08 (0.83) | | | |
| DAMGO (D-ICM-24) | -99.79 (0.57) | | 0.72 (0.05) | -38.42 (0.65) | -12.15 (0.06) | (G.-M. Zhao <i>et al.</i> , 2003) | [3H]-DAMGO |
| DAMGO (D-ICM-24+Na ⁺) | -88.32 (0.88) | | 0.65 (0.05) | -27.02 (0.93) | | | |

Los datos en paréntesis para los valores calculados son errores estándares de un muestreo independiente. ND = No Determinado.

(*) Energía libre de unión medida de forma experimental, mediante el uso de ligandos de referencia marcados con isótopos radiactivos. Los valores experimentales fueron hallados desde los K_i reportados, usando las expresiones:

$$\ln(K_i) = -\ln(K_b), \quad \Delta G_b = -RT \cdot \ln(K_b), \quad \Delta G_b = RT \cdot \ln(K_i)$$

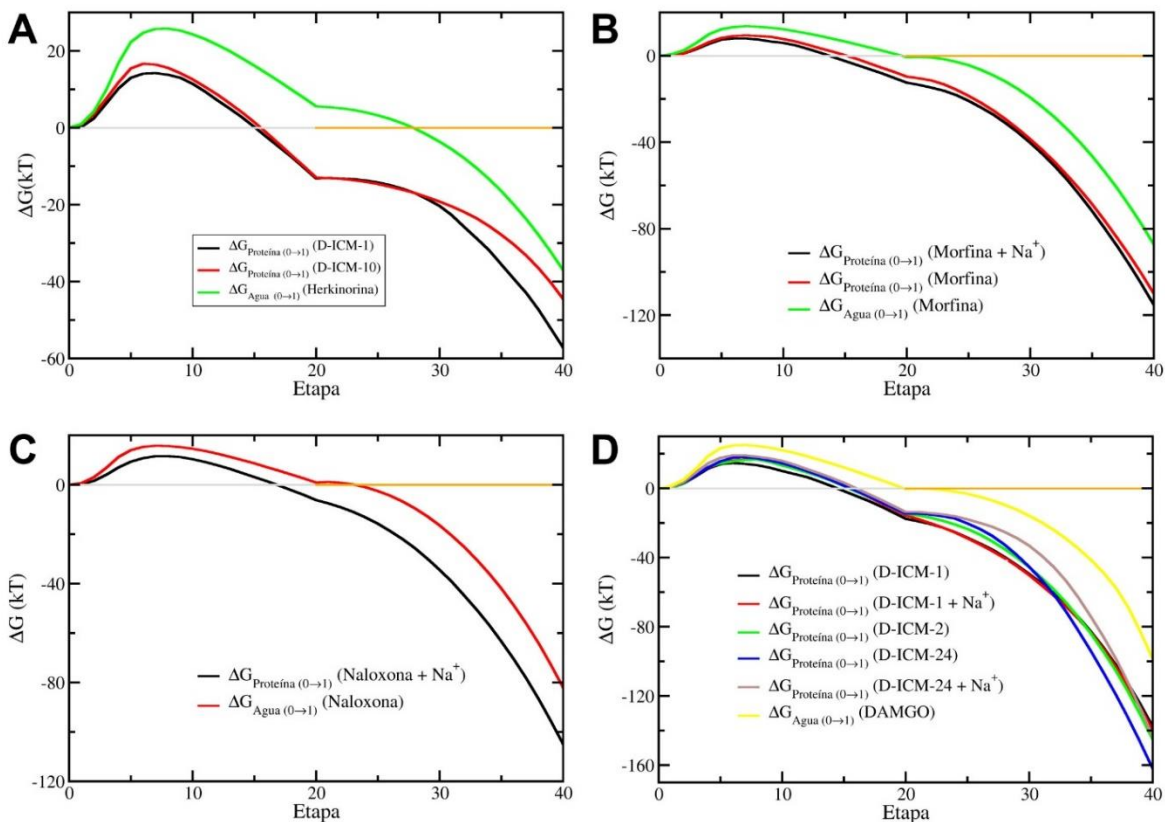


Figura 25. Perfil de los valores acumulados de la energía libre en función de lambda por el análisis BAR. Para A. Herkinorina, B. Morfina, C. Naloxona y D. DAMGO. Las líneas gris y naranja representan la activación de las interacciones de Vdw y electrostáticas, respectivamente. Los valores están divididos por kT y son adimensionales.

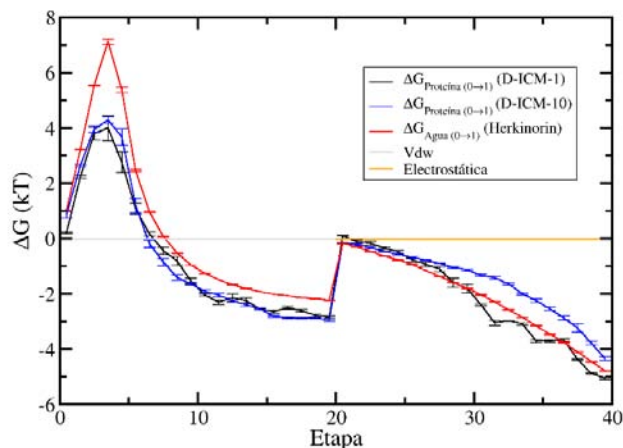


Figura 26. Perfil energético de las interpolaciones entre estados consecutivos usando el método de BAR, para el acoplamiento de la herkinorina-D-ICM-1 y la herkinorina-D-ICM-10 en sus sistemas proteicos y el acoplamiento de la estructura de la herkinorina en un sistema de aguas. Las líneas gris y naranja representan la activación de las interacciones de Vdw y electrostáticas, respectivamente.

5.4.3 Conformaciones de los ligandos en MOR

Para los análisis a continuación se seleccionaron solamente la *pose* de la herkinorina- D-ICM-1, la morfina en presencia y ausencia de sodio alostérico y DAMGO-D-ICM-24 en presencia y ausencia de sodio, y la naloxona en su única *pose* en presencia de sodio. Tomadas como la más realistas según la energía libre y el soporte experimental (como en el caso de DAMGO).

5.4.3.1 Elección representativa para DAMGO dentro de MOR

DAMGO se discute a detalle para soportar la elección de DAMGO-D-ICM-24 en ausencia y presencia de sodio como representativas de DAMGO en MOR. Así, complementar los resultados de la energía libre, ya que las conformaciones para DAMGO obtenidas en este estudio, no llegaron a una energía cercana a la experimental. La discusión permite discernir y elegir entre las diferentes configuraciones.

Las conformaciones finales de la estructura de DAMGO en todas las configuraciones estudiadas se muestran en la Figura 27. Se observó que la *pose* DAMGO-D-ICM-1 con ausencia de sodio alostérico orienta la cadena lateral del aminoácido W293^{6,48} hacia una posición horizontal dentro del receptor dejando un valor para el segundo ángulo diedro de la cadena lateral χ_2 de -127 grados. Este ángulo no se observa en el cristal activo 5C1M de MOR, el cual está en un ángulo de 121 °, ni en el estado inactivo 4DKL, donde se orienta hacia 79 ° (Huang *et al.*, 2015; Manglik *et al.*, 2012). La misma *pose* DAMGO-D-ICM-1 con presencia de sodio controló y estabilizó mejor la cadena lateral del aminoácido W293^{6,48} generando un ángulo χ_2 de 110 ° (Figuras 27.A, 27.C y 28).

Para DAMGO-D-ICM-24 en ausencia y presencia de sodio se observó una posición eclipsada entre el enlace de los carbonos C8-C2 (grupo fenol) y C25-C9 (grupo metilo) para las dos configuraciones variando su valor alrededor de 0 grados (Figuras 27.B, 27.E). Para D-ICM-24+Na⁺ se observó que el alcohol primario y el fenilo de DAMGO van hacia los aminoácidos N127^{2,63} y V143^{3,28}, respectivamente. Mientras en ausencia de sodio alostérico D-ICM-24 ubica al fenilo hacia K233^{5,39} y al alcohol primario hacia ECL2.

Para el análisis de contactos entre el ligando y aminoácidos durante la dinámica de 200 *ns* (seleccionando aminoácidos a menos de 4.0 Å de distancia a cualquier átomo del ligando) se omitieron los aminoácidos con menos de 5 % de probabilidad de contacto en el tiempo, para dejar datos más relevantes. Recordando que se calcula mediante la rutina de Gonzales-Andrade y colaboradores usando paqueterías del programa de visualización VMD, obteniendo contactos cada 0.5 *ns* (González-Andrade *et al.*, 2016).

La *pose* DAMGO-D-ICM-1 en presencia y ausencia de sodio, orientó al grupo fenol cercano al aminoácido N127^{2,63} lo que produce contactos prolongados en las dinámicas, aumentando su probabilidad de contacto en un ~18 % en presencia de sodio (Figuras 27.A, 27.C y 29). Este aminoácido es determinante de la selectividad (MOR/DOR) de DAMGO hacia MOR (Minami *et al.*, 1996). Sin embargo, DAMGO-D-ICM-24+Na⁺ (100 % probabilidad de contacto en el tiempo de la dinámica) es más probable que interactúe con N127^{2,63} respecto de DAMGO-D-ICM-1+Na⁺ (87.53 %). No obstante, DAMGO-D-ICM-24 (0 %) pierde toda posibilidad de contacto en ausencia de Na⁺ alostérico (Figuras 27.B, 27.E y 29). DAMGO-D-ICM-2 tiene baja probabilidad de contacto en el tiempo (27 %).

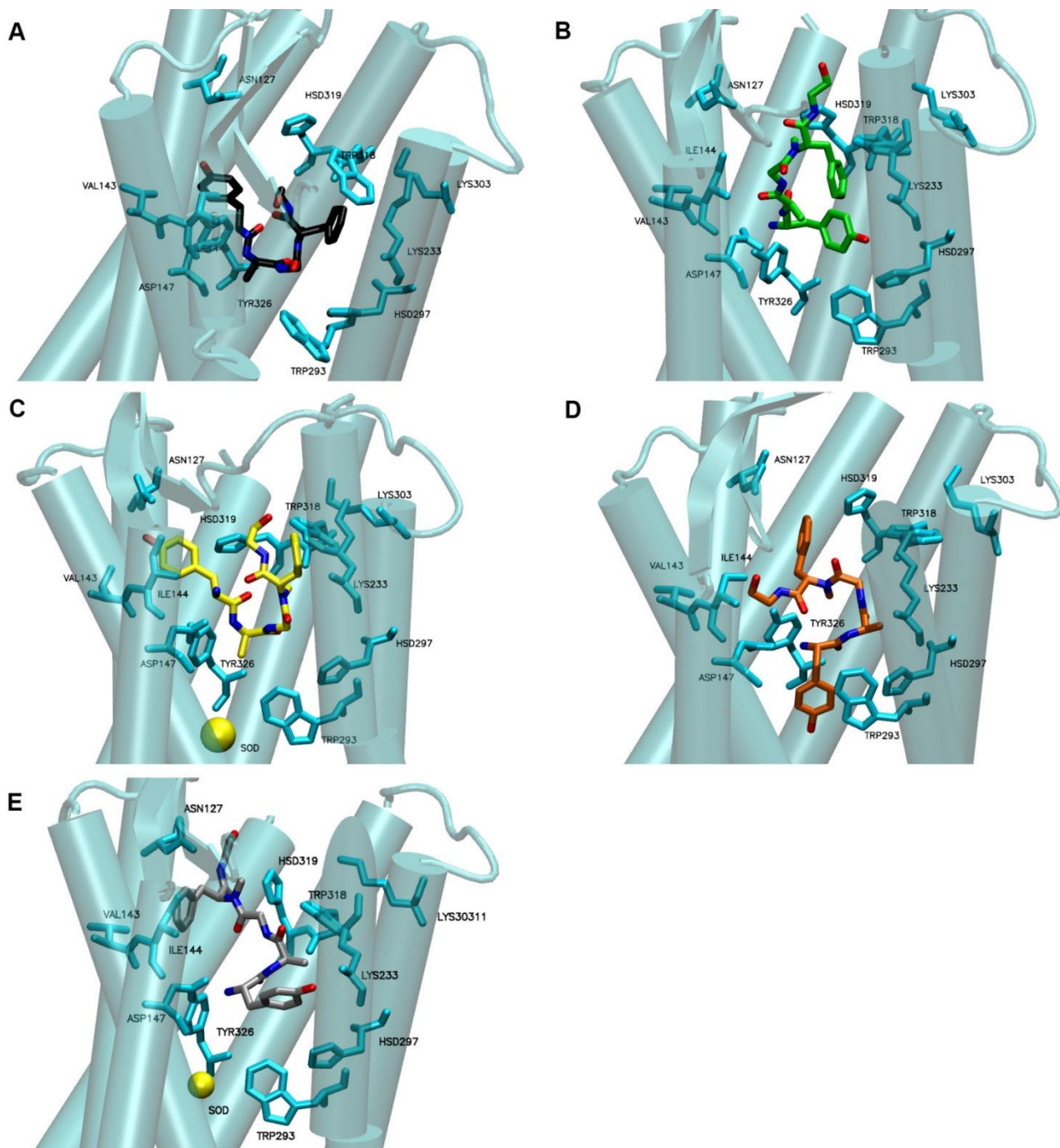


Figura 27. Puntos finales de la dinámica de 200 ns para las configuraciones de DAMGO dentro de MOR. (A) D-ICM-1, (B) D-ICM-24, (C) D-ICM-1+Na⁺, (D) D-ICM-2 y (E) D-ICM-24+Na⁺.

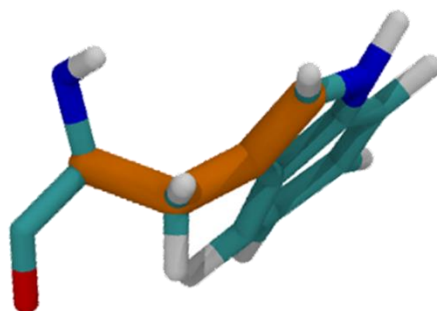


Figura 28. Segundo ángulo diedro (χ_2) de la cadena lateral del aminoácido W293 en MOR. El ángulo χ_2 está formado por los átomos $-C_\alpha-C_\beta-C_\gamma-C_\delta-$ de dicho aminoácido.

Las configuraciones estudiadas presentaron, en todos los casos, una alta probabilidad de contacto con el aminoácido W318^{7.35} (Figura 29). Este aminoácido está incluido en el grupo de aminoácidos que dan la selectividad experimental, MOR/KOR, de DAMGO hacia MOR. Los aminoácidos que dan la selectividad en MOR respecto de KOR son K303^{6.58}, W318^{7.35}, H319^{7.36} y V316^{7.33} (Seki *et al.*, 1998). Las conformaciones DAMGO-D-ICM-1 en presencia y ausencia de sodio no hicieron contactos con los otros tres aminoácidos importantes para la selectividad de DAMGO K303^{6.58}, H319^{7.36} o V316^{7.33} (Figura 29). DAMGO-D-ICM-2, sí puede llegar hasta el aminoácido H319^{7.36}, con una probabilidad baja debido a que esto ocurre en sus últimos 40 ns, cuando hay un cambio en la posición del ligando dentro del receptor. Para tener en cuenta, DAMGO-D-ICM-24 (sin sodio alostérico) tampoco logró hacer contacto con H319^{7.36}, mientras, DAMGO-D-ICM-24+Na⁺ sí tuvo un probabilidad de contacto alta (81 %). DAMGO-D-ICM-24 sin Na⁺ alostérico (25 %) y DAMGO-D-ICM-2 (14 %) pueden lograr una baja probabilidad de contacto con el aminoácido K303^{6.58}, algo que conformaciones de D-ICM-1 en presencia y ausencia no se lograron (0 %).

DAMGO-D-ICM-2 es el único que hizo contactos con aminoácidos que están en el sitio alostérico del sodio como N150^{3.35}, S154^{3.39} y S329^{7.46}. Los primeros con una probabilidad alta en la dinámica y el último con una más reducida. Sin embargo, la herkinorina-D-ICM-1 ubicó a su grupo benziloxi en el sitio alostérico del sodio, lo que podría controlar el reclutamiento de arrestina, lo que es consistente para los experimentos con la herkinorina. Por otro lado, el modelo de DAMGO-D-ICM-2 sugiere que se puede controlar directamente al sitio alostérico del sodio, pero DAMGO es un buen internalizador haciendo que el modelo sea contrario a lo reportado experimentalmente.

Los resultados mostraron a DAMGO-D-ICM-24+Na con una alta probabilidad de contactar a N127^{2.6}, W318^{7.35} y H319^{7.36}, importantes en la selectividad de DAMGO hacia MOR distinguiendo a KOR y DOR. Ninguna otra configuración logra hacer estos tres contactos. Además, puede que la ausencia de sodio haga que DAMGO-D-ICM-24 cambie su conformación y con ello el poder hacer contacto sobre K303^{6.58}, como se observó en los los resultados (Figura 29).

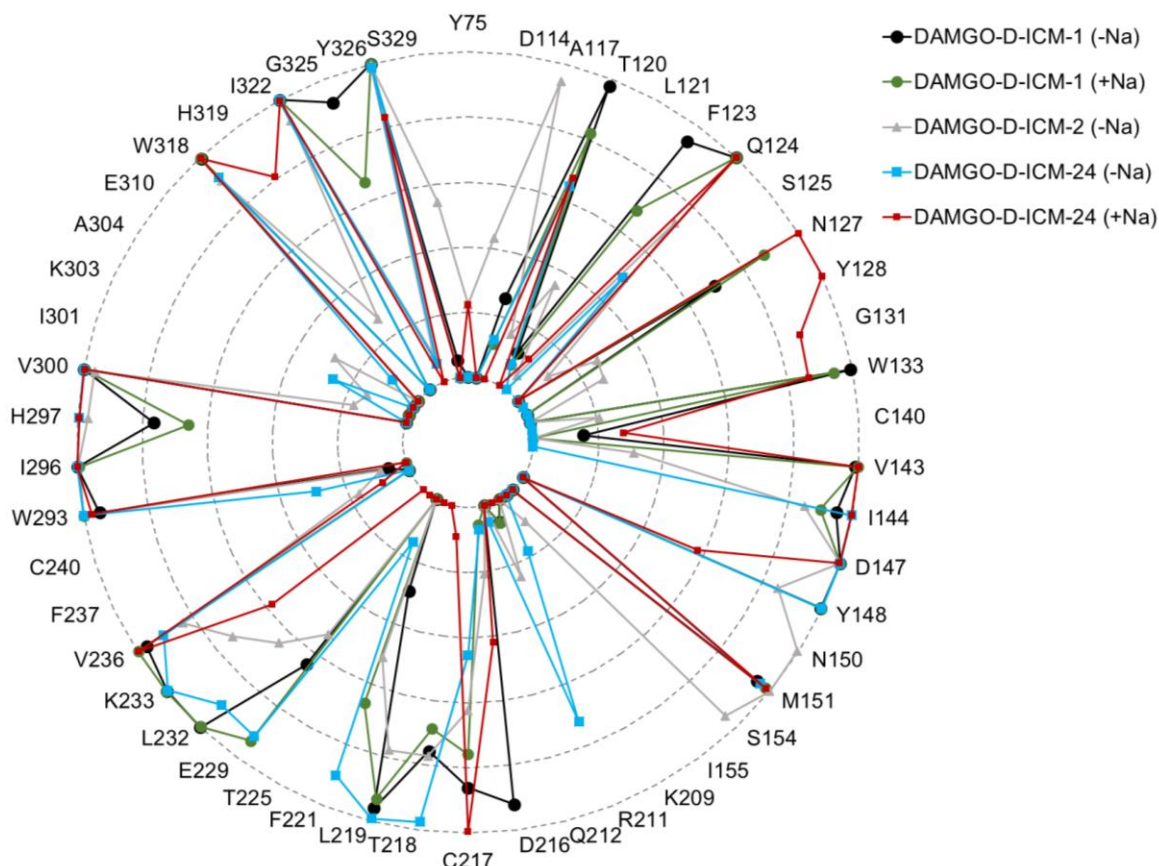


Figura 29. Frecuencias observadas para los contactos entre las configuraciones de DAMGO y aminoácidos de MOR con menos de 4.0 Å de distancia. Cada circunferencia representa un 20 % de probabilidad de contacto en el tiempo, aumentando de adentro hacia afuera.

Los movimientos del esqueleto del receptor (-N-C_α-CO-) que mostró el FMA (Calculado con los parámetros de la Tabla 16), los cuales no dieron indicios de la inactivación de MOR, fueron DAMGO-D-ICM-1 con ausencia de sodio y la configuración DAMGO-D-ICM-24 sin sodio alostérico presente (Figuras 30.A y 30.D), ya que la TM6 permaneció controlada en dichos configuraciones. En ambos casos se mostró un movimiento de ICL3 hacia afuera del receptor. Por otro lado, en la configuración DAMGO-D-ICM-2 (Figura 30.C), el movimiento de TM6 mostró características de inactivación del receptor, por su movimiento desde la parte media de la hélice hasta la parte baja hacia dentro de MOR. También, DAMGO-D-ICM-1+Na⁺ (Figura 30.B) tuvo un movimiento en TM6 en la parte que conecta con ICL3 hacia dentro en el receptor. Para el caso de DAMGO-D-ICM-24+Na⁺ (Figura 30.E), sólo se desplazó TM6 en su parte más baja, conectando con el movimiento de ICL3 y desplazándose hacia TM7. Tanto D-ICM-2 D-ICM-1+Na⁺, D-ICM-24+Na⁺ movieron la ECL3 hacia dentro; sin embargo, D-ICM-24+Na⁺ lo hace de una forma más lateral hacia TM7 y anclada de una forma particular en la región de acoplamiento entre el receptor con la proteína G, la cual se mantuvo desde la fase de 10 ns de equilibrio hasta los 200 ns de la dinámica, lo que puede indicar la necesidad del receptor por acoplarse con alguna estructura en su parte intracelular, en este caso ICL3 al no encontrarse macromoléculas cercanas (ICL3 en Figura 30.E) o sencillamente obstaculizar la unión con las biomoléculas haciendo que sea necesaria otra configuración. La forma es algo peculiar y podría obstaculizar la unión de la proteína-G o de las arrestinas.

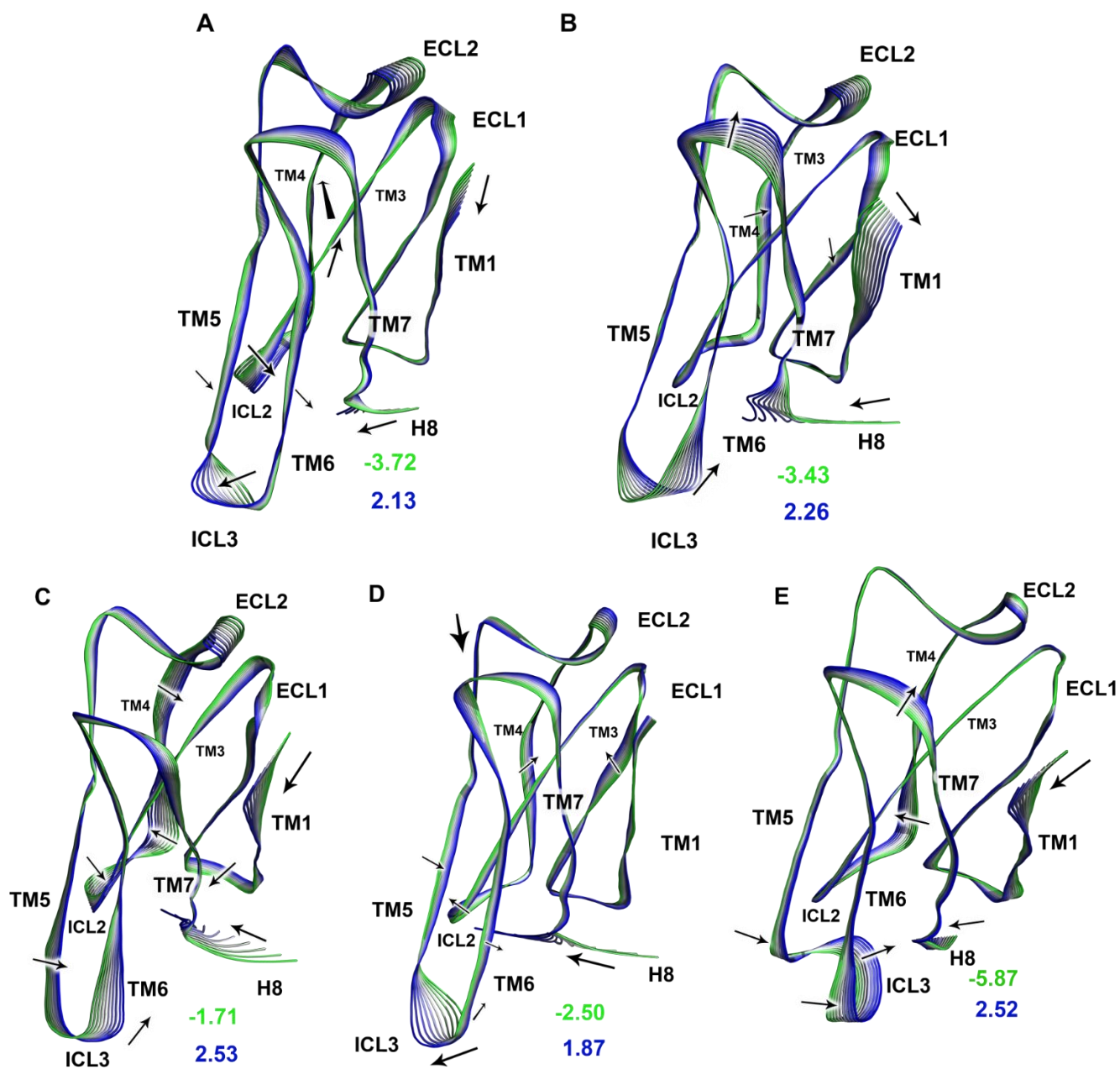


Figura 30. FMA de las configuraciones de DAMGO. Para las poses: A) D-ICM-1. B) D-ICM-1+Na⁺. C) D-ICM-2. D) D-ICM-24. E) D-ICM-24+Na. Los colores verde, blanco y azul representan el movimiento donde verde se refiere a movimientos correlacionados con valores bajos de RMSD y tiempos iniciales de las dinámicas, azul al movimiento en valores altos de RMSD correspondientes a tiempos finales de la dinámica y el blanco es un intermedio entre los anteriores.

Tabla 16. Componentes principales seleccionados, PCs, para la construcción del análisis de modos funcionales, FMA, del movimiento del esqueleto de MOR en los sistemas del ligando DAMGO.

| DAMGO | PCs | R_m | R_c |
|--------------------------|-----|--------|--------|
| D-ICM-1 | 30 | 0.9695 | 0.6139 |
| D-ICM-1+Na ⁺ | 11 | 0.9825 | 0.8938 |
| D-ICM-2 | 1 | 0.7946 | 0.8934 |
| D-ICM-24 | 10 | 0.9266 | 0.8771 |
| D-ICM-24+Na ⁺ | 50 | 0.9759 | 0.8992 |

* R_m (coeficiente de correlación del modelo) y R_c (coeficiente de correlación de la validación cruzada) está determinado por el coeficiente de correlación de Pearson: $R = \frac{cov(f,pa)}{\sigma_f \sigma_a}$

Un movimiento importante observado en la mayoría de configuraciones de DAMGO fue en TM1. Para las configuraciones de DAMGO-D-ICM-1 sin sodio, DAMGO-D-ICM-2 sin sodio y DAMGO-D-ICM-24+Na⁺ esta hélice va hacia TM7, mientras que sólo en DAMGO-D-ICM-1+Na⁺ fue hacia afuera del receptor (Figura 30). Para DAMGO-D-ICM-24 en ausencia de sodio, TM1 no tuvo movimiento alguno. Esto se observó en los resultados de FMA para la herkinorina-D-ICM-1 y la morfina+Na⁺, los cuales son las configuraciones que parecen ser las más representativas del receptor activo en cada sistema, sin embargo, esto se discutirá más adelante. En este FMA, para H8 se observaron movimientos de mayor amplitud en las configuraciones DAMGO-D-ICM-1+Na⁺, DAMGO-D-ICM-24 en ausencia de sodio alostérico y DAMGO-D-ICM-2 sin dicho sodio (Figura 30), que pueden estar indicando la señalización que pasa por TM7.

Por último, DAMGO-D-ICM-24 en ausencia y presencia de sodio pueden ser complementarias entre sí, en donde, en el inicio de la activación DAMGO pueda estar en presencia de sodio y luego ocurrir migración del sodio (por ser más afín energéticamente) y su posterior unión con la proteína-G o las arrestinas.

5.4.3.2 Configuraciones representativas de los sistemas en el receptor activo, interacciones receptor-ligando e interacciones mediadas con moléculas de agua

Contactos receptor-ligando para los sistemas estudiados

Para la probabilidad en el tiempo de contactos durante la dinámica de 200 ns (encontrados a menos de 4.0 Å de distancia de cualquier átomo del ligando) se omitieron los aminoácidos con menos de 5 % de probabilidad de contacto en el tiempo para seleccionar los datos más relevantes. El análisis FMA se hace por la medición del movimiento como ewMCM, calculado con la combinación de PCs que ajustara mejor el modelo. Para la herkinorina y DAMGO sólo se analizaron las configuraciones de la herkinorina-D-ICM-1 y DAMGO-D-ICM-24 en la ausencia o presencia de sodio. La configuración de la herkinorina escogida desde la energía libre de unión (sección 5.4.2.2) y la configuración de DAMGO entre análisis a la energía libre y acercamiento a demás datos experimentales (Secciones 5.4.2.4 y 5.4.3.1).

Los contactos mostraron que no hubo una diferencia marcada entre agonistas y antagonistas en los contactos observados. La herkinorina-D-ICM-1 y DAMGO-D-ICM-24+Na⁺ difirieron de la naloxona en algunos contactos como N150^{3,35}, A117^{2,53}, T120^{2,56}, Q124^{2,60}, W133^{ICL1}, S154^{3,39}, S329^{7,46}, etc. Pero son los mismos contactos a los que no llega la morfina en la ausencia y presencia de sodio alostérico. También,

se observó que los agonistas morfina+Na⁺, DAMGO-D-ICM-24+Na⁺ y herkinorina-D-ICM-1, en el aminoácido K233^{5.39}, tuvieron probabilidades de contacto en el tiempo de la dinámica de 79.30, 58.11 y 68.33 %, respectivamente con una cantidad de contactos menores que la naloxona, la cual tuvo un 95.01 % (Figura 31.A y Tabla 17). A pesar de que la morfina y la naloxona son similares estructuralmente, hay diferencias en la probabilidad de contactos en los aminoácidos G325^{7.42} y Y326^{7.43}, la morfina+Na⁺ tuvo valores más bajos de contacto que la naloxona. DAMGO-D-ICM-24+Na, por su parte, disminuyó el contacto en el aminoácido G325^{7.42} mientras que Y326^{7.43} permaneció con referencia a la naloxona. Sin embargo, la herkinorina logró mantener un contacto continuo y alto con estos dos aminoácidos (Figura 31.A y Tabla 17). Experimentalmente, Y326^{7.43} es un aminoácido de contacto que mantiene la afinidad de la morfina cuando se hacen estudios del mutante Y326F (Pil *et al.*, 2003). Así, una probabilidad de contacto de 42.64 % con dicho aminoácido en el sistema de morfina puede explicar porque no cambia mucho la afinidad al realizar la mutación de tirosina a fenilalanina.

El que no hubiera una marcada diferencia entre los contactos para antagonistas y agonista puede deberse a que la herkinorina es un agonista funcionalmente selectivo (no genera todas las señales del OR), mientras que DAMGO y la morfina no lo son, sin importar las diferencias estructurales. Puede entonces pensarse que un agonista y antagonista puede contactar aminoácidos iguales con una probabilidad de contacto que sea marcada entre los dos y la forma del ligando pueda variar el desplazamiento de los aminoácidos de contacto junto con el movimiento de las hélices transmembranales para llegar a una forma activa o inactiva.

Las diferencias marcadas encontradas entre la morfina+Na⁺ o DAMGO-D-ICM-24+Na⁺ frente a la herkinorina-D-ICM-1 en ausencia de sodio alostérico, se observaron principalmente en los aminoácidos que hacen contacto con el grupo beziloxi de la herkinorina-D-ICM-1, el cual se estabilizó en la región alostérica del sodio. Los contactos mencionados de menor a mayor en probabilidad de contacto son N328^{7.45} < D114^{2.50} < S154^{3.39} < S329^{7.46} < A117^{2.53} = N150^{3.35} (Tabla 17). Experimentalmente, se podría proponer la mutación de N150^{3.35}, A117^{2.53} y S329^{7.46} el receptor opioide mu para comprobar la pose D-ICM-1 de la herkinorina. Estos contactos pueden ser la explicación del por qué la herkinorina no activa procesos subsecuentes como la fosforilación del receptor en aminoácidos específicos o el reclutamiento de las arrestinas.

Los otros aminoácidos que fueron diferentes durante toda la dinámica entre la morfina y la herkinorina-D-ICM-1 corresponden a los contactos que pudo realizar el grupo furano de la herkinorina-D-ICM-1 en los que se incluyen V143^{3.28} y I144^{3.29} de la TM3, N127^{2.63} de TM2, W133^{ECL1} del primer lazo extracelular y C217^{ECL2} del segundo lazo extracelular. Estos mismos aminoácidos por su parte tuvieron contactos con probabilidades cercanas para DAMGO-D-ICM+Na⁺, excepto N127^{2.63}, en donde la herkinorina-D-ICM-1 hizo mucho menos contacto durante la dinámica (29.43 %). Sin embargo, el contacto de la herkinorina-D-ICM-1 con N127^{2.63} podría explicar la selectividad de la herkinorina hacia MOR respecto de DOR. Se sabe que N127^{2.63} es importante para diferenciar a los receptores MOR/DOR con el ligando selectivo DAMGO (Minami *et al.*, 1996). Las interacciones hidrofóbicas con V143^{3.28} y I144^{3.29} de MOR desde el furano de la herkinorina-D-ICM-1 y el fenilo de DAMGO-ICM-24+Na⁺ pueden ser las que estabilicen a cada uno de estos ligandos. Algo que podría no estar ocurriendo en el receptor DOR debido a que su lisina K108^{2.63} (homóloga de N127^{2.63} en MOR) no permita la estabilización al tener una cadena lateral más larga y con un nitrógeno cargado positivamente. DAMGO-D-ICM-24+Na⁺ se diferenció de las demás moléculas sobre contactos en TM2, ECL1 (N127^{2.63}, Y128^{2.64}, G131^{ECL1} y W133^{ECL1}) y TM7 (H319^{7.36}) en donde es relevante su selectividad (Minami *et al.*, 1996; Seki *et al.*, 1998).

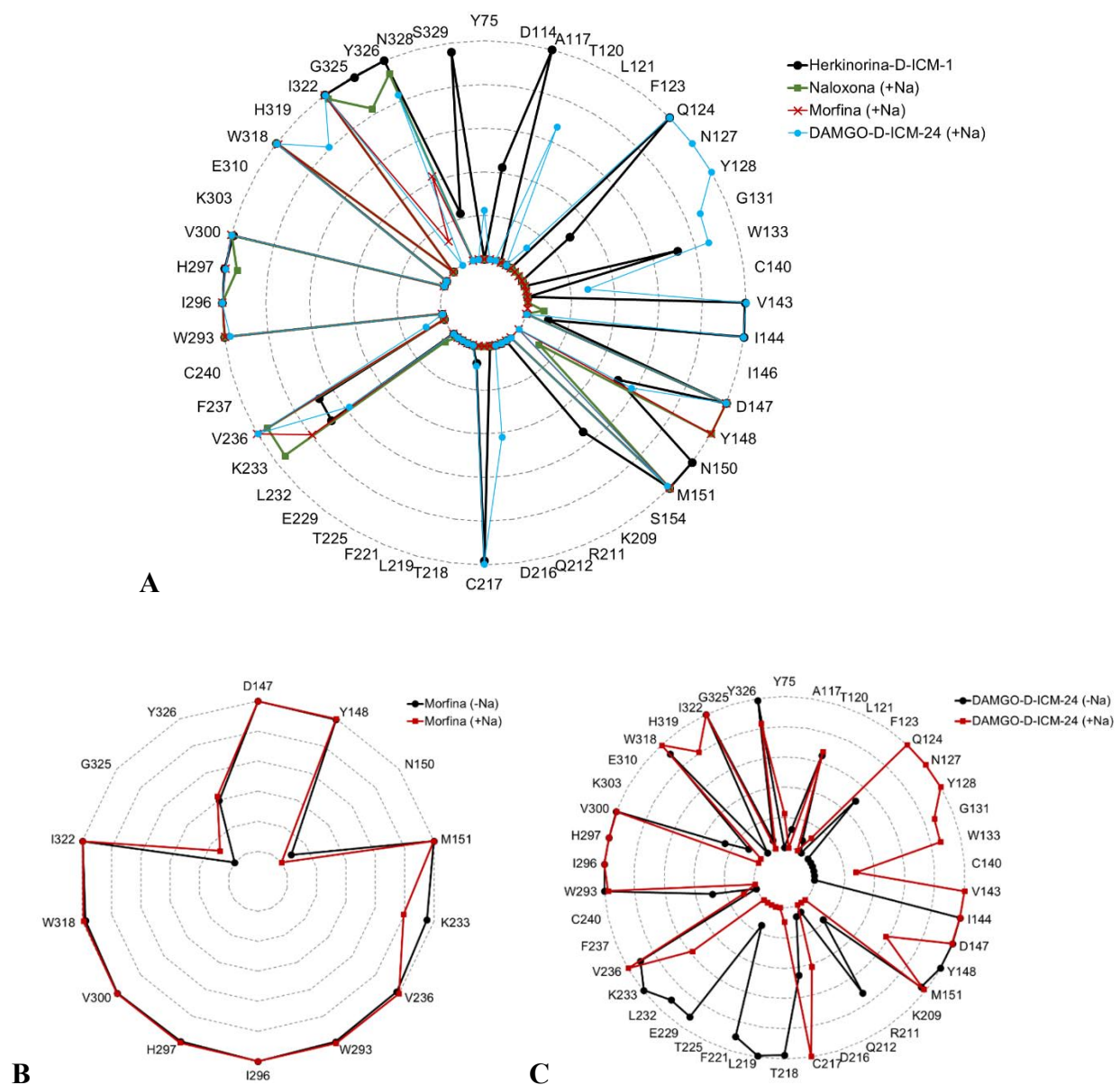


Figura 31. Frecuencias observadas para los contactos a menos de 4.0 Å del ligando en el receptor opioide mu. (A) Contactos para las configuraciones de la herkinorina-D-ICM-1, morfina+Na⁺, naloxona+Na⁺ y DAMGO-D.ICM-24+Na⁺. (B) Comparación de contactos para la morfina en presencia y ausencia de sodio alostérico. (C) Comparación para DAMGO-D-ICM-24 en presencia y ausencia de sodio alostérico. Cada circunferencia representa un 20 % de probabilidad de contacto en el tiempo, aumentando de adentro hacia afuera.

No se observó diferencia entre los contactos para la morfina en ausencia y en presencia de sodio, excepto para el aminoácido K233⁵⁻³⁹ con una diferencia del 16 % a favor de la morfina en ausencia de sodio (Figura 31.B y Tabla 17). Por otra parte, DAMGO-D-ICM-24 en presencia y ausencia de sodio alostérico mostraron diferencias en los aminoácidos de contacto debido al cambio de la orientación del ligando en el receptor a pesar de venir desde el mismo punto de *docking*, indicando la influencia del sodio (Figura 31.C y Tabla 17). En dichas configuraciones de DAMGO-D-ICM-24 (ausencia o presencia de sodio), los

contactos fueron diferentes en la región donde cada una intentó ubicar al grupo fenilo de DAMGO, así en ausencia de sodio la probabilidad de contacto fue marcada en los aminoácidos cercanos a K233^{5,39}, mientras que en presencia de sodio los contactos más marcados fueron para los aminoácidos cercanos a N127^{2,63} (Figuras 27.B y 27.E). Para resaltar, DAMGO en presencia de sodio H319^{7,36} (importante en selectividad) es un contacto que difiere de cuando está ausente el sodio.

Tabla 17. Valores estimados para la probabilidad de contactos en el tiempo entre el ligando y aminoácidos de MOR que estaban a menos de 4.0 Å de distancia cada 0.5 ns durante los 200 ns de la dinámica.

| Aminoácido | Probabilidad de contacto (%) | | | | | |
|------------|------------------------------|---------------------------------|--------------------------------|--------------------------------------|--------------------------------|--------------------------------------|
| | Herkinorina D-ICM-1 | Naloxona (+Na ⁺) | Morfina (+Na ⁺) | DAMGO D-ICM-24(+Na ⁺) | Morfina (-Na ⁺) | DAMGO D-ICM-24(-Na ⁺) |
| Y75 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 22.44 | 0.00 | 0.00 |
| D114 | 42.64 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 |
| A117 | 100.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 12.47 |
| T120 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 67.33 | 0.00 | 64.59 |
| L121 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 7.48 |
| F123 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 11.72 | 0.00 | 0.00 |
| Q124 | 100.00 | 0.00 | 0.00 | 100.00 | 0.00 | 49.38 |
| N127 | 29.43 | 0.00 | 0.00 | 100.00 | 0.00 | 0.00 |
| Y128 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 100.00 | 0.00 | 0.00 |
| G131 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 87.03 | 0.00 | 0.00 |
| W133 | 71.57 | 0.00 | 0.00 | 86.28 | 0.00 | 0.00 |
| C140 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 27.68 | 0.00 | 0.00 |
| V143 | 99.50 | 0.00 | 0.00 | 100.00 | 0.00 | 0.00 |
| I144 | 100.00 | 7.48 | 0.00 | 99.75 | 0.00 | 99.75 |
| I146 | 10.22 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 |
| D147 | 100.00 | 100.00 | 100.00 | 99.75 | 100.00 | 100.00 |
| Y148 | 50.62 | 100.00 | 100.00 | 57.86 | 99.50 | 99.75 |
| N150 | 100.00 | 11.47 | 0.00 | 0.00 | 8.23 | 0.00 |
| M151 | 100.00 | 100.00 | 100.00 | 98.50 | 100.00 | 96.26 |
| S154 | 54.36 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 |
| K209 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 17.96 |
| R211 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 72.32 |
| Q212 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 5.24 |
| D216 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 41.90 | 0.00 | 6.98 |
| C217 | 98.00 | 0.00 | 0.00 | 99.50 | 0.00 | 45.39 |
| T218 | 7.73 | 0.00 | 0.00 | 9.23 | 0.00 | 97.51 |
| L219 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 99.25 |
| F221 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 90.02 |
| T225 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 14.96 |
| E229 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 91.52 |
| L232 | 0.00 | 5.24 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 90.52 |
| K233 | 68.33 | 95.01 | 79.30 | 58.10 | 95.26 | 99.50 |
| V236 | 67.33 | 94.76 | 100.00 | 99.75 | 98.00 | 90.52 |

| Aminoácido | Probabilidad de contacto (%) | | | | | |
|------------|------------------------------|---------------------------------|--------------------------------|--------------------------------------|--------------------------------|--------------------------------------|
| | Herkinorina D-ICM-1 | Naloxona (+Na ⁺) | Morfina (+Na ⁺) | DAMGO D-ICM-24(+Na ⁺) | Morfina (-Na ⁺) | DAMGO D-ICM-24(-Na ⁺) |
| F237 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 8.98 | 0.00 | 0.00 |
| C240 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 28.93 |
| W293 | 100.00 | 100.00 | 99.75 | 97.51 | 98.75 | 100.00 |
| I296 | 100.00 | 100.00 | 100.00 | 100.00 | 100.00 | 100.00 |
| H297 | 100.00 | 94.26 | 99.50 | 99.50 | 98.50 | 99.50 |
| V300 | 99.00 | 99.75 | 100.00 | 99.75 | 99.75 | 100.00 |
| K303 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 25.69 |
| E310 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 10.22 |
| W318 | 100.00 | 100.00 | 99.00 | 99.75 | 97.76 | 91.77 |
| H319 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 80.80 | 0.00 | 0.00 |
| I322 | 100.00 | 97.76 | 99.75 | 99.75 | 99.75 | 100.00 |
| G325 | 99.25 | 82.54 | 12.47 | 0.00 | 0.00 | 5.99 |
| Y326 | 100.00 | 93.52 | 42.64 | 83.04 | 39.65 | 98.75 |
| N328 | 22.44 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 |
| S329 | 95.76 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 |

Conformaciones y red molecular de aguas en configuraciones de la herkinorina, morfina y naloxona dentro de MOR

Algo que se observó fue la formación de una red de agua entre los aminoácidos de MOR, el ligando y/o el ion sodio emplazado en su sitio alostérico.

En la Figura 32 se observa una red de agua importante ya que conecta a los aminoácidos del sitio de unión con los aminoácidos del sitio alostérico del sodio implicados en la modulación de los caminos de señalización (estudios en DOR) o modificación de la actividad de MOR por mutación de algunos de estos aminoácidos (Katritch *et al.*, 2014; Mansour *et al.*, 1997). Se muestra a la herkinorina-D-ICM-1 en ausencia de sodio, los sistemas de la morfina o DAMGO-D-ICM-24, ambos en presencia y ausencia de sodio alostérico y a la naloxona en presencia de sodio.

En todos los casos, excepto en DAMGO-D-ICM-24 sin sodio, se formó una interacción mediada por aguas entre la cadena lateral de H297^{6,52}, la cadena principal de K233^{5,39} y un grupo aceptor de puente de hidrógeno del respectivo ligando. En el caso de la herkinorina (Figura 32.A), el carbonilo del sustituyente ubicado en C4, fue dicho grupo aceptor de puente de hidrógeno, mientras la morfina, DAMGO y la naloxona lo hicieron respecto al hidroxilo del fenol de su estructura. Esta interacción es vista en el ligando BU72 cristalizado en el receptor activo de MOR, mediado por dos moléculas de agua (Huang *et al.*, 2015). Para la morfina (Figuras 32.C y 32.D) se encontró que en la mayoría del tiempo de simulación, la interacción anterior está mediada únicamente por una molécula de agua cuando está en presencia de sodio (hay momentos en los que esta mediada por dos moléculas de agua). Sin embargo, cuando la morfina está en ausencia de sodio la geometría es apropiada para que la interacción sea mediada por dos moléculas de agua. En el caso de la herkinorina y la naloxona se observó una interacción mediada por dos moléculas de agua como en el cristal activo de MOR. Mientras DAMGO en presencia de sodio tiene de preferencia sólo a una molécula de agua para la interacción con H297^{6,52}.

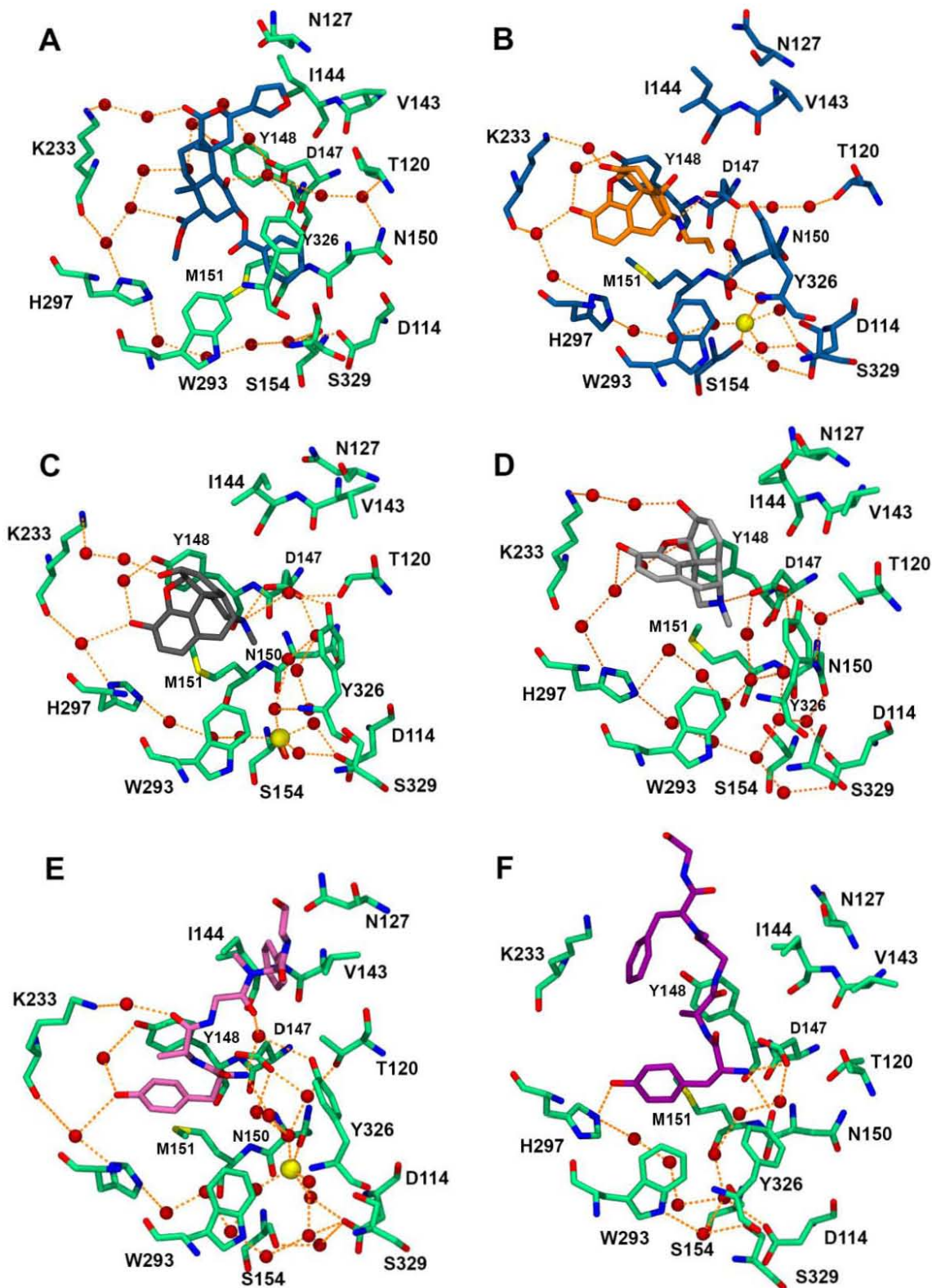


Figura 32. Colocación de los ligandos en MOR con énfasis en puentes y contactos mediados por moléculas de aguas. A) Herkinorina-D-ICM-1. B) Naloxona. C) Morfina+Na⁺. D) Morfina (-Na⁺). E) DAMGO-D-ICM-24+Na⁺. E) DAMGO-D-ICM-24 (-Na⁺). Cuando se indica +Na⁺ o -Na⁺ se refiere a en presencia o ausencia de sodio alostérico, respectivamente.

También, se observó interacción mediada por agua entre los ligandos y la cadena lateral del aminoácido K233^{5.39} encontrada igualmente en todos los casos, excepto en DAMG-D-ICM-24 sin sodio (Figura 32.F), el cual realiza una interacción hidrofóbica con su grupo fenilo con K233^{5.39}. La naloxona se observó más cercana a esta cadena lateral por lo que de preferencia se mostró la interacción mediada con el ligando por una molécula de agua, mientras la morfina en presencia de sodio y la herkinorina-D-ICM-1 necesitaron de dos de estas moléculas de agua para hacer el puente. La morfina en ausencia de sodio varió en el número de moléculas de agua que puede usar como intermediarias en el puente con K233^{5.39}.

Una red de moléculas de agua conectó al aminoácido D144^{2.50} con el residuo D147^{3.32}, igualmente observada en MOR activado (código PDB: 5C1M) y en DOR inactivo, el cual sí tiene un sodio alostérico en su cristal (PDB: 4RWA). Dicho puente, está en los sistemas y configuraciones de la morfina, DAMGO-D-ICM-24 (ambas en ausencia o presencia de sodio alostérico) y naloxona. En el caso de la herkinorina esta red de moléculas de agua se vio interrumpida por la presencia del sustituyente C2-bezoiloxi, puede ser entonces, que la herkinorina establezca la región con interacciones hidrofóbicas y que no sea tan dependiente del ion sodio.

Otras ubicaciones de moléculas de agua que se observaron diferentes en nuestros sistemas fueron las que unen a los aminoácidos N150^{3.35}, T120^{2.56} y D147^{3.32}. En el caso de la morfina en presencia de sodio y DAMGO-D-ICM-24 en ausencia de sodio la red no estuvo bien definida en esos puntos y el aminoácido N150^{3.35} se alejó hacia la membrana y no participó en los contactos directos o mediados por aguas respecto a T120^{2.56} y D147^{3.32}. Por otro lado, en los sistemas de la morfina en ausencia de sodio, DAMGO-D-ICM-24+Na⁺, la herkinorina-D-ICM-1 y la naloxona, se observó que al menos una molécula de agua estuvo mediando la conexión entre los aminoácidos N150^{3.35}, T120^{2.56} y D147^{3.32}.

La red de moléculas de agua que sorprendió, fue la que se formó hacia el aminoácido H297^{6.52} desde el aminoácido D114^{2.50}, encontrada en todas las configuraciones de interés. La cual puede estar mediada o no por sodio como lo es para la naloxona, DAMGO-D-ICM-24+Na⁺ y morfina+Na⁺. En las configuraciones de DAMGO-D-ICM-24 en presencia de sodio y la morfina en ausencia de sodio se observaron formaciones de redes que abarcan mayor número de moléculas de agua entre estos aminoácidos.

La ocupación de las moléculas de agua en MOR (Figura 33) reveló que la herkinorina-D-ICM-1 tiene una distribución similar a la morfina en presencia de sodio y a la de DAMGO-D-ICM-24 en ausencia de sodio. Además en la región del sitio alostérico la naloxona tiene una distribución parecida a los dos sistemas mencionados, sin embargo, en la zona intracelular la distribución de moléculas de agua es despreciable para la naloxona, probablemente porque en el estado inactivo la hélice TM6 en esta zona se orienta hacia adentro del receptor impidiendo generación de volúmenes y la ocupación por el agua. Por otra parte, la morfina en ausencia de sodio y DAMGO-D-ICM-24+Na⁺ presentaron distribuciones distintas y con valores promedio más recurrentes, generando en ambas distribuciones continuas a lo largo del sitio de unión hasta la mitad del receptor. También, puede que la distribución de las moléculas de agua dentro del receptor para evitar que se generen fosforilaciones que lleven al reclutamiento de las arrestinas sea la mostrada en la herkinorina-D-ICM-1, la cual no encontró un volumen ni distribuciones de moléculas de agua en el centro del receptor.

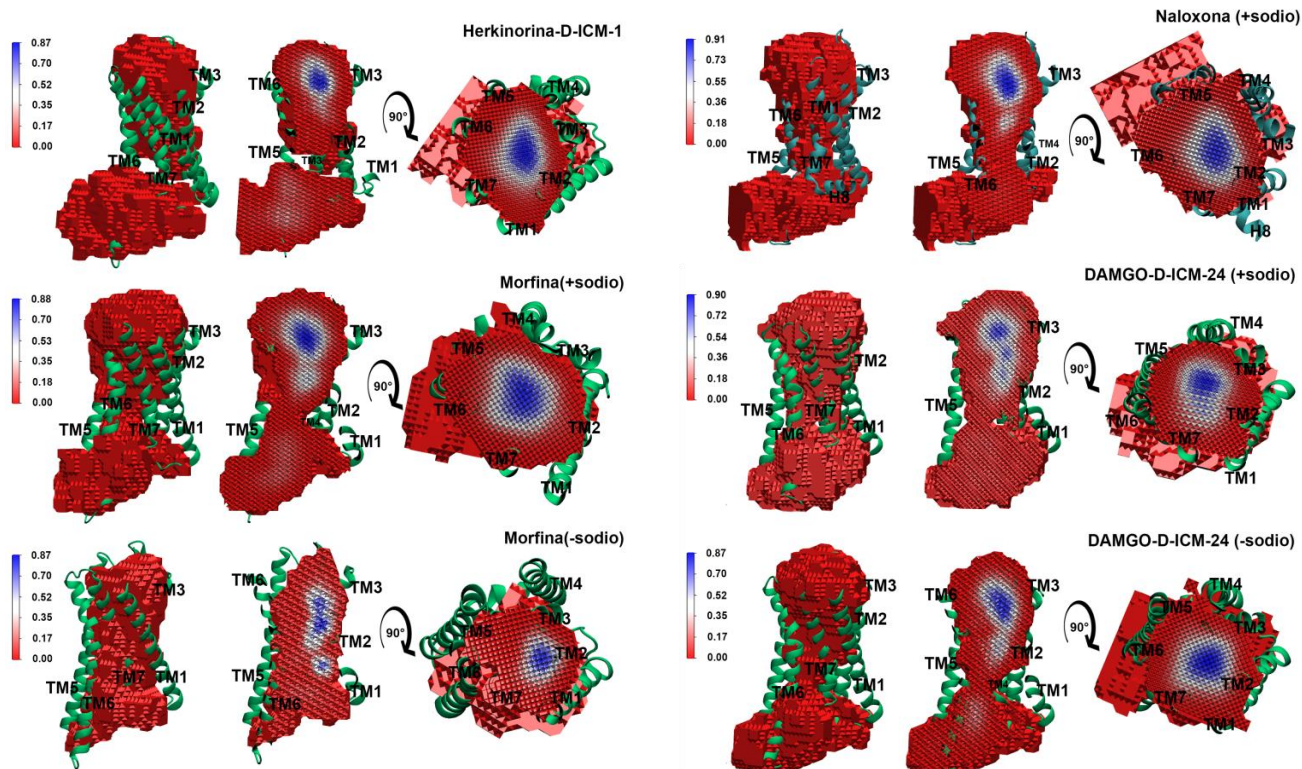


Figura 33. Probabilidad de encontrar moléculas de agua en 200 ns dentro del sitio activo de MOR en los sistemas seleccionados como relevantes. El análisis de cavidades internas y de ocupación de agua dentro de MOR, a través del programa trj_cavity, genera cavidades en el receptor que pueden variar en tamaño y frecuencia respecto a cada punto de la dinámica. Así, se puede encontrar por ejemplo una cavidad pequeña que no perdure y en la que no se encuentren moléculas de agua (zonas rojas) y cavidades grandes o pequeñas que son más frecuentes en la dinámica y en las cuales se encuentre presencia de moléculas de agua (zonas rosas, blancas y azules).

5.4.4 Movimientos importantes en los lazos y hélices transmembranales en la transmisión de señales alostéricas

Se discutirán los siguientes análisis: la fluctuación de la media cuadrática (RMSF) la cual mide la fluctuación de un movimiento alrededor de un promedio, la helicidad que tiene en cuenta el grado de formación de hélice alfa para las TM y algunos lazos del receptor, el análisis de modos funcionales (FMA) que puede observar los principales movimientos del receptor en el tiempo de la dinámica y ángulos diedros de las cadenas laterales de aminoácidos importantes para observar diferencias en los sistemas.

5.4.4.1 Fluctuación del esqueleto del receptor (-N-C_α-CO-) del receptor mu

Según el análisis de RMSF se observa mayores fluctuaciones en los lazos que en las TMs (Figura 34). El primer lazo extracelular ECL1 que se encuentra entre TM2 y TM3 tuvo diferencia entre los agonistas y el antagonista naloxona, al igual que los aminoácidos finales de TM2. La herkinorina-D-ICM-1 ubica al grupo furano cerca de TM2 pero no se observaron diferencias en las fluctuaciones de TM2 y ECL1 entre la herkinorina-D-ICM-1, morfina+Na⁺ y DAMGO-D-ICM-24+Na⁺, pero hay diferencia entre la herkinorina-D-ICM-1 y DAMGO-D-ICM-24+Na⁺ en TM1.

Los aminoácidos F152^{3.37} y F156^{3.41} de la TM3 mostraron tendencia diferente para la herkinorina-D-ICM-1 respecto de la morfina+Na⁺ y DAMGO-D-ICM-24+Na⁺, cercanos a los aminoácidos N150^{3.35}, M151^{3.36} y S154^{3.39} donde contacta principalmente el sustituyente C2-benziloxi de la herkinorina-D-ICM-1. Esto también puede estar influyendo en la fluctuación del segundo lazo intracelular ICL2 ubicado en medio de TM3 y TM4 para los agonistas.

La mayor fluctuación del receptor en todos los ligandos, menos en DAMGO-D-ICM-24+Na⁺, está en el tercer lazo intracelular ICL3 ubicado entre la TM5 y la TM6. DAMGO-D-ICM-24+Na⁺ parece estabilizar al lazo ICL3, puede ser porque se estabiliza con la región intracelular del receptor. Para la naloxona este lazo tiene seis aminoácidos reconstruidos, debido a que el cristal inactivo 4DKL de MOR está unido a la lisozima T4 por esta zona (Manglik *et al.*, 2012), lo que puede aumentar la desviación y la fluctuación. Así, que por ahora no es posible decir que dicha fluctuación en ICL3 sea una diferencia entre los agonistas y el antagonista naloxona.

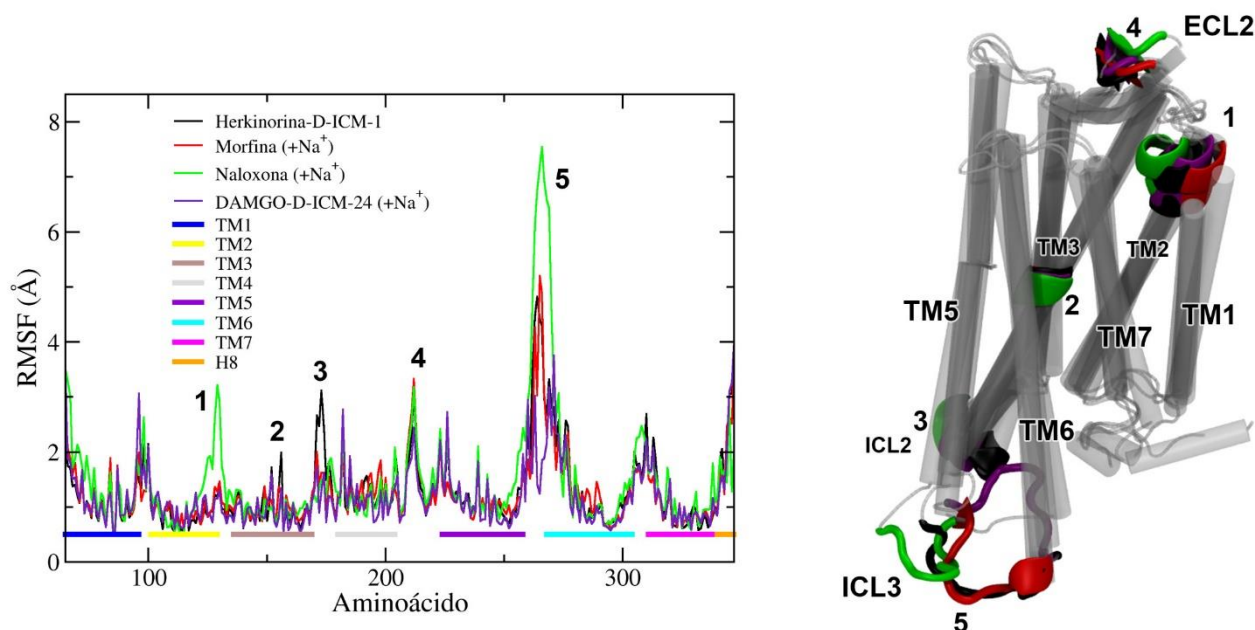


Figura 34. RMSF calculado para los sistemas de MOR y los ligandos más relevantes. Los puntos de fluctuación importantes están enumerados y representados sobre la estructura de MOR del respectivo sistema receptor-ligando

5.4.4.2 Helicidad

La helicidad es un parámetro que mide el grado de hélice de la proteína según el número de α -hélices. Esta medida es dependiente de los ángulos diedros Φ y Ψ (con base al eje de rotación N-C α y C α -C=O, respectivamente) y conformada por lo menos por tres aminoácidos que asemejan estos ángulos a valores ideales de hélice (Bystroff *et al.*, 2003; Hirst *et al.*, 1994, 1995). Para cada aminoácido se tiene el porcentaje en el tiempo de la dinámica en el que se encontraran en conformaciones de α -hélice. El análisis de helicidad se realizó para la herkinorina-D-ICM-1, morfina o DAMGO-D-ICM-24 (estas dos últimas en presencia y ausencia del sodio alostérico) y la naloxona. Una pérdida de helicidad puede asociarse a una flexión en un punto de la hélice.

Agonismo vs antagonismo

Si observamos el resultado de los antagonistas herkinorina-D-ICM-1 y morfina+Na⁺ y el antagonista naloxona, se encuentra una baja helicidad para el antagonista en el aminoácido T103^{2.39} en la hélice TM2. Sin embargo, DAMGO-D-ICM-24+Na⁺ tiene una baja helicidad en este aminoácido, aunque la morfina+Na⁺ también tiene una pérdida menor respecto a las configuraciones sin sodio.

Ahora Y106^{2.42} en TM2 tuvo una ganancia en la helicidad en la naloxona (Figura 35.B). De igual manera DAMGO-D-ICM-24+Na⁺ tuvo la misma tendencia que la naloxona, pero puede estar influenciado por el movimiento de TM3. Se destaca que el aminoácido Y106^{2.42} está implicado en la potenciación de la respuesta de MOR inducida por insulina en estudios con DAMGO mediada por defosforilación de dos tirosinas incluida Y106^{2.42} (McLaughlin *et al.*, 2001). Tanto T103^{2.39} y son Y106^{2.42} aminoácido que están ubicados hacia la parte intracelular en el receptor, entonces puede ser una característica del receptor inactivo quizás por el acercamiento de TM6 a esta zona.

Para el A113^{2.49} que está en la zona media de TM2 no hubo mucha diferencia entre la naloxona y los agonistas morfina (tanto en presencia y ausencia de sodio alostérico) y herkinorina-D-ICM-1, sólo hubo una ganancia menor de helicidad a favor de la naloxona. Sin embargo, esta vez la configuración de DAMGO-D-ICM-24 en ausencia de sodio alostérico es la que trata de seguir la tendencia de la naloxona.

Cambiando de hélice, los aminoácidos en TM3 C159^{3.44}, T160^{3.45} y M161^{3.46}, en donde la naloxona reduce su helicidad (Figura 35.C) se encuentra que C159^{3.44} está muy cerca del aminoácido Y106^{2.42} de TM2 ya discutido y puede influenciar el cambio de valor entre agonistas y antagonista. Estos aminoácidos de TM3 también están hacia la parte intracelular. Esta vez ninguna de las configuraciones de DAMGO-D-ICM-24 (con o sin sodio) presentaron similitud con la naloxona. Así, que este punto en TM3 realmente parece ser una diferencia entre agonistas y antagonistas.

La hélice transmembranal en donde se observaron mayores diferencias entre agonistas y antagonistas fue en la TM7. Curiosamente, el aminoácido W318^{7.35} muestra diferencias de helicidad, éste es importante para la retención de la afinidad de la morfina y es uno de los aminoácidos que puede distinguir DAMGO en el reconocimiento entre MOR/KOR (Seki *et al.*, 1998; Ulens *et al.*, 2001), sin embargo, la configuración DAMGO-D-ICM-24+Na⁺ pareció seguir la tendencia de la naloxona. El valor de helicidad se redujo para los agonistas, lo que supone que estos atraen al anillo de indol del triptofano. También otro aminoácido en TM7 con pérdida en la helicidad para los agonistas estudiados fue Y326^{7.43}, el cual si se muta por Y326F decrece la afinidad para agonistas como la morfina, DAMGO y fentanil. Ahora en naloxona hay una inflexión en S329^{7.46}, y los agonistas lo hacen en C330^{7.47} en todas sus configuraciones. La región más importante en TM7 con pérdida de helicidad para agonistas se encontró en los aminoácidos V334^{7.51}, L335^{7.52} y Y336^{7.53} (Figura 35.G). Y336^{7.53} parece ser un punto importante en la transmisión de señales alostéricas (Bartuzi *et al.*, 2016). La pérdida de helicidad en TM7 de MOR activo podría darse para la transmisión de la señal del receptor y debe estar influenciada por TM6.

El segundo lazo intracelular ICL2 fue tenido en cuenta en la helicidad debido que en el cristal activo 5C1M de MOR, ICL2 se encuentra interaccionando con el nano cuerpo Nb39 que emplaza en la misma zona que emplazaría el complejo de proteína G. Los aminoácidos que hacen puentes de hidrógeno con el nano cuerpo son P172^{ICL2}, L176^{ICL2} y R179^{ICL2} (Huang *et al.*, 2015). La alteración en esta zona también puede suponerse importante para generar la actividad canónica o la actividad de arrestina. L176^{ICL2} mostró

perdida de helicidad en el receptor inactivo (Figura 35.H). La estabilidad de la formación de una hélice alfa en ICL2 parece primordial para la activación.

Herkinorina vs morfina y DAMGO

Las evidencias que son relevantes para explicar la diferencia en la señalización entre la herkinorina-D-ICM-1 y los agonistas de referencia pueden estar asociadas a TM2, TM3, TM7, TM6 e ICL2. Hay que resaltar que para la hélice H8 no está totalmente constituida en las secuencias del receptor así que no se le dio relevancia en la helicidad.

En TM2, la herkinorina-D-ICM-1 tuvo diferencias con las dos configuraciones de DAMGO-D-ICM-24 (con y sin sodio) en los aminoácidos T103^{2.39}, Y106^{2.42} y A113^{2.49}. Como se menciona en el anterior apartado Y106^{2.42} está involucrado en la potencia de DAMGO (requerir dosis más bajas de la droga para igual respuesta) por sufrir fosforilaciones. Además, se observó una pérdida de helicidad para el aminoácido S145^{3.30} en TM3 cuando la herkinorina-D-ICM-1 está presente, recordando que este ligando interacciona con V143^{3.28} y I144^{3.29}, mientras la morfina (con y sin sodio) no lo hace (Figura 35.C). DAMGO-D-ICM-24+Na⁺ hace contactos con estos dos aminoácidos con su grupo fenilo y en ausencia de sodio contacta a I144^{3.29} con la cadena peptídica de este ligando y un grupo metilo, haciendo que también se produzcan pérdidas de helicidad en S145^{3.30} como en la herkinoin-D-ICM-1.

Por otro lado, la herkinorina-D-ICM-1 tuvo sobre TM3 una ganancia de helicidad en los aminoácidos Y149^{3.34} a diferencia de la morfina (en sus configuraciones con y sin sodio; Figura 35.C). Esta zona está el sitio alostérico del sodio y N150^{3.35}, que está implicado en la activación de la señalización de arrestinas (Fenalti *et al.*, 2014; Katritch *et al.*, 2014). DAMGO-D-ICM-24+Na⁺ puede actuar como la herkinorina-D-ICM-1, posiblemente por la disposición del aminoácido N150^{3.35}, la cual se observó en el análisis de los ángulos diedros de las cadenas laterales para este aminoácido. DAMGO-D-ICM-24 en ausencia de sodio sí tiene gran diferencia en Y149^{3.34} y N150^{3.35} con la herkinorina-D-ICM-1. La morfina en presencia y ausencia de sodio alostérico tuvieron diferencias en dicha zona con la herkinorina-D-ICM-1 pero no entre ellas. Así, configuraciones en ausencia de sodio pueden ser responsables de la señalización de las arrestinas. También, hubo una importante pérdida de helicidad en el aminoácido Y166^{3.51} de TM3 para la configuración de DAMGO-D-ICM-24 en ausencia de sodio alostérico, respecto al valor de la herkinorina-D-ICM-1 y morfina (con y sin sodio). Se sabe que Y166^{3.51} reduce la eficacia (actividad máxima) de DAMGO cuando hay fosforilación en esta tirosina (Clayton *et al.*, 2010).

Para W318^{7.35} en TM7 se pierde helicidad en la herkinorina-D-ICM-1 (~15% de diferencia) respecto de la morfina en sus dos configuraciones (con y sin sodio) y DAMGO-D-ICM-24 sin sodio alostérico. Aún, hubo más pérdida de helicidad respecto a la configuración de DAMGO-D-ICM-24+Na⁺ (~20 % diferencia). Este punto de inflexión en W318^{7.35} para la herkinorina-D-ICM-1 puede ser importante en la señalización, ya que se ha encontrado que un modulador alostérico positivo BMS986122 interactúa con W318^{7.35} sobre dinámicas moleculares en un sistema donde se encontraba metadona y el sodio alostérico en D^{2.50} (Bartuzi *et al.*, 2016). Otro punto importante es la ganancia de helicidad de la herkinorina D-ICM-1 sobre Y326^{7.43} respecto de las configuraciones de DAMGO-D-ICM-24 en ausencia y presencia de sodio alostérico.

TM6 tuvo pérdida de helicidad en el aminoácido V300^{6.55} para los tres agonistas pero fue más marcada para la herkinorina-D-ICM-1, igualmente es una zona afectada por el modulador alostérico BMS986122

en dinámicas moleculares (Bartuzi *et al.*, 2016). También, el lazo ICL2 pierde helicidad para la herkinorina-D-ICM-1 en los aminoácidos P172 y V173 respecto a la morfina+Na⁺. P172 hace contacto con el nano cuerpo Nb39 del cristal activo 5C1M de MOR, en este cristal los contactos con el nano cuerpo son P172, L176 y R179 (Huang *et al.*, 2015). La morfina en ausencia de sodio presenta una pérdida de helicidad en V173 y K174 de ICL2 respecto de los otros agonistas y configuraciones. Esto puede tenerse en cuenta para estudios de señalización.

Hay que resaltar que para la hélice H8 no está totalmente constituida en las secuencias del receptor así que no se le dio relevancia.

Configuraciones en presencia y ausencia de sodio alostérico

Entre la morfina en presencia y ausencia de sodio se encontraron diferencias en los aminoácidos G82^{1.46} y L83^{1.47} (Figura 35.A), con un valor de helicidad bajo para la configuración en ausencia de sodio. Esto se relaciona con el movimiento de TM1 por el análisis de FMA (Figura 36.D), detallado más adelante, lo que podría explicar este cambio en la helicidad. Quizás el movimiento en TM1 puede influir en la señalización.

Hubo una pérdida muy marcada de la helicidad en ICL2 para la configuración de morfina sin sodio alostérico respecto a la configuración con sodio alostérico de morfina. Propiamente en los aminoácidos V173^{ICL2}, K174^{ICL2}, A175^{ICL2} y L176^{ICL2} que podrían variar la forma de unión de la proteína G o las arrestinas. Acoplándose al resultado de FMA, podría pensarse que morfina en ausencia de sodio desestabiliza la conformación para la unión con proteína G (Figuras 36.B y 36.D).

Por su parte, DAMGO-D-ICM-24 en presencia y ausencia de sodio (Figura 35) tuvieron diferencias en su helicidad sobre TM2 (T103^{2.39}, Y106^{2.42} y A113^{2.49}) donde Y106^{2.42} es uno de los aminoácidos implicados en la potencia de DAMGO (requerir dosis más baja de la droga para igual respuesta) inducida por la insulina, debido a procesos de fosforilación/defosforilación (McLaughlin *et al.*, 2001). Diferencias sobre TM3 en Y149^{3.34} y Y166^{3.51}, este último está relacionado con la pérdida de eficacia (actividad máxima) de DAMGO cuando hay fosforilación (Clayton *et al.*, 2010). También, sobre TM5 en L257^{5.63}, ubicado en la parte intracelular de dicha hélice, se observó pérdida de helicidad sobre DAMGO-D-ICM-24+Na⁺, esto puede deberse al movimiento del lazo ICL3 como se observa en el FMA (Figura 36.E).

Las principales diferencias entre la morfina y DAMGO-D-ICM-24, ambas en sus configuraciones en ausencia de sodio están presentes en las hélices TM1 (G82^{1.46} y L83^{1.47}), TM2 (A113^{2.49}) y TM3 (Y166^{3.51}). Así como en el lazo ICL2 (V173^{ICL2} y K174^{ICL2}). En estos aminoácidos podría hacer la diferencia entre la desensibilización causada por la morfina y la internalización generada por DAMGO.

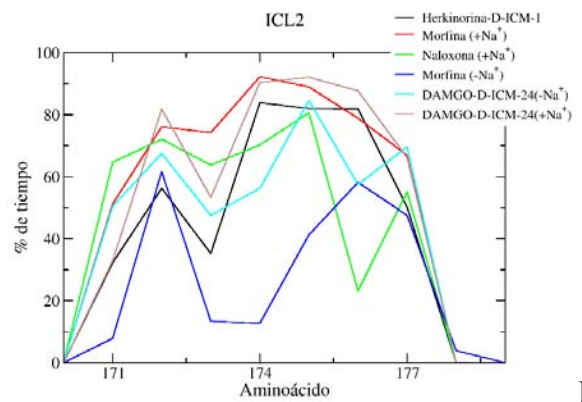
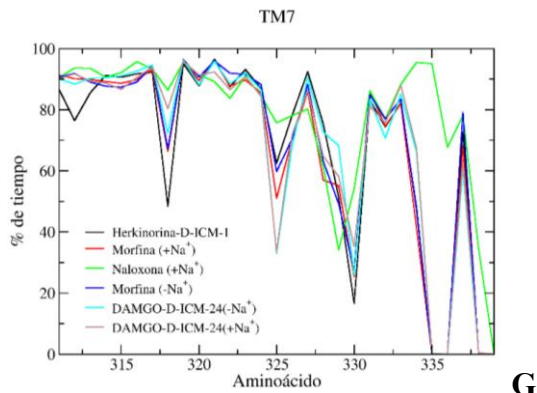
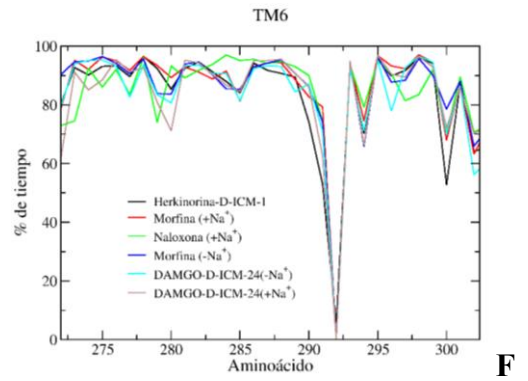
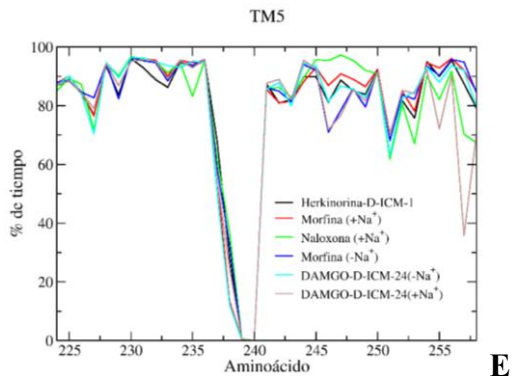
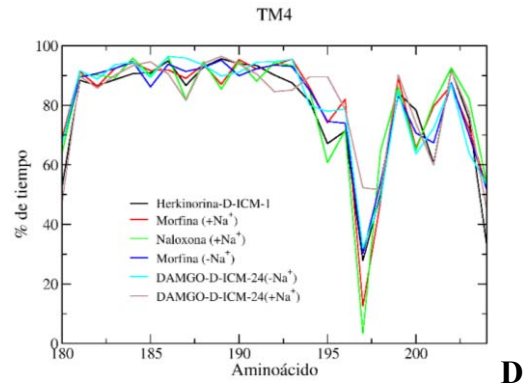
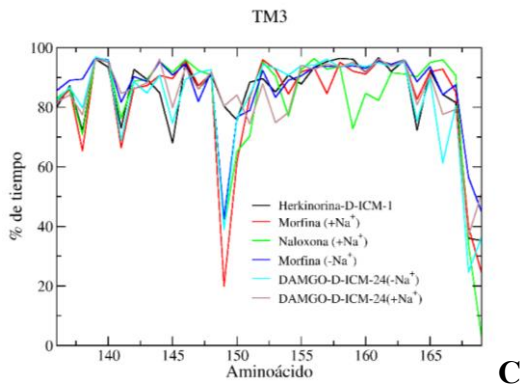
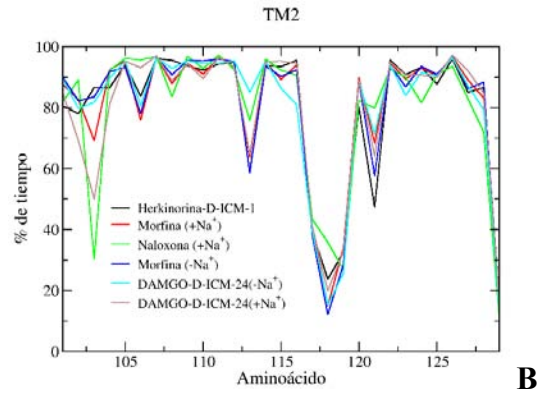
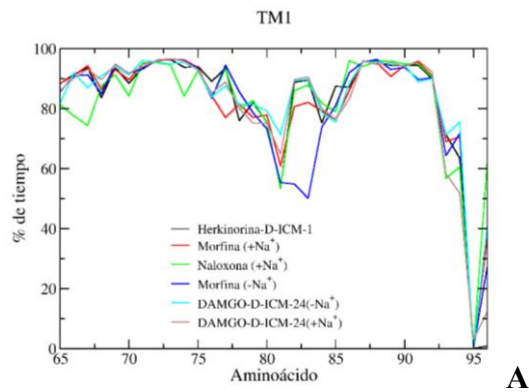


Figura 35. Persistencia de la helicidad medida como porcentajes en el tiempo de simulación para las hélices transmembranales y en los lazos importantes de MOR, calculado para los sistemas seleccionados como relevantes.

5.4.4.3 Análisis de modos funcionales (FMA)

El movimiento máximamente correlacionado del ensamble ponderado (ewMCM) usó como base la proyección p_a^* relacionándose con el RMSD del esqueleto del receptor (-N-C $_{\alpha}$ -CO-) como función de análisis (ver el anexo A). Dicha proyección fue construida con base a un número determinado de componentes principales (PC) mostrados en la Tabla 18.

FMA para la herkinorina, morfina y DAMGO

El FMA de la herkinorina-D-ICM-1 mostró que en general las hélices transmembranales conservan la posición del receptor activado, solamente en la parte más baja de la hélice TM6 donde se une con el lazo ICL3 tuvo un desplazamiento mínimo. El movimiento de ICL3, en la herkinorina-D-ICM-1, fue hacia adentro del receptor (Figura 36.A), pero aún tiene espacio para poder acoplar sistemas moleculares en la parte inferior del receptor, no como DAMGO-D-ICM-24+Na⁺ el cual pareciera que impide la unión por la posición de dichos sistemas (Figura 36.E). También, ICL2 en el sistema de la herkinorina-D-ICM-1 tuvo un movimiento adentrándose en el receptor, el cual se observó en la morfina+Na⁺, aunque muchísimo más pronunciado en la herkinorina-D-ICM-1.

Tabla 18. Número de componentes principales, PCs, usados para construir el análisis de modos funcionales, FMA, sobre el movimiento del esqueleto de MOR en los sistemas y configuraciones seleccionados como representativos.

| Molécula | PCs | R_m | R_c |
|--------------------------------|-----|--------|--------|
| Herkinorina-D-ICM-1 | 21 | 0.9286 | 0.7107 |
| Morfina+Na ⁺ | 42 | 0.9452 | 0.9321 |
| Morfina | 30 | 0.9583 | 0.8537 |
| Naloxona | 50 | 0.8815 | 0.9270 |
| DAMGO-D-ICM-24+Na ⁺ | 50 | 0.9759 | 0.8992 |
| DAMGO-D-ICM-24 | 10 | 0.9266 | 0.8771 |

* R_m (Coeficiente de correlación del modelo) y R_c (coeficiente de correlación de la validación cruzada) está determinado por el coeficiente de correlación de Pearson: $R = \frac{cov(f,p_a)}{\sigma_f \sigma_a}$

La hélice H8 tuvo movimientos distintos en los sistemas representativos (Figura 36). Para la herkinorina-D-ICM-1 y DAMGO-ICM-24+Na⁺ se observó un movimiento hacia dentro del receptor y para la morfina+Na⁺ se mostró hacia el interior de la célula e ICL1. La morfina en ausencia de sodio alostérico movió a H8 hacia ICL1, algo distinto de la configuración de la morfina con sodio. DAMGO-D-ICM-24 en ausencia de sodio giró a H8 hacia adentro del receptor con un movimiento que implicó mayor amplitud referente a los demás sistemas. Se observó que la herkinorina-D-ICM-1, morfina+Na⁺ y DAMGO-D-ICM-24+Na⁺ controlaron más el movimiento de H8, sin movimientos fuertes. Esto está en acuerdo con que TM7 esté involucrado en la trasmisión de la señal alostérica (Bartuzi *et al.*, 2016) y entonces influir en el movimiento de H8. Ahora, para TM7 se observó que los sistemas mantuvieron su forma y sus puntos de inflexión, que según la helicidad discutida anteriormente están en W318^{7.35}, Y326^{7.43}, C330^{7.47} y V334^{7.51}-Y336^{7.53} (puntos que tienen diferencia con la conformación inactiva). Hay que recordar que los aminoácidos W318^{7.35} y Y336^{7.53} son importantes en la trasmisión de la señal alostérica (Bartuzi *et al.*, 2016). Sin embargo, la helicidad en estos puntos no puede correlacionarse con un movimiento en específico, por lo que se cree que los demás aminoácidos en las TM2, TM3 y TM1 pueden influir en la trasmisión de la señal alostérica de TM7. Además, el hecho de que H8 no tenga su secuencia de aminoácidos completa dificulta la interpretación.

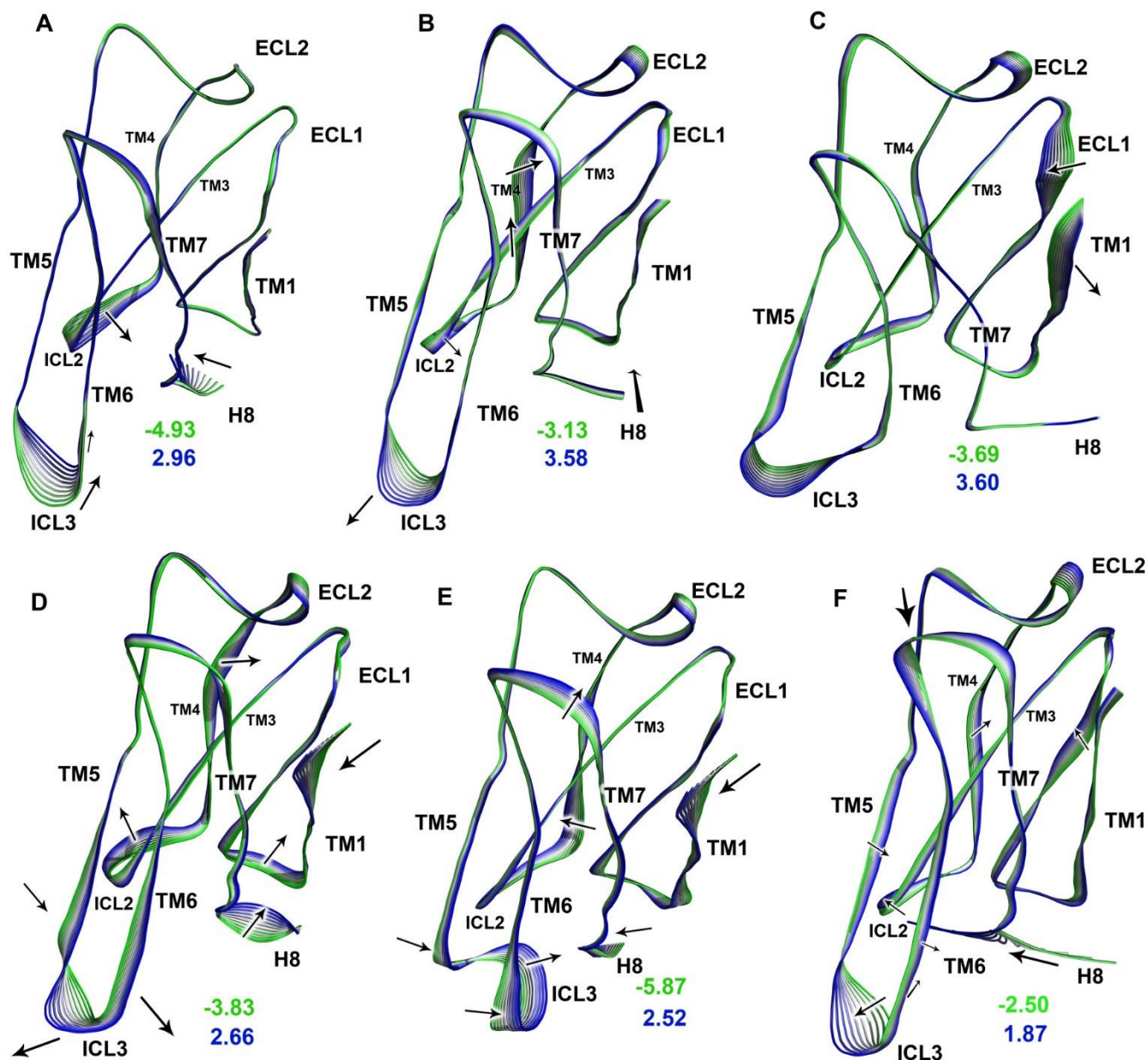


Figura 36. Modelos para el movimiento del esqueleto de MOR identificados desde el análisis de modos funcionales para: **A.** Herkinorina-D-ICM-1, **B.** Morfina+Na⁺, **C.** Naloxona (+Na⁺), **D.** Morfina (-Na⁺), **E.** DAMGO-D-ICM-24+Na⁺ y **F.** DAMGO-D-ICM-24 (-Na⁺). Los colores verde, blanco y azul representan el movimiento donde verde se refiere a movimientos correlacionados con valores bajos de RMSD e inicios de la dinámica, azul al movimiento en valores altos de RMSD correspondientes a tiempos finales de la dinámica y el blanco es un intermedio entre los anteriores.

En TM3 está el aminoácido N150^{3,35}, involucrado en la unión hacia las arrestinas (Fenalti *et al.*, 2014). La herkinorina-D-ICM-1 no presentó movimientos importantes en dicha hélice y fue controlado en una posición, mientras los demás ligandos, la morfina y DAMGO-D-ICM-24, en sus configuraciones con sodio y sin sodio tuvieron movimientos ya fuese en TM3 o en TM4. El hecho de que la herkinorina-D-

ICM-1 y DAMGO-D-ICM-24+Na⁺ mantuvieran la helicidad de TM3 en cercanía del aminoácido N150^{3.35} logró que la hélice se estabilizara sobre dicho punto, sin mayores movimientos.

Un movimiento del segundo lazo intracelular ICL2 podría estar disminuyendo la afinidad de enlaza a la proteína G, debido a que se hacen puentes de hidrógeno entre el nano cuerpo Nb39 en el cristal activo 5C1M y los aminoácidos en ICL2: P172, L176 y R179 (Huang *et al.*, 2015). Por lo que la conformación de MOR con la morfina en ausencia de sodio puede que sea menos afin a la proteína G por tener un movimiento pronunciado y contrario a morfina+Na⁺ acompañado de la pérdida de helicidad en dicha región. Esto podría estudiarse posteriormente incluyendo al Nb39 o la misma proteína G, midiendo la afinidad en el acoplamiento de cualquiera de estas dos estructuras, en sistema con los ligandos aquí estudiados.

FMA entre configuraciones en ausencia y presencia de sodio alostérico para DAMGO y la morfina

Es claro que MOR con la morfina en ausencia de sodio alostérico no tuvo indicios de inactivación porque su hélice TM6 no tuvo un movimiento que fue hacia adentro del receptor. Por otra parte, DAMGO-D-ICM-24+Na⁺ pareció estar siendo inactivado al orientar TM6 e ICL3 hacia dentro del receptor (Figura 36.E), algo que coincide con algunos puntos en la helicidad similares entre esta configuración y la de la naloxona, mencionada antes y vista en la Figura 35.

Las diferencias marcadas entre las configuraciones de la morfina y DAMGO-D-ICM-24+Na⁺, ambas en ausencia de sodio alostérico (Figuras 36.D y 36.F), estuvieron en los movimientos de ICL2, ICL1 y TM1, los cuales fueron más pronunciados en la morfina en ausencia de sodio. Además, de observar movimientos destacados sobre TM3 y H8 en DAMGO-D-ICM-24 en ausencia de sodio alostérico respecto de la morfina sin sodio.

La configuración de DAMGO-D-ICM-24 en ausencia de sodio alostérico (Figura 36.F) fue muy similar a la conformación del sistema de la morfina+Na⁺ (Figura 36.B) con sólo diferencias marcadas en el movimiento de H8 y TM2. Lo que hace pensar que sean las conformaciones aceptables para las uniones con sistemas moleculares en la parte intracelular del receptor y que por estar DAMGO-D-ICM-24 en ausencia de sodio genere inestabilidad y se den señales hacia la fosforilación y reclutamiento de las arrestinas, que llevan a la internalización del receptor. No obstante, la morfina podría retener más tiempo la configuración con sodio (apoyado con las energías relativas calculadas entre la configuración en ausencia y presencia de sodio en cada sistema), lo que permite que produzca menos fosforilaciones y menos reclutamiento. Luego de que la morfina pasa a su configuración en ausencia de sodio, las diferencias con la configuración con DAMGO-D-ICM-24 en ausencia de sodio podrían ser la clave entre la internalización de DAMGO y la desensibilización en la morfina (diferencias en H8, TM1, ICL1 y TM2). De igual forma son procesos molecularmente tan complejos que pueden estar también muy influenciados por otros sistemas.

Ahora el desplazamiento lateral de las hélices TM5 y TM6 cuando el sodio está ausente en su sitio alostérico en la morfina o DAMGO-D-ICM-24 (Figuras 36.D y 36.F) causa el traslado de ICL3, dicho lazo tiene al aminoácido E270 implicado en la interacción con el nano cuerpo en el cristal activo 5C1M de MOR que homóloga a la proteína-G (Huang *et al.*, 2015). Esto puede afectar entonces la unión con la proteína-G en los sistemas en ausencia de sodio alostérico.

Según el análisis de FMA, análisis de contactos y posiciones de las aguas dentro del receptor sugieren que la herkinorina-D-ICM-1, morfina+Na⁺ y DAMGO-D-ICM-24 en ausencia de sodio alostérico sean las configuraciones que den soporte a la selectividad funcional encontrada para cada uno de ellos.

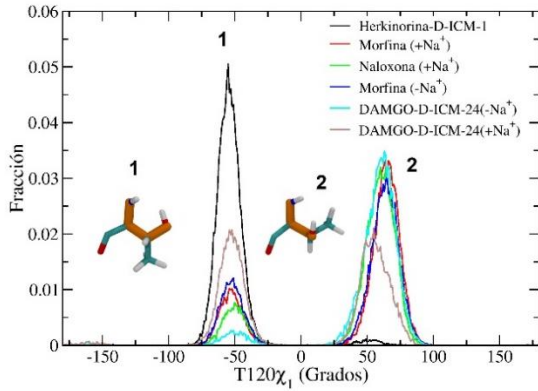
5.4.4.4 Ángulos diedros de las cadenas laterales para aminoácidos importantes en el sitio de unión y en el sitio alostérico del sodio

Aminoácidos en el sitio ortostérico

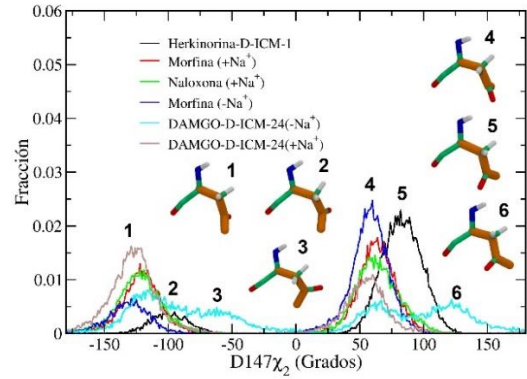
Para el aminoácido T120^{2.56}, hubo una gran similitud entre la forma de distribución del ángulo χ_1 entre las dos configuraciones de la morfina (con sodio y sin sodio), la naloxona y DAMGO-D-ICM-24 en ausencia de sodio alostérico (62 ° el más poblado y -51 ° población muy pequeña; Figura 37.A). La distribución más poblada de este ángulo en los sistemas mencionados se debe a un mayor acercamiento hasta el aminoácido D147^{3.32} desde interacciones directas o través de moléculas de agua entre el hidroxilo de la treonina y dicho aspartato. Por otra parte, T120^{2.56} en el sistema de la herkinorina-D-ICM-1 está generando una mayor distribución sobre -54 ° para χ_1 , donde el hidroxilo de la treonina está posicionado hacia afuera del receptor, aunque puede interactuar con el aspartato D147^{3.32} a través de moléculas de agua. Hay que mencionar que la distribución para la morfina en presencia y ausencia de sodio alostérico es igual, mientras DAMGO-D-ICM-24+Na⁺ comienza a aumentar la distribución sobre -54 ° (como la herkinorina) después de que este sistema cambia la posición de T120^{2.56} en los 169 ns de la dinámica, respecto de la configuración sin sodio. Sin embargo, hay que recordar que la disposición de ICL3 en esta configuración de DAMGO-D-ICM-24+Na⁺ podría desfavorecer alguna unión molecular en la parte intracelular del receptor.

Para D147^{3.32} (Figura 37.B), todos los sistemas trataron de seguir la misma tendencia de distribución para su ángulo χ_2 . En este aminoácido, las distribuciones son más alternadas por la rotación del grupo carboxilato, pero que son indistinguibles una de otra. La herkinorina-D-ICM-1 desplaza la distribución χ_2 hacia ángulos más positivos (-120 ° y 63 ° para configuraciones de DAMGO-D-ICM-24, la morfina [con y sin sodio] y naloxona, mientras -100 ° y 83 ° para la herkinorina-D-ICM-1). La herkinorina-D-ICM-1 tiene preferencia hacia el ángulo de 83 °. DAMGO-D-ICM-24 en ausencia de sodio comienza a generar distribuciones sobre los ángulos -60 ° y 120 °, que recorre la distribución a valores más positivos que la herkinorina-D-ICM-1 lo que puede afectar la forma en que TM3 transformaría la señal respecto de los demás sistemas.

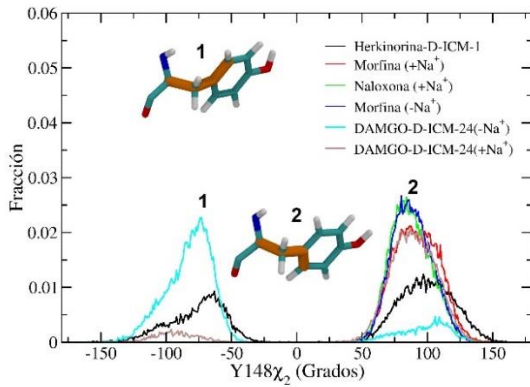
Para Y148^{3.33} (Figura 37.C), esta vez la herkinorina-D-ICM-1 presenta dos distribuciones para χ_2 (-65 ° y 95 °), las cuales son indistinguibles entre sí pero que pueden hablar del hecho de que este aminoácido puede rotar más libremente para el sistema de la herkinorina-D-ICM-1. Mientras para las configuraciones de DAMGO-D-ICM-24 (con y sin sodio), la morfina (con y sin sodio) y naloxona tienen preferencia por una distribución lo que indica menos libertad de rotación en este aminoácido. Lo que puede afectar, también, la señalización alostérica transmitida por la hélice TM3. Así, la libertad de rotación en el sistema de la herkinorina puede estar afectando de forma positiva la señalización de TM3.



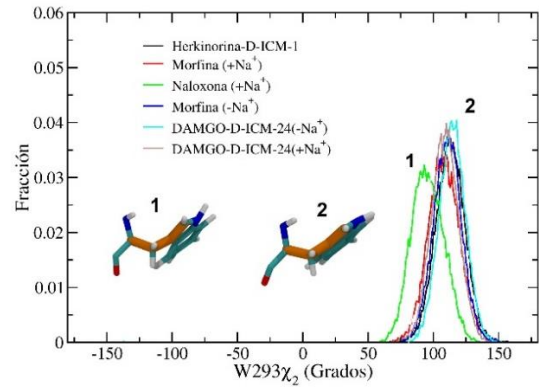
A



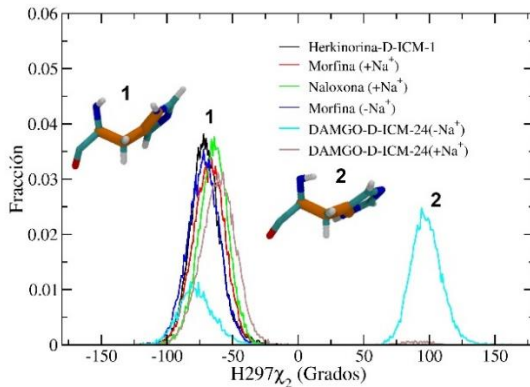
B



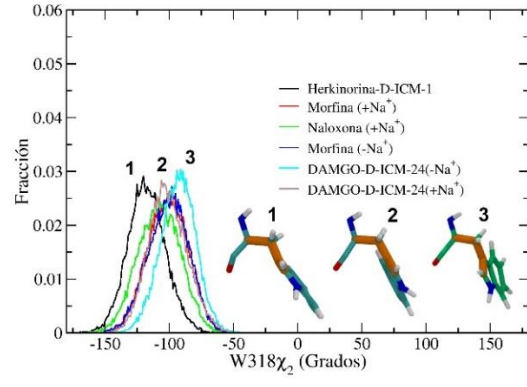
C



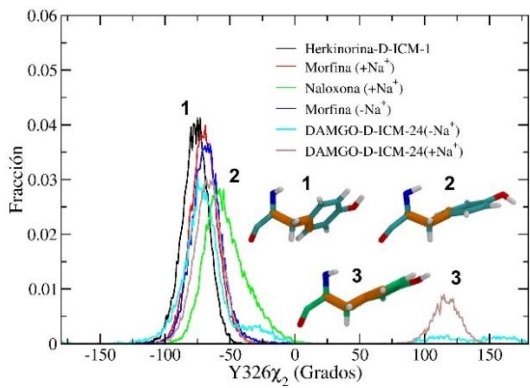
D



E



F



G

Figura 37. Distribución en la dinámica molecular de los ángulos diedros de las cadenas laterales de los aminoácidos involucrados en el sitio de unión ortostérico del receptor opioide mu, en los sistemas representativos.

W293^{6.48} (Figura 37.D), tiene diferencia de $\sim 40^\circ$ para χ_2 entre la estructura activa (121°) e inactiva (79°) en los cristales resueltos de MOR y está pensado como uno de los aminoácidos involucrados en el movimiento de la hélice TM6 en la activación (Huang *et al.*, 2015; Manglik *et al.*, 2012). En la dinámica se observa que la naloxona que conserva al estado inactivo se distribuye alrededor 95° aumentando su valor respecto al cristal inactivo, mientras los agonistas, sin importar la ausencia de sodio, se distribuyen alrededor del valor 108° y 113° lo que disminuye el valor respecto del cristal activo. A pesar de esto sigue conservándose una diferencia de $\sim 15^\circ$ entre los dos estados del receptor sobre los valores más altos de la distribución.

H297^{6.52} (Figura 37.E), llegó a una distribución igual en el valor del ángulo χ_2 sobre todos los sistemas y configuraciones, permaneciéndose alrededor de -65° en todos los casos. Sin embargo, para la configuración de DAMGO-D-ICM-24 en ausencia de sodio alostérico hay un cambio en el ángulo χ_2 distribuyéndose sobre 95° lo que no permite que puedan formarse interacciones entre el fenol de DAMGO y este aminoácido mediadas a través de moléculas de agua, lo que obliga a tener una interacción directa. Experimentalmente es un aminoácido compartido para agonistas y antagonistas, reduciendo la afinidad en ambos casos (Spivak *et al.*, 1997).

El ángulo χ_2 de W318^{7.35} (Figura 37.F), tiene una sola distribución alrededor de los -108° en la naloxona y DAMGO-D-ICM-24+Na⁺, en los -101° para la morfina en ausencia o presencia de sodio y -120° en la herkinorina-D-ICM-1. La diferencia para la herkinorina-D-ICM-1 se relaciona con los resultados de helicidad, al generar una mayor pérdida de hélice alfa en W318^{7.35}. Esto puede estar asociado con la transmisión de señal alostérica en TM7 como muestran estudios de dinámica molecular (Bartuzi *et al.*, 2016; Livingston *et al.*, 2014), usando al sodio alostérico, presencia de un agonista total y un modulador alostérico positivo en la parte extracelular. En nuestro caso la herkinorina-D-ICM-1 no emplaza al ion sodio, pero modula en este aminoácido lo que puede favorecer positivamente la señalización.

Y326^{7.43} (Figura 37.G), involucrado en efectos sobre pérdida de la afinidad para algunos agonistas cuando se muta por fenilalanina (Pil *et al.*, 2003), encuentra diferencias en la distribución del ángulo χ_2 con valores para la herkinorina-D-ICM-1 de -76° , para la morfina con o sin sodio alostérico y DAMGO-D-ICM-24 sin sodio de -70° y para DAMGO-D-ICM-24+Na⁺ y la naloxona de -54° . Hay distribuciones de χ_2 para los sistemas DAMGO-D-ICM-24+Na⁺ alrededor de 118° , igualmente DAMGO-D-ICM-24 en ausencia de sodio tiene pequeñas distribuciones en estas regiones, que los demás sistemas no la presentan. Así, que puede modificar la señalización que genere TM7.

Aminoácidos en el sitio alostérico

Los movimientos en el sitio alostérico de sodio en MOR se diferencian entre la herkinorina-D-ICM-1, morfina+Na⁺ y naloxona en el aminoácido D114^{2.50} ya que la herkinorina-D-ICM-1 (157°) y naloxona (-38°) se presenta una sola distribución de probabilidad del ángulo χ_2 , mientras la morfina+Na⁺ presenta dos distribuciones de probabilidad, las cuales están ubicadas una en la distribución de la herkinorina-D-ICM-1 y la otra que ocupa la naloxona. Así, la herkinorina-D-ICM-1 parece darle menos libertad rotacional a D114^{2.50} al ubicar un grupo aromático cerca del sitio alostérico. Por su parte, DAMGO-D-ICM-24+Na⁺ se distribuye cerca de la herkinorina-D-ICM-1 generando una sola distribución, mientras DAMGO-D-ICM-24 en ausencia de sodio se distribuye en una sola población cerca de la naloxona, cambio que puede favorecer en la señalización de arrestinas.

En uno de los aminoácidos importantes en la selectividad funcional N150^{3.35} (Figura 38.B), se tiene una preferencia sobre la distribución del ángulo χ_1 sobre -70° en todos los sistemas. Sin embargo, el sistema de DAMGO-D-ICM-24+Na⁺ muestra aumento sobre el ángulo de 80° donde el grupo carbonilo de la amida comienza a realizar interacciones directas con el sodio alostérico al igual como en estudios de dinámicas en MOR, DOR y KOR con dicho ion sodio y algunos agonistas (Shang *et al.*, 2014), lo que indicaría el no reclutamiento de arrestina (Fenalti *et al.*, 2014). La morfina en ausencia de sodio comienza a dar distribuciones distintas (-28° y 147°) de las que hacen los otros sistemas en el ángulo de -70° , lo que desfavorece tener procesos indeseados. La herkinorina-D-ICM-1 en sus últimos 8 nanosegundos hace un cambio en el ángulo hacia -160° el cual podría aumentar su probabilidad con el correr de las dinámicas y que sea la clave para la señalización de TM3. Sin embargo, DAMGO-D-ICM-24 en ausencia de sodio alostérico no da indicio alguno de ángulos favorables en χ_1 que impidan la señalización hacia procesos no deseados como fosforilaciones, reclutamiento de arrestinas e internalización.

Para el ángulo χ_2 de N150^{3.35} se observa una importante separación de la distribución para la herkinorina-D-ICM-1 (-36°) y configuraciones de la morfina con o sin sodio, naloxona y DAMGO-D-ICM-24 en ausencia de sodio (-73°). Esta última distribución deja a la cadena lateral de N150^{3.35} con poca interacción con el sitio ortostérico y el ion sodio. El sistema DAMGO-D-ICM-24+Na⁺ por su parte orienta a χ_2 en un ángulo para que el carbonilo de la amida haga interacción con el sodio alostérico (73°). También, como en χ_1 en el aminoácido N150^{3.35}, la configuración de la morfina en ausencia de sodio encuentra a otras distribuciones para χ_2 (148° y 40°) diferentes de la principal, que las configuraciones de DAMGO-ICM-24 en ausencia y presencia de sodio no logran hacer, lo que puede dar forma a la diferencia de señalización entre la morfina y DAMGO. La herkinorina-D-ICM-1 en sus últimos 8 nanosegundos cambia su ángulo hacia 40° , esto que hace que el grupo amida también se adentre hacia el receptor, lo que modularía positivamente la señal del receptor hacia procesos no deseados.

En el residuo S154^{3.39} puede observarse una diferencia para el antagonista naloxona la cual tiene solamente una distribución alrededor del ángulo -57° para χ_1 , mientras que para los agonistas morfina+Na⁺, DAMGO-D-ICM-24+Na⁺ y herkinorina-D-ICM-1 parecen importantes las distribuciones alrededor de los ángulos -60° y -165° . Hace pensar que esta sea una distribución característica de agonistas. Ahora, para la herkinorina se encuentra una distribución no compartida en 66° , ésta sólo se ve en las configuraciones de DAMGO-D-ICM-24 y la morfina, ambas, en ausencia de sodio alostérico. El hecho de que la herkinorina posea tres distribuciones puede cambiar la forma de señalización sobre TM3 con esta serina. Para agregar en la morfina y DAMGO-D-ICM-24 en ausencia de este sodio se observan dos distribuciones importantes en los ángulos de 65° y -170° (compartidas con herkinorina-D-ICM-1), pero no logran generar una distribución en -60° como la herkinorina-D-ICM-1.

S329^{7.46} presenta el ángulo χ_1 en la naloxona, la morfina+Na⁺ y DAMGO+Na⁺ sobre el ángulo de -61° , sin ninguna otra distribución. Por otro lado, la herkinorina-D-ICM-1 presenta distribución sobre 74° , -57° y -169° , con una mayor población a los 74° . Por otra parte, la morfina y DAMGO-D-ICM-24 en ausencia de sodio presentan poblaciones al igual que en la herkinorina-D-ICM-1, con la diferencia de que en este último sistema la distribución encontrada en -60° , está más poblada que para las mencionadas configuraciones de morfina y DAMGO-D-ICM-24. Otra vez la herkinorina presenta una distribución distinta en un aminoácido de serina implicado en la zona del sodio alostérico pero está vez sobre TM7, lo que puede influir en su señalización.

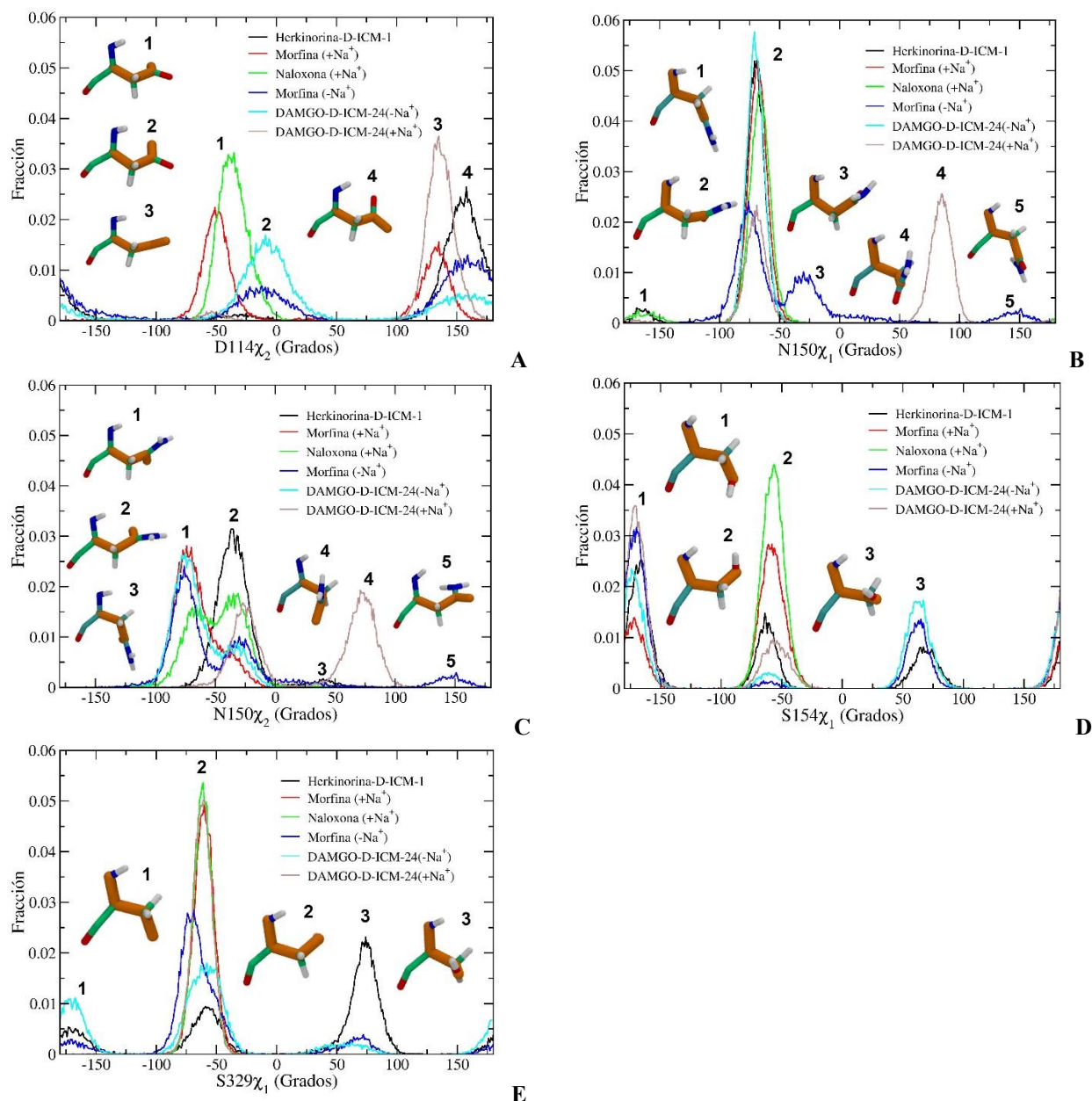


Figura 38. Distribución en la dinámica molecular de los ángulos diedros de las cadenas laterales de los aminoácidos involucrados en el sitio alostérico del sodio en el receptor opioide μ , para los sistemas representativos.

5.5 Resultados importantes

Los estudios de *docking* y dinámica molecular presentados en este trabajo permitieron obtener posibles modos de unión de ligandos agonistas y antagonistas de MOR. Los subsiguientes cálculos de energía libre permitieron discernir un modo de unión realista. Dichos resultados fueron comparados y contrastados con datos experimentales disponibles en la literatura. Finalmente, las diferencias en las disposiciones espaciales sugeridas por estos modelos y apoyados por datos experimentales disponibles, permitieron postular las diferencias para soportar los caminos de señalización debidos a los diferentes ligandos, es decir la selectividad funcional debida a ellos.

Para la morfina y la naloxona, los modos de unión concuerdan con lo reportado previamente y fueron usados en este trabajo como referencia. Para la herkinorina y DAMGO, los modos de unión fueron discernibles entre ellos a través de las energías de unión calculadas y del análisis de las interacciones presentes en el proceso de reconocimiento molecular. Además, este trabajo destaca la importancia del sitio de unión del ion sodio en el reconocimiento de la morfina, herkinorina y DAMGO.

Selección de DAMGO: Las conformaciones DAMGO-D-ICM-24, en presencia y ausencia de sodio, permiten explicar los datos experimentales disponibles para dicha molécula. En particular, los modelos DAMGO-D-ICM-24 tienen soporte en datos cristalográficos de DOR, contactos que explican la selectividad de DAMGO hacia MOR y la dependencia del ion sodio.

Selección de la posición de la herkinorina: El cálculo de energía de unión permitió discernir entre posibles modos de unión de la herkinorina, encontrándose que la configuración nombrada D-ICM-1 tiene una energía de unión calculada cercana a la reportada experimentalmente y puede contactar con N127^{2.63} implicado en ensayos de selectividad entre MOR y DOR, soportando la selectividad de la herkinorina-D-ICM-1 hacia MOR. Esto permite postular que la herkinorina actúa como agonista alostérico. El modelo permite proponer que la herkinorina se une en el sitio alostérico del sodio, teniendo interacción con el aminoácido N150^{3.35} y manteniendo contactos con los aminoácidos S154^{3.39} y S329^{7.46}. Esto podría redundar, posiblemente, en la ausencia de fosforilación de aminoácidos implicados al reclutamiento de las arrestinas y posterior internalización del receptor.

Dependencia del ion sodio: Con las diferencias relativas de la energía libre entre los sistemas en ausencia y presencia de sodio de las configuraciones de la morfina y DAMGO-D-ICM-24, se logró observar la dependencia del ion sodio en el sitio alostérico. Esto es relevante ya que esta dependencia es observada experimentalmente para ligandos agonistas.

La morfina tiene una diferencia en la energía libre relativa entre sus configuraciones con ausencia y presencia de sodio más baja respecto a DAMGO-D-ICM-24 con esas mismas configuraciones. Esto permitiría que la morfina retenga más fácilmente dicho sodio alostérico y prevenga el reclutamiento de las arrestinas. Por otro lado, la morfina en ausencia de sodio alostérico ve favorecida poblaciones en los ángulos diedros de las cadenas laterales del aminoácido N150^{3.35} hacia conformaciones que no transmitirían la señalización de las arrestinas. En contraste, esto no se logra para el modelo de DAMGO-D-ICM-24 en ausencia de sodio.

Efecto de los modos de unión propuestos en la selectividad funcional de MOR: La configuración DAMGO-D-ICM-24, en presencia de sodio alostérico, muestra que su lazo ICL3, unido a TM5 y TM6, muy probablemente impediría la unión con algún sistema en la parte intracelular del receptor. No obstante, la configuración de DAMGO-D-ICM-24 en ausencia de sodio no tendría dicho obstáculo. Sin embargo, al desplazar el sodio alostérico podría beneficiar la señalización de arrestinas y su reclutamiento, como comentan algunos estudios experimentales.

La mayor flexibilidad de DAMGO respecto a la morfina y la herkinorina, afecta la señalización alostérica. Con DAMGO-D-ICM-24 se obtuvo que, en presencia de sodio alostérico, su grupo fenilo y alcohol primario se ubican hacia TM3 y TM7, mientras que en ausencia de sodio estos grupos se orientan hacia

TM5. La pérdida de interacción con aminoácidos en TM3 y TM7 implica la pérdida de señalización alostérica sobre dichas hélices.

La herkinorina-D-ICM-1 induce linealidad a la hélice TM3, es decir no está presente el evidente punto de inflexión cercano a N150^{3,35}, observado en los demás sistemas. La linealidad en la TM3 podría estar asociada a la falta de señalización de arrestina y su reclutamiento.

Finalmente, la hidratación dentro de MOR con la herkinorina-D-ICM-1, la morfina en presencia de sodio alostérico y DAMGO-D-ICM-24 en ausencia de sodio alostérico, resultó un tanto similar. La hidratación específica observada en estos tres sistemas de la herkinorina-D-ICM-1, morfina en presencia de sodio y DAMGO-D-ICM-24 en ausencia de sodio alostérico puede permitir que el receptor genere su señal canónica y ayude a explicar el hecho de que DAMGO presente señalización vía arrestina y la subsecuente internalización al ser el único, dentro de estos tres arreglos, que no tiene cómo modular el sitio alostérico de sodio.

Con la identificación del modo de unión más plausible de la herkinorina (D-ICM-1), quizá sea posible mejorar la selección de moduladores de MOR, tomando en cuenta puntos de contacto en el sitio alostérico del ion sodio, con el fin de disminuir efectos adversos a la salud.

6. CONCLUSIONES

El modo de unión relevante encontrado para la herkinorina fue la herkinorina-D-ICM-1 en ausencia de sodio alostérico. Para la morfina y el DAMGO fueron: DAMGO-D-ICM-24 y morfina, tanto en sus configuraciones en ausencia como en presencia de sodio alostérico.

Los puntos relevantes en los distintos modos de unión propuestos son: 1) la presencia del grupo C2-benziloxi de la herkinorina-D-ICM-1 y contactos con aminoácidos del sitio alostérico del sodio impiden la presencia de dicho ion. 2) los contactos del aminoácido N127^{2.63} con la herkinorina-D-ICM-1 y con DAMGO-D-ICM-24+Na⁺, son consistentes con la selectividad reportada entre MOR y DOR. 3) las interacciones mediadas por moléculas de agua, entre el ligando y el aminoácido H296^{6.52} presentes en los modos de unión relevantes son consistentes con lo reportado en datos cristalográficos. 4) la presencia o ausencia de sodio condujo a cambios conformacionales y de contactos en DAMGO-D-ICM-24.

Los puntos relevantes en cambios estructurales del receptor opioide mu son: 1) La linealidad en TM3 debida a Y149^{3.34}, la pérdida de helicidad en TM7 inducida por W318^{7.35} y el cambio de los ángulos χ_2 de los aminoácidos N150^{3.35} y en W318^{7.35} fueron características en la herkinorina-D-ICM-1. 2) La herkinorina-D-ICM-1 impide la formación del canal de agua en el receptor opioide mu como sí se observó en los otros sistemas. 3) Los patrones de distribución de las moléculas de agua y el movimiento *ewMCM* del FMA de la herkinorina-D-ICM-1, la morfina en presencia y DAMGO-D-ICM-24 en ausencia de sodio alostérico, fueron similares entre ellos. 4) En el modelo de la herkinorina-D-ICM-1 se produjo un movimiento en ICL3 contrario a lo observado en la morfina en presencia de sodio alostérico y DAMGO-D-ICM-24 en ausencia de dicho ion sodio. 5) La presencia de sodio alostérico en el sistema de DAMGO-D-ICM-24 en ausencia de sodio alostérico generó un movimiento pronunciado en la hélice H8. 6) El movimiento de las siete hélices transmembranales, en general, es similar en los sistemas de la herkinorina-D-ICM-1, morfina en presencia de sodio alostérico y DAMGO-D-ICM-24 en ausencia de dicho ion.

Los modelos receptor-ligando que soportan el hecho de que la morfina no produzca y que DAMGO presente una marcada internalización son los referidos a morfina en presencia de sodio alostérico y DAMGO-D-ICM-24 en ausencia de dicho ion, prediciendo que en DAMGO se desfavorece la retención del ion sodio referente a morfina.

El modelo receptor-ligando que soportan el hecho de que un ligando favorezca el reclutamiento de arrestinas e internalización del receptor aun así se modifiquen condiciones en el ambiente, se presentaría en la herkinorina-D-ICM-1, la cual no dependerá del hecho de que el sodio module el sitio alostérico cercano a D114^{2.50}, sino que dicha molécula modularía directamente sobre esta zona.

7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abagyan, R., & Kufareva, I. (2009). The Flexible Pocketome Engine for Structural Chemical Genomics. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 575, 249-279.
- Abagyan, R., Raush, R., & Totrov, M. (2013). ICM Manual v.3.7. La Jolla, CA: MolSoft LLC.
- Abagyan, R., & Totrov, M. (1994). Biased Probability Monte Carlo Conformational Searches and Electrostatic Calculations for Peptides and Proteins. *Journal of Molecular Biology*, 235, 983-1002.
- 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.
- Al-Hasani, P. D. R., & Bruchas, P. D. Michael R. (2011). Molecular Mechanisms of Opioid Receptor-dependent Signaling and Behavior. *Anesthesiology*, 115(6), 1363-1381.
- Alvarez, V. A., Arttamangkul, S., Dang, V., Salem, A., Whistler, J. L., von Zastrow, M., Grandy, D. K., & Williams, J. T. (2002). μ -Opioid Receptors: Ligand-Dependent Activation of Potassium Conductance, Desensitization, and Internalization. *The Journal of Neuroscience*, 22(13), 5769-5776.
- An, J., Totrov, M., & Abagyan, R. (2005). Pocketome via Comprehensive Identification and Classification of Ligand Binding Envelopes. *Molecular & Cellular Proteomics*, 4(6), 752-761.
- Arnold, K., Bordoli, L., Kopp, J., & Schwede, T. (2006). The SWISS-MODEL workspace: a web-based environment for protein structure homology modelling. *Bioinformatics*, 22(2), 195-201.
- Atanasov, A. G., Blunder, M., Fakhrudin, N., Liu, X., Noha, S. M., Malainer, C., Kramer, M. P., Cocic, A., Kunert, O., Schinkovitz, A., Heiss, E. H., Schuster, D., Dirsch, V. M., & Bauer, R. (2013). Polyacetylenes from *Notopterygium incisum*—New Selective Partial Agonists of Peroxisome Proliferator-Activated Receptor-Gamma. *PLoS ONE*, 8(4), e61755.
- Ballesteros, J. A., & Weinstein, H. (1995). [19] Integrated methods for the construction of three-dimensional models and computational probing of structure-function relations in G protein-coupled receptors. In C. S. Stuart (Ed.), *Methods in Neurosciences* (Vol. Volume 25, pp. 366-428): Academic Press.
- 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.
- Bartuzi, D., Kaczor, A. A., & Matosiuk, D. (2016). Interplay between Two Allosteric Sites and Their Influence on Agonist Binding in Human μ Opioid Receptor. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 56(3), 563-570.
- Befort, K., Tabbara, L., Bausch, S., Chavkin, C., Evans, C., & Kieffer, B. (1996). The conserved aspartate residue in the third putative transmembrane domain of the delta-opioid receptor is not the anionic counterpart for cationic opiate binding but is a constituent of the receptor binding site. *Molecular Pharmacology*, 49(2), 216-223.
- Béguin, C., Potter, D. N., DiNieri, J. A., Munro, T. A., Richards, M. R., Paine, T. A., Berry, L., Zhao, Z., Roth, B. L., Xu, W., Liu-Chen, L.-Y., Carlezon, W. A., & Cohen, B. M. (2008). N-Methylacetamide Analog of Salvinorin A: A Highly Potent and Selective κ -Opioid Receptor Agonist with Oral Efficacy. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 324(1), 188-195.

- Benkert, P., Biasini, M., & Schwede, T. (2011). Toward the estimation of the absolute quality of individual protein structure models. *Bioinformatics*, 27(3), 343-350.
- Bennett, C. H. (1976). Efficient estimation of free energy differences from Monte Carlo data. *Journal of Computational Physics*, 22(2), 245-268.
- Berendsen, H. J. C., van der Spoel, D., & van Drunen, R. (1995). GROMACS: A message-passing parallel molecular dynamics implementation. *Computer Physics Communications*, 91(1-3), 43-56.
- Best, R. B., Zhu, X., Shim, J., Lopes, P. E. M., Mittal, J., Feig, M., & MacKerell, A. D. (2012). Optimization of the additive CHARMM all-atom protein force field targeting improved sampling of the backbone ϕ , ψ and side-chain $\chi(1)$ and $\chi(2)$ dihedral angles. *Journal of Chemical Theory and Computation*, 8(9), 3257-3273.
- Biasini, M., Bienert, S., Waterhouse, A., Arnold, K., Studer, G., Schmidt, T., Kiefer, F., Cassarino, T. G., Bertoni, M., Bordoli, L., & Schwede, T. (2014). SWISS-MODEL: modelling protein tertiary and quaternary structure using evolutionary information. *Nucleic Acids Research*, 42(Web Server issue), W252-W258.
- Bohn, L. M., Gainetdinov, R. R., Lin, F.-T., Lefkowitz, R. J., & Caron, M. G. (2000). $[\mu]$ -Opioid receptor desensitization by $[\beta]$ -arrestin-2 determines morphine tolerance but not dependence. *Nature*, 408(6813), 720-723.
- 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.
- Bot, G., Blake, A. D., Li, S., & Reisine, T. (1998). Fentanyl and its Analogs Desensitize the Cloned μ Opioid Receptor. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 285(3), 1207-1218.
- Boyce, S. E., Mobley, D. L., Rocklin, G., Graves, A. P., Dill, K. A., & Shoichet, B. K. (2009). Predicting ligand binding affinity with alchemical free energy methods in a polar model binding site. *Journal of Molecular Biology*, 394(4), 747-763.
- Brenk, R., Vetter, S. W., Boyce, S. E., Goodin, D. B., & Shoichet, B. K. (2006). Probing Molecular Docking in a Charged Model Binding Site. *Journal of Molecular Biology*, 357(5), 1449-1470.
- Brooks, B. R., Brooks, C. L., MacKerell, A. D., Nilsson, L., Petrella, R. J., Roux, B., Won, Y., Archontis, G., Bartels, C., Boresch, S., Caflisch, A., Caves, L., Cui, Q., Dinner, A. R., Feig, M., Fischer, S., Gao, J., Hodoscek, M., Im, W., Kuczera, K., Lazaridis, T., Ma, J., Ovchinnikov, V., Paci, E., Pastor, R. W., Post, C. B., Pu, J. Z., Schaefer, M., Tidor, B., Venable, R. M., Woodcock, H. L., Wu, X., Yang, W., York, D. M., & Karplus, M. (2009). CHARMM: The Biomolecular Simulation Program. *Journal of Computational Chemistry*, 30(10), 1545-1614.
- Butelman, E. R., & Kreek, M. J. (2015). Salvinorin A, a kappa-opioid receptor agonist hallucinogen: pharmacology and potential template for novel pharmacotherapeutic agents in neuropsychiatric disorders. *Frontiers in Pharmacology*, 6, 190.
- Bystroff, C., & Garde, S. (2003). Helix propensities of short peptides: Molecular dynamics versus bioinformatics. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 50(4), 552-562.
- Clark, A. M., Labute, P., & Santavy, M. (2006). 2D Structure Depiction. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 46(3), 1107-1123.
- Claude-Geppert, P. A., Liu, J., Solberg, J., Erickson-Herbrandson, L. J., Loh, H. H., & Law, P.-Y. (2005). Antagonist Efficacy in MORS196L Mutant Is Affected by the Interaction between Transmembrane Domains of the Opioid Receptor. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 313(1), 216-226.

- Clayton, C. C., Bruchas, M. R., Lee, M. L., & Chavkin, C. (2010). Phosphorylation of the μ -Opioid Receptor at Tyrosine 166 (Tyr3.51) in the DRY Motif Reduces Agonist Efficacy. *Molecular Pharmacology*, 77(3), 339-347.
- Cong, X., Campomanes, P., Kless, A., Schapitz, I., Wagener, M., Koch, T., & Carloni, P. (2015). Structural Determinants for the Binding of Morphinan Agonists to the μ -Opioid Receptor. *PLoS ONE*, 10(8), e0135998.
- Corbeil, C. R., Williams, C. I., & Labute, P. (2012). Variability in docking success rates due to dataset preparation. *Journal of Computer-Aided Molecular Design*, 26(6), 775-786.
- Chakrabarti, S., Yang, W., Law, P.-Y., & Loh, H. H. (1997). The μ -Opioid Receptor Down-Regulates Differently from the δ -Opioid Receptor: Requirement of a High Affinity Receptor/G Protein Complex Formation. *Molecular Pharmacology*, 52(1), 105-113.
- Chen, Y., Mestek, A., Liu, J., Hurley, J. A., & Yu, L. (1993). Molecular Cloning and Functional Expression of a μ -Opioid Receptor from Rat Brain. *Molecular Pharmacology*, 44, 8-12.
- Cheng, J., Sun, X., Li, W., Liu, G., Tu, Y., & Tang, Y. (2016). Molecular switches of the κ opioid receptor triggered by 6'-GNTI and 5'-GNTI. *Scientific Reports*, 6, 18913.
- Chipot, C., & Pohorille, A. (2007). Calculating Free Energy Differences Using Perturbation Theory. In C. Chipot & A. Pohorille (Eds.), *Free Energy Calculations: Theory and Applications in Chemistry and Biology* (pp. 33-75). Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.
- Christie, M. J. (2008). Cellular neuroadaptations to chronic opioids: tolerance, withdrawal and addiction. *British Journal of Pharmacology*, 154(2), 384-396.
- Dang, V. C., & Williams, J. T. (2004). Chronic Morphine Treatment Reduces Recovery from Opioid Desensitization. *The Journal of Neuroscience*, 24, 7699-7706.
- de Ruiter, A., Boresch, S., & Oostenbrink, C. (2013). Comparison of thermodynamic integration and Bennett acceptance ratio for calculating relative protein-ligand binding free energies. *Journal of Computational Chemistry*, 34(12), 1024-1034.
- Dhawan, B. N., Cesselin, F., Raghubir, R., Reisine, T., Bradley, P. B., Portoghese, P. S., & Hamon, M. (1996). International Union of Pharmacology. XII. Classification of Opioid Receptors. *Pharmacological Reviews*, 48(4), 567-592.
- Doll, C., Konietzko, J., Pöll, F., Koch, T., Höllt, V., & Schulz, S. (2011). Agonist-selective patterns of μ -opioid receptor phosphorylation revealed by phosphosite-specific antibodies. *British Journal of Pharmacology*, 164(2), 298-307.
- Doll, C., Pöll, F., Peuker, K., Loktev, A., Glück, L., & Schulz, S. (2012). Deciphering μ -opioid receptor phosphorylation and dephosphorylation in HEK293 cells. *British Journal of Pharmacology*, 167(6), 1259-1270.
- Elliott, J., Guo, L., & Traynor, J. R. (1997). Tolerance to μ -opioid agonists in human neuroblastoma SH-SY5Y cells as determined by changes in guanosine-5'-O-(3-[³⁵S]-thio)triphosphate binding. *British Journal of Pharmacology*, 121(7), 1422-1428.
- Emmerson, P. J., Liu, M. R., Woods, J. H., & Medzihradsky, F. (1994). Binding affinity and selectivity of opioids at mu, delta and kappa receptors in monkey brain membranes. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 271(3), 1630-1637.
- Evans, D. J., & Holian, B. L. (1985). The Nose-Hoover thermostat. *The Journal of Chemical Physics*, 83(8), 4069-4074.
- Feller, S. E., Zhang, Y., Pastor, R. W., & Brooks, B. R. (1995). Constant pressure molecular dynamics simulation: The Langevin piston method. *The Journal of Chemical Physics*, 103(11), 4613-4621.

- 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 Signaling. *Nature*, *506*(7487), 191-196.
- Fenalti, G., Zatspein, N. A., Betti, C., Giguere, P., Han, G. W., Ishchenko, A., Liu, W., Guillemyn, K., Zhang, H., James, D., Wang, D., Weierstall, U., Spence, J. C. H., Boutet, S., Messerschmidt, M., Williams, G. J., Gati, C., Yefanov, O. M., White, T. A., Oberthuer, D., Metz, M., Yoon, C. H., Barty, A., Chapman, H. N., Basu, S., Coe, J., Conrad, C. E., Fromme, R., Fromme, P., Tourwé, D., Schiller, P. W., Roth, B. L., Ballet, S., Katritch, V., Stevens, R. C., & Cherezov, V. (2015). Structural basis for bifunctional peptide recognition at human δ -Opioid receptor. *Nature Structural & Molecular Biology*, *22*(3), 265-268.
- Fine, P. G., & Portenoy, R. K. (2004). A Clinical Guide to Opioid Analgesia (pp. 9-15). Minneapolis: Healthcare Information Programs, The McGraw-Hill Companies.
- Fowler, C. B., Pogozheva, I. D., LeVine, H., & Mosberg, H. I. (2004). Refinement of a Homology Model of the μ -Opioid Receptor Using Distance Constraints from Intrinsic and Engineered Zinc-Binding Sites. *Biochemistry*, *43*(27), 8700-8710.
- Friesner, R. A., & Beachy, M. D. (1998). Quantum mechanical calculations on biological systems. *Current Opinion in Structural Biology*, *8*(2), 257-262.
- Gelbrich, T., Braun, D. E., & Griesser, U. J. (2012). Morphine hydro-chloride anhydrate. *Acta Crystallographica Section E: Structure Reports Online*, *68*(Pt 12), o3358-o3359.
- Gilson, M. K., Given, J. A., Bush, B. L., & McCammon, J. A. (1997). The statistical-thermodynamic basis for computation of binding affinities: a critical review. *Biophysical Journal*, *72*(3), 1047-1069.
- González-Andrade, M., Rodríguez-Sotres, R., Madariaga-Mazón, A., Rivera-Chávez, J., Mata, R., Sosa-Peinado, A., Pozo-Yauner, L. d., & Arias-Olguín, 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.
- Groer, C. E., Schmid, C. L., Jaeger, A. M., & Bohn, L. M. (2011). Agonist-directed Interactions with Specific β -Arrestins Determine μ -Opioid Receptor Trafficking, Ubiquitination, and Dephosphorylation. *The Journal of Biological Chemistry*, *286*(36), 31731-31741.
- 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.
- Grossfield, A., Pitman, M. C., Feller, S. E., Soubias, O., & Gawrisch, K. (2008). Internal hydration increases during activation of the G protein-coupled receptor rhodopsin. *Journal of Molecular Biology*, *381*(2), 478-486.
- Grubmüller, H., Heller, H., Windemuth, A., & Schulten, K. (1991). Generalized Verlet Algorithm for Efficient Molecular Dynamics Simulations with Long-range Interactions. *Molecular Simulation*, *6*(1-3), 121-142.
- Halgren, T. A. (1999). MMFF VII. Characterization of MMFF94, MMFF94s, and other widely available force fields for conformational energies and for intermolecular-interaction energies and geometries. *Journal of Computational Chemistry*, *20*(7), 730-748.
- 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.
- Hess, B., Kutzner, C., van der Spoel, D., & Lindahl, E. (2008). GROMACS 4: Algorithms for Highly Efficient, Load-Balanced, and Scalable Molecular Simulation. *Journal of Chemical Theory and Computation*, *4*(3), 435-447.

- Hevener, K. E., Zhao, W., Ball, D. M., Babaoglu, K., Qi, J., White, S. W., & Lee, R. E. (2009). Validation of Molecular Docking Programs for Virtual Screening against Dihydropteroate Synthase. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 49(2), 444-460.
- Hirst, J. D., & Brooks, C. L. (1994). Helicity, Circular Dichroism and Molecular Dynamics of Proteins. *Journal of Molecular Biology*, 243(2), 173-178.
- Hirst, J. D., & Brooks, C. L. (1995). Molecular Dynamics Simulations of Isolated Helices of Myoglobin. *Biochemistry*, 34(23), 7614-7621.
- Huang, W., Manglik, A., Venkatakrishnan, 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. (2015). Structural insights into [micro]-opioid receptor activation. *Nature*, 524(7565), 315-321.
- Hub, J. S., & de Groot, B. L. (2009). Detection of Functional Modes in Protein Dynamics. *PLoS Computational Biology*, 5(8), e1000480.
- Iyer, M. R., Lee, Y. S., Deschamps, J. R., Dersch, C. M., Rothman, R. B., Jacobson, A. E., & Rice, K. C. (2012). Probes for narcotic receptor mediated phenomena. 44. Synthesis of an N-substituted 4-hydroxy-5-(3-hydroxyphenyl)morphan with high affinity and selective μ -antagonist activity. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 50, 44-54.
- Ji, F., Wang, Z., Ma, N., Riley, J., Armstead, W. M., & Liu, R. (2013). Herkinorin dilates cerebral vessels via kappa opioid receptor and cyclic adenosine monophosphate (cAMP) in a piglet model. *Brain Research*, 1490C, 95-100.
- Jo, S., Kim, T., & Im, W. (2007). Automated Builder and Database of Protein/Membrane Complexes for Molecular Dynamics Simulations. *PLoS ONE*, 2(9), e880.
- Jo, S., Kim, T., Iyer, V. G., & Im, W. (2008). CHARMM-GUI: A web-based graphical user interface for CHARMM. *Journal of Computational Chemistry*, 29(11), 1859-1865.
- Jo, S., Lim, J. B., Klauda, J. B., & Im, W. (2009). CHARMM-GUI Membrane Builder for Mixed Bilayers and Its Application to Yeast Membranes. *Biophysical Journal*, 97(1), 50-58.
- Jones, R. M., Hjorth, S. A., Schwartz, T. W., & Portoghese, P. S. (1998). Mutational Evidence for a Common κ Antagonist Binding Pocket in the Wild-Type κ and Mutant μ [K303E] Opioid Receptors. *Journal of Medicinal Chemistry*, 41(25), 4911-4914.
- Joung, J. Y., Nam, K.-Y., Cho, K.-H., & No, K. T. (2012). Ligand Aligning Method for Molecular Docking: Alignment of Property-Weighted Vectors. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 52(4), 984-995.
- 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.
- Karplus, M., & McCammon, J. A. (2002). Molecular dynamics simulations of biomolecules. *Nature Structural & Molecular Biology*, 9(9), 646-652.
- Katritch, V., Fenalti, G., Abola, E. E., Roth, B. L., Cherezov, V., & Stevens, R. C. (2014). Allosteric sodium in class A GPCR signaling. *Trends in Biochemical Sciences*, 39(5), 233-244.
- Keith, D. E., Anton, B., Murray, S. R., Zaki, P. A., Chu, P. C., Lissin, D. V., Montelliet-Agius, G., Stewart, P. L., Evans, C. J., & Zastrow, M. v. (1998). μ -Opioid Receptor Internalization: Opiate Drugs Have Differential Effects on a Conserved Endocytic Mechanism In Vitro and in the Mammalian Brain. *Molecular Pharmacology*, 53(3), 377-384.
- Keith, D. E., Murray, S. R., Zaki, P. A., Chu, P. C., Lissin, D. V., Kang, L., Evans, C. J., & von Zastrow, M. (1996). Morphine Activates Opioid Receptors without Causing Their Rapid Internalization. *Journal of Biological Chemistry*, 271(32), 19021-19024.

- Kenakin, T. (2005). New Concepts in Drug Discovery: Collateral Efficacy and Permissive Antagonism. *Nature Reviews: Drug Discovery*, 4(11), 919-927.
- Kenakin, T. (2011). Functional Selectivity and Biased Receptor Signaling. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 336(2), 296-302.
- Kenakin, T., & Miller, L. J. (2010). Seven Transmembrane Receptors as Shapeshifting Proteins: The Impact of Allosteric Modulation and Functional Selectivity on New Drug Discovery. *Pharmacological Reviews*, 62(2), 265-304.
- Kitano, H. (2002). Computational systems biology. *Nature*, 420(6912), 206-210.
- Klauda, J. B., Venable, R. M., Freites, J. A., O'Connor, J. W., Tobias, D. J., Mondragon-Ramirez, C., Vorobyov, I., MacKerell, A. D., & Pastor, R. W. (2010). Update of the CHARMM All-Atom Additive Force Field for Lipids: Validation on Six Lipid Types. *The Journal of Physical Chemistry B*, 114(23), 7830-7843.
- Klimovich, P. V., Shirts, M. R., & Mobley, D. L. (2015). Guidelines for the analysis of free energy calculations. *Journal of Computer-Aided Molecular Design*, 29(5), 397-411.
- Koch, T., & Höllt, V. (2008). Role of receptor internalization in opioid tolerance and dependence. *Pharmacology & Therapeutics*, 117(2), 199-206.
- Koch, T., Schulz, S., Schröder, H., Wolf, R., Raulf, E., & Höllt, V. (1998). Carboxyl-terminal Splicing of the Rat μ Opioid Receptor Modulates Agonist-mediated Internalization and Receptor Resensitization. *Journal of Biological Chemistry*, 273(22), 13652-13657.
- Kuntz, I. D. (1992). Structure-Based Strategies for Drug Design and Discovery. *Science*, 257(5073), 1078-1082.
- Labute, P. (2001). Probabilistic Receptor Potentials. *Chemical Computing Group Inc.*, <http://www.chemcomp.com/journal/cstat.htm>. Consultado el 9 de enero de 2016
- Labute, P. (2008). The generalized Born/volume integral implicit solvent model: Estimation of the free energy of hydration using London dispersion instead of atomic surface area. *Journal of Computational Chemistry*, 29(10), 1693-1698.
- Labute, P., Williams, C., Feher, M., Sourial, E., & Schmidt, J. M. (2001). Flexible Alignment of Small Molecules. *Journal of Medicinal Chemistry*, 44(10), 1483-1490.
- Lawrenz, M. (2011). *Using computational alchemy to predict protein-ligand binding free energies*. Tesis doctoral inédita (Química), University of California, San Diego. Consultada en <http://escholarship.org/uc/item/9pb9p6nh> (b7129726). Consultado el 4 de octubre de 2015.
- Lawrenz, M., Wereszczynski, J., Ortiz-Sánchez, J. M., Nichols, S. E., & McCammon, J. A. (2012). Thermodynamic integration to predict host-guest binding affinities. *Journal of Computer-Aided Molecular Design*, 26(5), 569-576.
- Lee, J., Cheng, X., Swails, J. M., Yeom, M. S., Eastman, P. K., Lemkul, J. A., Wei, S., Buckner, J., Jeong, J. C., Qi, Y., Jo, S., Pande, V. S., Case, D. A., Brooks, C. L., MacKerell, A. D., Klauda, J. B., & Im, W. (2016). CHARMM-GUI Input Generator for NAMD, GROMACS, AMBER, OpenMM, and CHARMM/OpenMM Simulations Using the CHARMM36 Additive Force Field. *Journal of Chemical Theory and Computation*, 12(1), 405-413.
- Lefkowitz, R. J., Stadel, J. M., & Caron, M. G. (1983). Adenylate Cyclase-Coupled Beta-Adrenergic Receptors: Structure and Mechanisms of Activation and Desensitization. *Annual Review of Biochemistry*, 52(1), 159-186.
- Lewanowitsch, T., & Irvine, R. (2003). Naloxone and its quaternary derivative, naloxone methiodide, have differing affinities for m, d, k and opioid receptors in mouse brain homogenates. *Brain Research*, 964(2), 302-305.

- Liu, K., Feng, J., & Young, S. S. (2005). PowerMV: A Software Environment for Molecular Viewing, Descriptor Generation, Data Analysis and Hit Evaluation. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 45(2), 515-522.
- 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 (New York, N.y.)*, 337(6091), 232-236.
- Livingston, K. E., & Traynor, J. R. (2014). Disruption of the Na(+) ion binding site as a mechanism for positive allosteric modulation of the mu-opioid receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(51), 18369-18374.
- López-Vallejo, F., Giulianotti, M. A., Houghten, R. A., & Medina-Franco, J. L. (2012). Expanding the medicinally relevant chemical space with compound libraries. *Drug Discovery Today*, 17(13-14), 718-726.
- MacKerell, A. D., Bashford, D., Bellott, M., Dunbrack, R. L., Evanseck, J. D., Field, M. J., Fischer, S., Gao, J., Guo, H., Ha, S., Joseph-McCarthy, D., Kuchnir, L., Kuczera, K., Lau, F. T. K., Mattos, C., Michnick, S., Ngo, T., Nguyen, D. T., Prodhom, B., Reiher, W. E., Roux, B., Schlenkrich, M., Smith, J. C., Stote, R., Straub, J., Watanabe, M., Wiórkiewicz-Kuczera, J., Yin, D., & Karplus, M. (1998). All-Atom Empirical Potential for Molecular Modeling and Dynamics Studies of Proteins. *The Journal of Physical Chemistry B*, 102(18), 3586-3616.
- Magnan, J., Paterson, S. J., Tavani, A., & Kosterlitz, H. W. (1982). The binding spectrum of narcotic analgesic drugs with different agonist and antagonist properties. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 319(3), 197-205.
- 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 [micro]-opioid receptor bound to a morphinan antagonist. *Nature*, 485(7398), 321-326.
- Mansour, A., Taylor, L. P., Fine, J. L., Thompson, R. C., Hoversten, M. T., Mosberg, H. I., Watson, S. J., & Akil, H. (1997). Key Residues Defining the μ -Opioid Receptor Binding Pocket: A Site-Directed Mutagenesis Study. *Journal of Neurochemistry*, 68(1), 344-353.
- Martinez-Mayorga, K., Byler, K. G., Yongye, A. B., Giulianotti, M. A., Dooley, C. T., & Houghten, R. A. (2013). Ligand/kappa-Opioid Receptor Interactions: Insights from the X-Ray Crystal Structure. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 66, 114-121.
- Massotte, D., & Kieffer, B. L. (2005). Structure—Function Relationships in G Protein-Coupled Receptors. In L. A. Devi (Ed.), *The G Protein-Coupled Receptors Handbook* (pp. 3-31). Totowa, NJ: Humana Press.
- McLaughlin, J. P., & Chavkin, C. (2001). Tyrosine Phosphorylation of the μ -Opioid Receptor Regulates Agonist Intrinsic Efficacy. *Molecular Pharmacology*, 59(6), 1360-1368.
- Meng, X.-Y., Zhang, H.-X., Mezei, M., & Cui, M. (2011). Molecular Docking: A powerful approach for structure-based drug discovery. *Current Computer-Aided Drug Design*, 7(2), 146-157.
- Meng, Y., Sabri Dashti, D., & Roitberg, A. E. (2011). Computing Alchemical Free Energy Differences with Hamiltonian Replica Exchange Molecular Dynamics (H-REMD) Simulations. *Journal of Chemical Theory and Computation*, 7(9), 2721-2727.
- Metropolis, N., Rosenbluth, A. W., Rosenbluth, M. N., Teller, A. H., & Teller, E. (1953). Equation of State Calculations by Fast Computing Machines. *The Journal of Chemical Physics*, 21(6), 1087-1092.
- Mignat, C., Wille, U., & Ziegler, A. (1995). Affinity profiles of morphine, codeine, dihydrocodeine and their glucuronides at opioid receptor subtypes. *Life Sciences*, 56(10), 793-799.

- 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.
- Minami, M., Nakagawa, T., Seki, T., Onogi, T., Aoki, Y., Katao, Y., Katsumata, S., & Satoh, M. (1996). A single residue, Lys108, of the delta-opioid receptor prevents the mu-opioid-selective ligand [D-Ala²,N-MePhe⁴,Gly-ol⁵]enkephalin from binding to the delta-opioid receptor. *Molecular Pharmacology*, *50*(5), 1413-1422.
- MOE. (2010). Molecular Operating Environment (Version 2010.10). Montreal, Quebec, Canada: Chemical Computing Group.
- Mosberg, H. I., & Fowler, C. B. (2002). Development and validation of opioid ligand–receptor interaction models: The structural basis of mu vs. delta selectivity. *The Journal of Peptide Research*, *60*(6), 329-335.
- Mosberg, H. I., Yeomans, L., Harland, A. A., Bender, A. M., Sobczyk-Kojiro, K., Anand, J. P., Clark, M. J., Jutkiewicz, E. M., & Traynor, J. R. (2013). Opioid Peptidomimetics: Leads for the Design of Bioavailable Mixed Efficacy Mu Opioid Receptor (MOR) Agonist/Delta Opioid Receptor (DOR) Antagonist Ligands. *Journal of Medicinal Chemistry*, *56*(5), 2139-2149.
- Munro, T. A., Rizzacasa, M. A., Roth, B. L., Toth, B. A., & Yan, F. (2005). Studies Toward the Pharmacophore of Salvinorin A, a Potent Kappa Opioid Receptor Agonist. *Journal of Medicinal Chemistry*, *48*(2), 345-348.
- Némethy, G., Gibson, K. D., Palmer, K. A., Yoon, C. N., Paterlini, G., Zagari, A., Rumsey, S., & Scheraga, H. A. (1992). Energy Parameters in Polypeptides. 10. Improved Geometrical Parameters and Nonbonded Interactions for Use in the ECEPP/3 Algorithm, with Application to Proline-Containing Peptides. *The Journal of Physical Chemistry*, *64*(72), 6472-6484.
- Onaran, H. O., & Costa, T. (1997). Agonist Efficacy and Allosteric Models of Receptor Action. *Annals of the New York Academy of Sciences*, *812*(1), 98-115.
- Onaran, H. O., Scheer, A., Cotecchia, S., & Costa, T. (2000). A Look at Receptor Efficacy. From the Signalling Network of the Cell to the Intramolecular Motion of the Receptor. In T. Kenakin & J. A. Angus (Eds.), *The Pharmacology of Functional, Biochemical, and Recombinant Receptor Systems* (pp. 217-259). Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.
- Ortega, A., Blount, J., & Manchand, B. (1982). Salvinorin, a new transneoclerodane diterpene from *Salvia divinorum* (Labiatae). *Journal of the Chemical Society, Perkins Transactions I*, *1*, 2505–2508.
- Paquet, E., & Viktor, H. L. (2015). *Molecular Dynamics, Monte Carlo Simulations, and Langevin Dynamics: A Computational Review* (Vol. 2015).
- Paramo, T., East, A., Garzón, D., Ulmschneider, M. B., & Bond, P. J. (2014). Efficient Characterization of Protein Cavities within Molecular Simulation Trajectories: trj_cavity. *Journal of Chemical Theory and Computation*, *10*(5), 2151-2164.
- Peng, X., Knapp, B. I., Bidlack, J. M., & Neumeyer, J. L. (2007). Pharmacological Properties of Bivalent Ligands Containing Butorphan Linked to Nalbuphine, Naltrexone and Naloxone at μ , δ and κ Opioid Receptors. *Journal of Medicinal Chemistry*, *50*(9), 2254-2258.
- Pert, C. B., & Snyder, S. H. (1973). Opiate Receptor: Demonstration in Nervous Tissue. *Science*, *179*(4077), 1011-1014.
- Pert, C. B., & Snyder, S. H. (1974). Opiate Receptor Binding of Agonists and Antagonists Affected Differentially by Sodium. *Molecular Pharmacology*, *10*(6), 868-879.
- 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.

- 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.
- Purington, L. C., Sobczyk-Kojiro, K., Pogozheva, I. D., Traynor, J. R., & Mosberg, H. I. (2011). Development and in Vitro Characterization of a Novel Bifunctional μ -Agonist/ δ -Antagonist Opioid Tetrapeptide. *ACS Chemical Biology*, 6(12), 1375-1381.
- Purington, L. C. S. (2011). *Investigating interactions between mu and delta opioid receptors using bifunctional peptides*. Tesis doctoral inédita (Farmacología), University of Michigan.
- Raehal, K. M., & Bohn, L. M. (2005). Mu opioid receptor regulation and opiate responsiveness. *The AAPS Journal*, 7(3), E587-E591.
- Roth, B. L., Baner, K., Westkaemper, R., Siebert, D., Rice, K. C., Steinberg, S., Ernsberger, P., & Rothman, R. B. (2002). Salvinorin A: A potent naturally occurring nonnitrogenous κ opioid selective agonist. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(18), 11934-11939.
- Roux, B., Nina, M., Pomès, R., & Smith, J. C. (1996). Thermodynamic stability of water molecules in the bacteriorhodopsin proton channel: a molecular dynamics free energy perturbation study. *Biophysical Journal*, 71(2), 670-681.
- Rozenfeld, R., Abul-Husn, N. S., Gomez, I., & Devi, L. A. (2007). *An Emerging Role for the Delta Opioid Receptor in the Regulation of Mu Opioid Receptor Function* (Vol. 7).
- Sakkiah, S., Thangapandian, S., & Lee, K. W. (2012). Pharmacophore modeling, molecular docking, and molecular dynamics simulation approaches for identifying new lead compounds for inhibiting aldose reductase 2. *Journal of Molecular Modeling*, 18(7), 3267-3282.
- Schapira, M., Totrov, M., & Abgyan, R. (1999). Prediction of the binding energy for small molecules, peptides and proteins. *Journal of Molecular Recognition*, 12, 177-190.
- Schiller, P. W., Nguyen, T. M. D., Berezowska, I., Dupuis, S., Weltrowska, G., Chung, N. N., & Lemieux, C. (2000). Synthesis and in vitro opioid activity profiles of DALDA analogues. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 35(10), 895-901.
- Seki, T., Minami, M., Nakagawa, T., Ienaga, Y., Morisada, A., & Satoh, M. (1998). DAMGO recognizes four residues in the third extracellular loop to discriminate between μ - and κ -opioid receptors. *European Journal of Pharmacology*, 350(2-3), 301-310.
- Shahrestanifar, M. S., & Howells, R. D. (1996). Sensitivity of opioid receptor binding to N-substituted maleimides and methanethiosulfonate derivatives. *Neurochemical Research*, 21(11), 1295-1299.
- Shang, Y., LeRouzic, V., Schneider, S., Bisignano, P., Pasternak, G. W., & Filizola, M. (2014). Mechanistic Insights into the Allosteric Modulation of Opioid Receptors by Sodium Ions. *Biochemistry*, 53(31), 5140-5149.
- Sharma, S. K., Nirenberg, M., & Klee, W. A. (1975). Morphine receptors as regulators of adenylate cyclase activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 72(2), 590-594.
- Sheridan, R. P., Miller, M. D., Underwood, D. J., & Kearsley, S. K. (1996). Chemical Similarity Using Geometric Atom Pair Descriptors. *Journal of Chemical Information and Computer Sciences*, 36(1), 128-136.
- Shim, J., Coop, A., & MacKerell, A. D. (2013). Molecular Details of the Activation of the μ Opioid Receptor. *The Journal of Physical Chemistry B*, 117(26), 7907-7917.
- Shirts, M. R., Mobley, D. L., Chodera, J. D., & Pande, V. S. (2007). Accurate and Efficient Corrections for Missing Dispersion Interactions in Molecular Simulations. *The Journal of Physical Chemistry B*, 111(45), 13052-13063.

- Snyder, S. H., & Pasternak, G. W. (2003). Historical review: Opioid receptors. *Trends in Pharmacological Sciences*, 24(4), 198-205.
- Sounier, R., Mas, C., Steyaert, J., Laeremans, T., Manglik, A., Huang, W., Kobilka, B., Déméné, H., & Granier, S. (2015). Propagation of conformational changes during μ -opioid receptor activation. *Nature*, 524(7565), 375-378.
- Spivak, C. E., Beglan, C. L., Seidleck, B. K., Hirshbein, L. D., Blaschak, C. J., Uhl, G. R., & Surratt, C. K. (1997). Naloxone Activation of μ -Opioid Receptors Mutated at a Histidine Residue Lining the Opioid Binding Cavity. *Molecular Pharmacology*, 52(6), 983-992.
- Sternini, C., Spann, M., Anton, B., Keith, D. E., Bunnett, N. W., von Zastrow, M., Evans, C., & Brecha, N. C. (1996). Agonist-selective endocytosis of mu opioid receptor by neurons in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93(17), 9241-9246.
- Surratt, C. K., Johnson, P. S., Moriwaki, A., Seidleck, B. K., Blaschak, C. J., Wang, J. B., & Uhl, G. R. (1994). -mu opiate receptor. Charged transmembrane domain amino acids are critical for agonist recognition and intrinsic activity. *Journal of Biological Chemistry*, 269(32), 20548-20553.
- Tieleman, D. P., Forrest, L. R., Sansom, M. S. P., & Berendsen, H. J. C. (1998). Lipid Properties and the Orientation of Aromatic Residues in OmpF, Influenza M2, and Alamethicin Systems: Molecular Dynamics Simulations. *Biochemistry*, 37(50), 17554-17561.
- Totrov, M., & Abagyan, R. (1997). Flexible protein-ligand docking by global energy optimization in internal coordinates. *Proteins: Structure, Function, and Genetics*, suppl, 1, 215-220.
- Totrov, M., & Abagyan, R. (1999). *Derivation of sensitive discrimination potential for virtual ligand screening*. Paper presented at the Proceedings of the third annual international conference on Computational molecular biology, Lyon, France.
- Tsao, P. I., & von Zastrow, M. (2000). Type-specific Sorting of G Protein-coupled Receptors after Endocytosis. *Journal of Biological Chemistry*, 275(15), 11130-11140.
- Ulens, C., Baker, L., Ratka, A., Waumans, D., & Tytgat, J. (2001). Morphine-6 β -glucuronide and morphine-3-glucuronide, opioid receptor agonists with different potencies¹. *Biochemical Pharmacology*, 62(9), 1273-1282.
- Valdés, L., Díaz, J., & Paul, A. (1983). Ethnopharmacology of ska María Pastora (Salvia divinorum, Epling and Játiva-M.). *Journal of Ethnopharmacology*, 7, 287-312.
- Vanommeslaeghe, K., Hatcher, E., Acharya, C., Kundu, S., Zhong, S., Shim, J., Darian, E., Guvench, O., Lopes, P., Vorobyov, I., & MacKerell, A. D. (2010). CHARMM General Force Field (CGenFF): A force field for drug-like molecules compatible with the CHARMM all-atom additive biological force fields. *Journal of Computational Chemistry*, 31(4), 671-690.
- Vanommeslaeghe, K., & MacKerell, A. D. (2012). Automation of the CHARMM General Force Field (CGenFF) I: Bond Perception and Atom Typing. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 52(12), 3144-3154.
- Vanommeslaeghe, K., Raman, E. P., & MacKerell, A. D. (2012). Automation of the CHARMM General Force Field (CGenFF) II: Assignment of Bonded Parameters and Partial Atomic Charges. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 52(12), 3155-3168.
- Vortherms, T. A., Mosier, P. D., Westkaemper, R. B., & 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. *Journal of Biological Chemistry*, 282(5), 3146-3156.
- 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.
- Wesson, L., & Eisenberg, D. (1992). Atomic solvation parameters applied to molecular dynamics of proteins in solution. *Protein Science : A Publication of the Protein Society*, 1(2), 227-235.
- Willett, P. (2006). Similarity-based virtual screening using 2D fingerprints. *Drug Discovery Today*, 11(23-24), 1046-1053.
- Williams, J. T., Ingram, S. L., Henderson, G., Chavkin, C., Zastrow, M. v., Schulz, S., Koch, T., Evans, C. J., & Christie, M. J. (2013). Regulation of μ -Opioid Receptors: Desensitization, Phosphorylation, Internalization, and Tolerance. *Pharmacological Reviews*, 65, 223-254.
- Wu, E. L., Cheng, X., Jo, S., Rui, H., Song, K. C., Dávila-Contreras, E. M., Qi, Y., Lee, J., Monje-Galvan, V., Venable, R. M., Klauda, J. B., & Im, W. (2014). CHARMM-GUI Membrane Builder toward realistic biological membrane simulations. *Journal of Computational Chemistry*, 35(27), 1997-2004.
- Xu, H., Lu, Y., Partilla, J., Zheng, Q., Wang, J., Brine, G., Carroll, F., Rice, K., Chen, K., Chi, Z., & Rothman, R. (1999). Opioid peptide receptor studies, 11: involvement of Tyr148, Trp318 and His319 of the rat mu-opioid receptor in binding of mu-selective ligands. *Synapse*, 32(1), 23-28.
- Xu, H., Partilla, J., Wang, X., Rutherford, J., Tidgewell, K., Prisinzano, T., Bohn, L., & Rothman, R. (2007). A comparison of noninternalizing (herkinorin) and internalizing (DAMGO) mu-opioid agonists on cellular markers related to opioid tolerance and dependence. *Synapse*, 61(3), 166-175.
- Yabaluri, N., & Medzihradsky, F. (1997). Regulation of μ -Opioid Receptor in Neural Cells by Extracellular Sodium. *Journal of Neurochemistry*, 68(3), 1053-1061.
- Yan, F., Bikbulatov, R. V., Mocanu, V., Dicheva, N., Parker, C. E., Wetsel, W. C., Mosier, P. D., Westkaemper, R. B., Allen, J. A., Zjawiony, J. K., & Roth, B. L. (2009). Structure-based Design, Synthesis, Biochemical and Pharmacological Characterization of Novel Salvinorin A Analogues as Active State Probes of the κ -Opioid Receptor. *Biochemistry*, 48(29), 6898-6908.
- Yan, F., Mosier, P. D., Westkaemper, R. B., Stewart, J., Zjawiony, J. K., Vortherms, T. A., Sheffler, D. J., & Roth, B. L. (2005). Identification of the Molecular Mechanisms by Which the Diterpenoid Salvinorin A Binds to κ -Opioid Receptors. *Biochemistry*, 44(24), 8643-8651.
- Yasuda, K., Raynor, K., Kong, H., Breder, C. D., Takeda, J., Reisine, T., & Bell, G. I. (1993). Cloning and functional comparison of kappa and delta opioid receptors from mouse brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 90(14), 6736-6740.
- Yongye, A. B., Bender, A., & Martinez-Mayorga, K. (2010). Dynamic clustering threshold reduces conformer ensemble size while maintaining a biologically relevant ensemble. *Journal of Computer-Aided Molecular Design*, 24, 675-686.
- Yu, W., He, X., Vanommeslaeghe, K., & MacKerell, A. D. (2012). Extension of the CHARMM General Force Field to Sulfonamide-Containing Compounds and Its Utility in Biomolecular Simulations. *Journal of Computational Chemistry*, 33(31), 2451-2468.
- Zadina, J. E., Hackler, L., Ge, L.-J., & Kastin, A. J. (1997). A potent and selective endogenous agonist for the [micro]-opiate receptor. *Nature*, 386(6624), 499-502.
- Zastrow, M. V., Duane E. Keith, J., & Evans, C. J. (1993). Agonist-induced State of the δ -Opioid Receptor That Discriminates between Opioid Peptides and Opiate Alkaloids. *Molecular Pharmacology*, 44, 166-172.
- Zastrow, M. v., Svingos, A., Haberstock-Debic, H., & Evans, C. (2003). Regulated endocytosis of opioid receptors: cellular mechanisms and proposed roles in physiological adaptation to opiate drugs. *Current Opinion in Neurobiology*, 13(3), 348-353.

- Zhang, J., Ferguson, S. S. G., Barak, L. S., Bodduluri, S. R., Laporte, S. A., Law, P.-Y., & Caron, M. G. (1998). Role for G protein-coupled receptor kinase in agonist-specific regulation of μ -opioid receptor responsiveness. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *95*(12), 7157-7162.
- Zhang, L., Yu, Y., Mackin, S., Weight, F. F., Uhl, G. R., & Wang, J. B. (1996). Differential Opiate Receptor Phosphorylation and Desensitization Induced by Agonists and Phorbol Esters. *Journal of Biological Chemistry*, *271*(19), 11449-11454.
- Zhao, G.-M., Qian, X., Schiller, P. W., & Szeto, H. H. (2003). Comparison of [Dmt1]DALDA and DAMGO in Binding and G Protein Activation at μ , δ , and κ Opioid Receptors. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, *307*(3), 947-954.
- Zhao, H., & Aluru, N. R. (2008). Molecular dynamics simulation of bulk silicon under strain. *Interaction and Multiscale Mechanics*, *1*(2), 303-315.
- Zhong, H.-J., Liu, L.-J., Chong, C.-M., Lu, L., Wang, M., Chan, D. S.-H., Chan, P. W. H., Lee, S. M.-Y., Ma, D.-L., & Leung, C.-H. (2014). Discovery of a natural product-like iNOS inhibitor by molecular docking with potential neuroprotective effects in vivo. *PLoS ONE*, *9*(4), e92905.

8. ANEXOS

Anexo A

A.1 Alineamiento flexible en MOE

El alineamiento flexible del programa MOE se enfoca en la idea de que un alineamiento es bueno si la energía de cada molécula es pequeña, tienen una forma similar, sus grupos aromáticos se traslapan y que sus grupos donadores y aceptores de electrones se traslapan. Según el método las orientaciones alineadas se encuentran minimizando la función de similitud $-kT \cdot \log(F) + U$, donde F es la característica de medida de similitud referente a densidades de las propiedades (tabla A-1) entre pares de átomos y U es la energía potencial promedio desde el campo de fuerza MMFF94x (Labute *et al.*, 2001). Los parámetros dentro de F para cada propiedad generalmente son $\alpha = 1$ y los \mathcal{W} 's se enlistan en la tabla A-1. La minimización es realizada con dos etapas continuas del método *steepest decent* y terminan cuando el gradiente RMS es menor a un valor preestablecido.

La característica F puede comprobarse, según Labute y Williams (Labute *et al.*, 2001), teniendo una probabilidad de densidad con la forma funcional:

$$f(x) = s^3 (2\pi)^{-3/2} e^{\left\{-\frac{1}{2}|x-x_0|^2 s^2\right\}} \quad (1A)$$

Donde s^2 es la varianza inversa a lo largo de todos los ejes y x_0 es el centro de la densidad. Un átomo con núcleo en x_0 con un radio de Van der Waals (r) se representa:

$$f_p(x) = (\alpha/r)^3 (2\pi)^{-3/2} e^{\left\{-\frac{1}{2}|x-x_0|^2 (\alpha/r)^2\right\}} \quad (2A)$$

Donde α indica que tan amplia puede ser la densidad.

Ahora x_n es la coordenada en 3D del átomo n de una molécula. Y si el átomo i tiene una propiedad, entonces \mathcal{W}_i será el grado de asignación dado para esta:

$$f_p(x; x_1, \dots, x_n) = \sum_{i=1}^n \frac{\mathcal{W}_i}{n} \left(\frac{\alpha^2}{2\pi r_i^2} \right)^{3/2} e^{\left\{-\frac{\alpha^2}{2r_i^2}|x-x_i|^2\right\}} \quad (3A)$$

Teniéndose la densidad de una propiedad f_p . Se puede considerar que dada una propiedad para dos moléculas o dos conformaciones de una sola, el traslape de las dos densidades estará dado por:

$$F_p = \sum_{i=1}^n \sum_{j=1}^m \frac{\mathcal{W}_i}{n} \frac{\mathcal{W}_j}{m} \left(\frac{\alpha^2}{2\pi(r_i^2 + r_j^2)} \right)^{3/2} e^{\left\{-\frac{\alpha^2}{2} \frac{|x_i-x_j|^2}{r_i^2+r_j^2}\right\}} \quad (4A)$$

Lo que indicara que tan similar serán las dos moléculas o las dos conformaciones. Así, teniendo un conjunto de propiedades se puede definir una característica de similitud:

$$F = F_{vol} + F_{Hdon} + F_{Hacc} + F_{hydrophobe} + F_{hydrophobe-\frac{Hdon}{Hacc}} + F_{Hdon-proj} + F_{Hacc-proj} + F_{centroid-CO_2} \quad (5A)$$

Los subíndices se especifican en la Tabla A-1.

Tabla A-1. Parámetros del grado de asignación de las densidades de propiedad.

| Propiedad | w_i |
|--|-------|
| Término de similitud basado en átomo | |
| Volumen (<i>vol</i>) | 1 |
| Donador de H (<i>Hdon</i>) | 3 |
| Aceptor de H (<i>Hacc</i>) | 3 |
| Hidrófobo (<i>hydrophobe</i>) | 1 |
| Hidrófobo comparado contra Donador de H o Aceptor de H (<i>hydrophobe – Hdon/Hacc</i>) | -1 |
| Término de similitud basado en protecciones de farmacóforo | |
| Característica de enlace de H donador proyectada (<i>Hdon – proj</i>) | 1 |
| Característica de enlace de H aceptor proyectada (<i>Hacc – proj</i>) | 1 |
| Centroide tipo <i>CO₂</i> (<i>centroid – CO₂</i>) | 1 |

Si un átomo no cumple con la característica de inmediato su valor será de 0.

A.2 Docking en Molecular Operating Environment (MOE)

A.2.1 Emplazamiento

En nuestro caso para el programa de *Molecular Operating Environment* (MOE) se utilizó *Alpha triangle* como método de emplazamiento, el cual genera orientaciones aleatoriamente por superposición de tripletas de átomos del ligando y tripletas de puntos en el receptor, los cuales son centros de esferas alfas (MOE, 2010). Fijando un mínimo y un máximo de iteraciones.

A.2.2 Puntaje

La opción de puntaje fue *London dG* (Corbeil *et al.*, 2012; Labute, 2008; MOE, 2010).

$$\Delta G_{LdG} = c + E_{flex} + \sum_{h-bonds} c_{hb} f_{hb} + \sum_{metal-lig} c_m f_m + \sum_{atomsi} \Delta D_i \quad (6A)$$

Aquí *c* representa el promedio de pérdida/ganancia de entropía rotacional y translacional, *E_{flex}* es la energía debida a la pérdida de flexibilidad del ligando (calculada desde la topología del ligando), *f_{hb}* son medidas de imperfecciones geométricas de los puentes de hidrógeno y toma un valor en [0,1], *c_{hb}* es la energía de un puente de hidrógeno ideal, *f_m* medidas de imperfecciones geométricas de uniones metálicas y toma valor de [0,1], *c_m* es la energía de una ligadura metálica ideal y *D_i* es la energía de desolvatación del átomo *i*. La diferencia de desolvatación es calculada con:

$$\Delta D_i = c_i R_i^3 \left\{ \iiint_{u \notin A \cup B} |u|^{-6} du - \iiint_{u \notin B} |u|^{-6} du \right\} \quad (7A)$$

Donde A y B son los volúmenes de la proteína y el ligando con un átomo i que pertenece al volumen B , R_i es el radio de solvatación del átomo i (tomado como el parámetro sigma de van del Waals OPLS-AA, más 0.5 \AA) y c_i es el coeficiente de solvatación del átomo i . los coeficientes [c , c_{hb} , c_m , c_i] son ajustados desde más de 400 estructuras de rayos X de complejos proteína-ligando con datos de pK_i experimentales disponibles. Las integrales triples son aproximadas usando fórmulas de integrales de *Generalized Born*.

A.2.3 Refinamiento

El refinamiento por *Force field* con MMFF94x. el cual está parametrizado para moléculas orgánicas pequeñas en fase gas para química medicinal. Modificado desde MMFF94s para la fuerza de nitrógenos conjugados planares. Usa todos los átomos sin *Lone Pairs*. Usa modelos de carga interna de incrementos de carga enlace (Halgren, 1999; MOE, 2010). Conformada por:

$$E(x) = E_{str} + E_{ang} + E_{stb} + E_{oop} + E_{tor} + E_{vdw} + E_{ele} + E_{sol} + E_{res} \quad 8A$$

Cada energía es una sumatoria en la que involucra interacciones de átomos de un tipo en particular. Donde E_{str} representa los enlaces entre átomos, E_{ang} ángulos entre átomos, E_{stb} termino cruzado entre enlace-ángulo, E_{oop} a la deformación de un grupo planar, E_{tor} a los ángulos diedros, E_{vdw} a interacciones Van der Waals, E_{ele} a interacciones electrostáticas, E_{sol} solvatación implícita y E_{res} a restricciones impuestas. Solo se usaron funciones especiales para los términos E_{ele} colocándola de la forma del tipo *Reaction Field* y para E_{sol} calculada desde *Generalized Born Model/Volume Integral, GB/VI* (Labute, 2008; MOE, 2010).

$$E_{ele} = \frac{w_{ele} e^2}{4\pi\epsilon_0 d} \sum_{i < j} q_i q_j \left[\frac{1}{r_{ij} + b_{ele}} - \frac{\alpha r_{ij}^2}{R_c^3} - \frac{(1 - \alpha)}{R_c} \right] s(r_{ij}) T_{ij} I_{ij}^{ele} \quad \alpha = \frac{d - d_x}{d + 2d_x} \quad (9A)$$

$$E_{sol} = -w_{sol} W (d^{-1} - d_x^{-1}) \frac{e^2}{4\pi\epsilon_0} \frac{1}{2} \sum_{i=1}^n \sum_{j=1}^n \frac{q_i q_j \sqrt{G_i G_j}}{\sqrt{y_{ij} + \frac{\exp(-y_{ij})}{4}}} s(r_{ij}) T_{ij} \quad y_{ij} = r_{ij}^2 G_i G_j \quad (10A)$$

Donde w_{sol} , w_{ele} y W son valores peso, $d = 1$ y $d_x = 80$ son las constantes dieléctricas del soluto y del solvente, q es la carga parcial en un átomo, $R_c = 10 \text{ \AA}$ es la distancia de corte del cálculo, $s(r)$ es una función de suavizado en el corte de la energía encendida en 8 \AA y acotada por R_c , T es un factor de escala de interacción generalmente para interacciones no enlazantes, I^{ele} es un factor de interacción (valor 0 para 1-2 y 1-3), b_{ele} es una constante amortiguadora para evitar, cero en el denominador r es la distancia entre dos átomos, e es la carga del electrón, ϵ_0 es la permitividad en el vacío y G es la energía misma de cada átomo.

A.3 Docking Molsoft (ICM)

A.3.1 Sitio de unión de ICM

El sitio de unión se estableció con el método independiente del ligando llamado *ICM PocketFinder* el cual genera una convolución Gaussiana del potencial de Lennard-Jones alrededor de la proteína (Ruben Abagyan *et al.*, 2009; An *et al.*, 2005). Esto mediante un potencial en puntos r (átomos de prueba) en un enmallado 3D de espacio 0.5 \AA , el cual rodea toda la proteína.

Y su valor es calculado con:

$$P_0(r) = \sum_a \left(\frac{A_{x_a}}{d_{ar}^{12}} - \frac{B_{x_a}}{d_{ar}^6} \right) \quad (11A)$$

Truncado para que el $\min[P_0(r)] = -0.8 \text{ Kcal/mol}$, para dar importancia a interacciones atractivas. Luego este se suaviza y realiza un espacio promedio del potencial ya creado en cada punto haciendo una convolución:

$$P(r) = \int e^{-\left(\frac{x-r}{\lambda}\right)^2} P_0(x) dx, \quad \lambda = \sqrt{\frac{2}{3} N_{iter}} \quad N_{iter} = 10 \quad (12A)$$

En donde $P_0(r)$ es potencial de interacciones Van der Waals en un punto, r es un punto en el entramado, A_{x_a} y B_{x_a} son parámetros tomados desde el campo de fuerza *Empirical Conformational Energy Program for Peptides, ECEPP/3* (Némethy *et al.*, 1992), d_{ar} es la distancia entre un punto r y un átomo a de la proteína, $P(r)$ es el potencial suavizado, x es la coordenada de cualquier punto r y λ parámetro de suavizado dependiente de iteraciones (N_{iter}).

Cinco tipos de potenciales de interacción representan el sitio de unión: (1) Van der Waals para hidrógenos, (2) Van der Waals para átomos pesados, (3) un término electrostático optimizado (4) términos hidrófobos y (5) y términos basados en potenciales de *lone-pair*.

A.3.2 Emplazamiento

Los cálculos de la energía fueron basados sobre el campo de fuerza ECEPP/3 con una constante dieléctrica dependiente de la distancia, además de adicionar términos para la energía de solvatación y contribución entrópica (R Abagyan *et al.*, 2013; Ruben Abagyan, Totrov, *et al.*, 1994; Wesson *et al.*, 1992).

Se llevó a cabo un procedimiento de minimización “*Biased Probability Monte Carlo*” (BPMC) que consiste en (i) búsqueda de conformaciones aleatorias independientes debido a distribuciones de probabilidad del muestreo, (ii) energías de minimizaciones locales de los términos diferenciables analíticos, (iii) cálculos de la energía incluyendo los términos no diferenciales como solvatación y entropía (iv) rechazo o aceptación del criterio de energía basado en el criterio de Metropolis (Metropolis *et al.*,

1953) y regresar a la etapa (i) con 250 iteraciones (Ruben Abagyan & Totrov, 1994; M Totrov *et al.*, 1997; Zhong *et al.*, 2014).

A.3.3 Puntaje

La unión se evaluó mediante función de puntaje *ICM ligand binding score* en todos los átomos (Schapira *et al.*, 1999; Maxim Totrov *et al.*, 1999; Zhong *et al.*, 2014).

$$S_{bind} = E_{int} + T\Delta S_{Tor} + \alpha_1 E_{HBond} + \alpha_2 E_{HBDesolv} + \alpha_3 E_{SOLEI} + \alpha_4 E_{HPhob} + \alpha_5 Q_{size} \quad (13A)$$

E_{int} es la energía del ligando, incluyendo las interacciones de van der Waals. ΔS_{Tor} es la pérdida de entropía conformacional al unirse a la proteína, $T = 300 K$ relacionado al número de torsiones libres en el ligando (N_{tor}) y a un factor. α_i son constantes independientes del ligando y del receptor que fueron optimizadas. E_{HBond} es el término relacionado a puentes de hidrógeno que incluyen a los átomos donadores y aceptores de enlaces de hidrógenos. $E_{HBDesolv}$ es el término debido a la pérdida de enlaces de hidrógeno con el solvente (desolvatación de átomos donadores y aceptores de puentes de hidrógeno). E_{HPhob} es el término debido a la ganancia de energía libre hidrofóbica siguiendo el modelo de área superficial accesible (ASA). Y Q_{size} es un término de corrección del tamaño del ligando.

A.4 Campo de fuerza de CHARMM

El campo de fuerza de CHARMM es usado para moléculas biológicas y para moléculas tipo drogas (*Drug-like*; usando *CHARMM General Force Field*, CGenFF) y las versiones varían cuando se agregan más parámetros calculados en el campo de fuerza. (Best *et al.*, 2012; Klauda *et al.*, 2010; MacKerell *et al.*, 1998; Vanommeslaeghe *et al.*, 2010; Yu *et al.*, 2012). El campo de fuerza tiene la forma siguiente:

$$U(\vec{R}) = \sum_{bonds} K_b(b - b_0)^2 + \sum_{UB} K_{UB}(S - S_0)^2 + \sum_{Angulos} K_\theta(\theta - \theta_0)^2 + \sum_{diedro} K_\chi(1 + \cos(n\chi - \delta)) \\ + \sum_{impropios} K_{imp}(\phi - \phi_0)^2 + \sum_{no\ enlazante} \epsilon \left[\left(\frac{R_{min_{ij}}}{r_{ij}} \right)^{12} - \left(\frac{R_{min_{ij}}}{r_{ij}} \right)^6 \right] + \frac{q_i q_j}{\epsilon_l r_{ij}} \quad (14A)$$

Donde K_b , K_{UB} , K_θ , K_χ y K_{imp} son las constantes de fuerzas de enlaces, Urey-Bradley (UB), ángulos, ángulos diedros, y ángulos diedros impropios, respectivamente. Las letras b , S , θ , χ y ϕ son la distancia de enlace, distancia 1,3-Urey-Bradley, ángulo de enlace, ángulo diedro, ángulo de torsión impropio, respectivamente. Con el subíndice cero representando al punto de equilibrio para cada término. Las interacciones externas y no enlazantes se representan con Coulomb y Lennard-Jones 6-12. ϵ es la profundidad del pozo de Lennard-Jones 6-12 y R_{min} es la distancia mínimo de Lennard-Jones, q_i es la carga parcial atómica, ϵ_l es la constante dieléctrica efectiva, r_{ij} es la distancia entre dos átomos.

A.5 Parámetros para los ligandos desde CHARMM CGenFF.

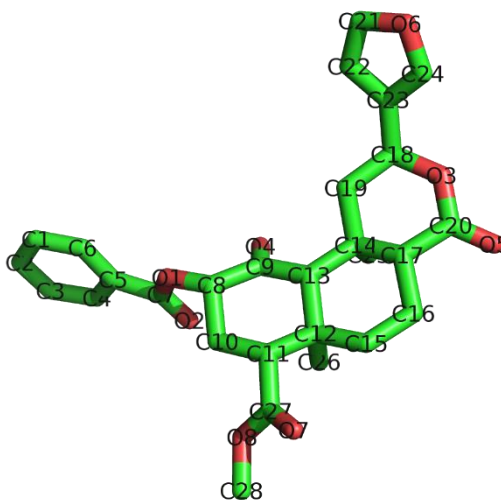
A.5.1 Herkinorina

* Topologies generated by
* CHARMM General Force Field (CGenFF) program version 1.0.0

36 1

! "penalty" is the highest penalty score of the associated parameters.
! Penalties lower than 10 indicate the analogy is fair; penalties between 10
! and 50 mean some basic validation is recommended; penalties higher than
! 50 indicate poor analogy and mandate extensive validation/optimization.

| RESI * | | 0.000 | | |
|----------|--------|----------|------------|--|
| GROUP | ! | CHARGE | CH_PENALTY | |
| ATOM C1 | CG2R61 | -0.115 ! | 0.000 | |
| ATOM H1 | HGR61 | 0.115 ! | 0.000 | |
| ATOM O1 | OG302 | -0.320 ! | 9.485 | |
| ATOM C10 | CG321 | -0.168 ! | 2.945 | |
| ATOM H10 | HGA2 | 0.090 ! | 0.000 | |
| ATOM C11 | CG311 | -0.120 ! | 8.193 | |
| ATOM H11 | HGA2 | 0.090 ! | 0.000 | |
| ATOM C12 | CG301 | -0.014 ! | 11.919 | |
| ATOM H12 | HGA2 | 0.090 ! | 0.125 | |
| ATOM C13 | CG311 | 0.052 ! | 7.895 | |
| ATOM H13 | HGA2 | 0.090 ! | 0.125 | |
| ATOM C14 | CG301 | -0.009 ! | 13.012 | |
| ATOM H14 | HGA1 | 0.090 ! | 1.898 | |
| ATOM C15 | CG321 | -0.194 ! | 1.661 | |
| ATOM H15 | HGA2 | 0.090 ! | 0.692 | |
| ATOM C16 | CG321 | -0.176 ! | 2.259 | |
| ATOM H16 | HGA2 | 0.090 ! | 0.692 | |
| ATOM C17 | CG311 | -0.111 ! | 10.595 | |
| ATOM H17 | HGA1 | 0.090 ! | 0.723 | |
| ATOM H18 | HGA1 | 0.090 ! | 0.330 | |
| ATOM C18 | CG311 | 0.175 ! | 32.534 | |
| ATOM C19 | CG321 | -0.191 ! | 7.420 | |
| ATOM H19 | HGR52 | 0.140 ! | 0.000 | |
| ATOM O2 | OG2D1 | -0.493 ! | 0.000 | |
| ATOM C2 | CG2R61 | -0.115 ! | 0.000 | |
| ATOM H2 | HGR61 | 0.115 ! | 0.000 | |
| ATOM C20 | CG2O2 | 0.900 ! | 58.361 | |
| ATOM H20 | HGR51 | 0.178 ! | 0.055 | |
| ATOM C21 | CG2R51 | 0.093 ! | 1.550 | |
| ATOM H21 | HGR52 | 0.161 ! | 0.030 | |
| ATOM H22 | HGA3 | 0.090 ! | 0.000 | |
| ATOM C22 | CG2R51 | -0.336 ! | 14.112 | |
| ATOM H23 | HGA3 | 0.090 ! | 0.000 | |
| ATOM C23 | CG2R51 | -0.033 ! | 27.749 | |
| ATOM H24 | HGA3 | 0.090 ! | 0.000 | |
| ATOM C24 | CG2R51 | 0.023 ! | 21.160 | |
| ATOM H25 | HGA3 | 0.090 ! | 0.000 | |
| ATOM C25 | CG331 | -0.271 ! | 6.608 | |
| ATOM C26 | CG331 | -0.271 ! | 6.608 | |
| ATOM H26 | HGA3 | 0.090 ! | 0.000 | |
| ATOM C27 | CG2O2 | 0.876 ! | 11.328 | |
| ATOM H27 | HGA3 | 0.090 ! | 0.000 | |
| ATOM C28 | CG331 | -0.012 ! | 0.239 | |
| ATOM H28 | HGA3 | 0.090 ! | 0.000 | |
| ATOM H29 | HGA3 | 0.090 ! | 0.000 | |
| ATOM C3 | CG2R61 | -0.115 ! | 0.000 | |
| ATOM H3 | HGR61 | 0.115 ! | 0.000 | |
| ATOM O3 | OG3R60 | -0.429 ! | 58.543 | |
| ATOM H30 | HGA3 | 0.090 ! | 0.000 | |
| ATOM C4 | CG2R61 | -0.112 ! | 0.000 | |
| ATOM H4 | HGR61 | 0.115 ! | 0.000 | |
| ATOM O4 | OG2D3 | -0.501 ! | 0.978 | |
| ATOM C5 | CG2R61 | 0.083 ! | 0.532 | |
| ATOM H5 | HGR61 | 0.115 ! | 0.000 | |
| ATOM O5 | OG2D1 | -0.625 ! | 6.532 | |
| ATOM C6 | CG2R61 | -0.112 ! | 0.000 | |
| ATOM H6 | HGA1 | 0.090 ! | 0.330 | |



| | | | |
|---------|--------|----------|--------|
| ATOM O6 | OG2R50 | -0.302 ! | 19.944 |
| ATOM C7 | CG2O2 | 0.472 ! | 2.556 |
| ATOM H7 | HGA2 | 0.090 ! | 0.195 |
| ATOM O7 | OG2D1 | -0.607 ! | 4.989 |
| ATOM C8 | CG311 | 0.314 ! | 10.660 |
| ATOM H8 | HGA2 | 0.090 ! | 0.195 |
| ATOM O8 | OG3O2 | -0.495 ! | 4.106 |
| ATOM H9 | HGA1 | 0.090 ! | 0.436 |
| ATOM C9 | CG2O5 | 0.225 ! | 15.609 |

| | |
|----------|-----|
| BOND O5 | C20 |
| BOND H21 | C24 |
| BOND H13 | C16 |
| BOND C20 | O3 |
| BOND C20 | C17 |
| BOND O3 | C18 |
| BOND H12 | C16 |
| BOND C24 | O6 |
| BOND C24 | C23 |
| BOND C16 | C17 |
| BOND C16 | C15 |
| BOND C17 | H17 |
| BOND C17 | C14 |
| BOND O6 | C21 |
| BOND H23 | C25 |
| BOND C18 | C23 |
| BOND C18 | H14 |
| BOND C18 | C19 |
| BOND H11 | C15 |
| BOND C23 | C22 |
| BOND C15 | H10 |
| BOND C15 | C12 |
| BOND H22 | C25 |
| BOND C25 | C14 |
| BOND C25 | H24 |
| BOND C21 | C22 |
| BOND C21 | H19 |
| BOND C14 | C19 |
| BOND C14 | C13 |
| BOND H25 | C26 |
| BOND C19 | H15 |
| BOND C19 | H16 |
| BOND C22 | H20 |
| BOND C12 | C26 |
| BOND C12 | C13 |
| BOND C12 | C11 |
| BOND H26 | C26 |
| BOND C26 | H27 |
| BOND O7 | C27 |
| BOND C13 | H18 |
| BOND C13 | C9 |
| BOND H30 | C28 |
| BOND C27 | C11 |
| BOND C27 | O8 |
| BOND H9 | C11 |
| BOND C11 | C10 |
| BOND C9 | O4 |
| BOND C9 | C8 |
| BOND C28 | O8 |
| BOND C28 | H29 |
| BOND C28 | H28 |
| BOND C10 | H7 |
| BOND C10 | C8 |
| BOND C10 | H8 |
| BOND H6 | C8 |
| BOND C8 | O1 |
| BOND O2 | C7 |
| BOND O1 | C7 |
| BOND C7 | C5 |
| BOND C5 | C6 |
| BOND C5 | C4 |

BOND H5 C6
 BOND H4 C4
 BOND C6 C1
 BOND C4 C3
 BOND C1 H1
 BOND C1 C2
 BOND C3 H3
 BOND C3 C2
 BOND C2 H2
 IMPR C20 C17 O5 O3
 IMPR C27 C11 O7 O8
 IMPR C7 C5 O2 O1
 IMPR C9 C13 C8 O4

BONDS

CG2O2 OG3R60 150.00 1.3340 ! * , from CG2O2 OG3O2, penalty= 55
 CG2R51 CG311 229.63 1.5000 ! * , from CG2R51 CG321, penalty= 4
 CG311 OG3R60 280.00 1.4000 ! * , from CG321 OG3R60, penalty= 4

ANGLES

CG311 CG2O2 OG3R60 55.00 109.00 20.00 2.32600 ! * , from CG311 CG2O2 OG3O2, penalty= 7
 OG2D1 CG2O2 OG3R60 90.00 125.90 160.00 2.25760 ! * , from OG2D1 CG2O2 OG3O2, penalty= 7
 CG311 CG2O5 CG311 35.00 115.60 ! * , from CG321 CG2O5 CG321, penalty= 1.2
 CG2R51 CG2R51 CG311 45.80 130.00 ! * , from CG2R51 CG2R51 CG321, penalty= 0.6
 CG2O2 CG311 CG3O1 52.00 108.00 ! * , from CG2O2 CG311 CG321, penalty= 1.8
 CG2O5 CG311 CG3O1 52.00 108.00 ! * , from CG2O2 CG311 CG321, penalty= 3.8
 CG2O5 CG311 CG321 52.00 108.00 ! * , from CG2O2 CG311 CG321, penalty= 2
 CG2O5 CG311 OG3O2 45.00 109.00 ! * , from CG2O3 CG311 OG3O1, penalty= 12.5
 CG2R51 CG311 CG321 58.35 114.00 ! * , from CG2R51 CG321 CG311, penalty= 4.6
 CG2R51 CG311 OG3R60 75.70 110.10 ! * , from CG2R61 CG321 OG3O2, penalty= 19.5
 CG2R51 CG311 HGA1 55.00 109.50 ! * , from CG2R51 CG321 HGA2, penalty= 4
 CG3O1 CG311 CG3O1 52.00 108.00 ! * , from CG3O1 CG311 CG311, penalty= 1.2
 CG321 CG311 OG3R60 45.00 111.50 ! * , from CG321 CG321 OG3C61, penalty= 4.7
 OG3R60 CG311 HGA1 55.00 111.50 ! * , from OG3R60 CG321 HGA2, penalty= 4
 CG3O1 CG321 CG311 58.35 113.50 11.16 2.56100 ! * , from CG3O1 CG321 CG321, penalty= 0.6
 CG2O2 OG3R60 CG311 20.00 99.00 ! * , from CG2D1O OG3R60 CG321, penalty= 30.6

DIHEDRALS

OG2D1 CG2O2 CG311 CG3O1 0.0500 6 180.00 ! * , from OG2D1 CG2O2 CG311 CG321, penalty= 1.8
 OG3O2 CG2O2 CG311 CG3O1 0.0500 6 180.00 ! * , from OG3O2 CG2O2 CG311 CG321, penalty= 1.8
 OG3R60 CG2O2 CG311 CG3O1 0.0500 6 180.00 ! * , from OG3O2 CG2O2 CG311 CG321, penalty= 8.8
 OG3R60 CG2O2 CG311 CG321 0.0500 6 180.00 ! * , from OG3O2 CG2O2 CG311 CG321, penalty= 7
 OG3R60 CG2O2 CG311 HGA1 0.0000 1 0.00 ! * , from OG3O2 CG2O2 CG311 HGA1, penalty= 7
 CG2R61 CG2O2 OG3O2 CG311 1.2500 1 180.00 ! * , from CG2R61 CG2O2 OG3O2 CG331, penalty= 1.5
 CG2R61 CG2O2 OG3O2 CG311 1.5000 2 180.00 ! * , from CG2R61 CG2O2 OG3O2 CG331, penalty= 1.5
 CG2R61 CG2O2 OG3O2 CG311 0.0500 6 180.00 ! * , from CG2R61 CG2O2 OG3O2 CG331, penalty= 1.5
 CG311 CG2O2 OG3R60 CG311 2.0500 2 180.00 ! * , from CG311 CG2O2 OG3O2 CG321, penalty= 55.6
 OG2D1 CG2O2 OG3R60 CG311 0.9650 1 180.00 ! * , from OG2D1 CG2O2 OG3O2 CG311, penalty= 55
 OG2D1 CG2O2 OG3R60 CG311 3.8500 2 180.00 ! * , from OG2D1 CG2O2 OG3O2 CG311, penalty= 55
 CG311 CG2O5 CG311 CG3O1 0.7500 1 0.00 ! * , from CG321 CG2O5 CG321 CG321, penalty= 6.4
 CG311 CG2O5 CG311 CG3O1 0.1800 2 180.00 ! * , from CG321 CG2O5 CG321 CG321, penalty= 6.4
 CG311 CG2O5 CG311 CG3O1 0.0650 3 0.00 ! * , from CG321 CG2O5 CG321 CG321, penalty= 6.4
 CG311 CG2O5 CG311 CG3O1 0.0300 6 0.00 ! * , from CG321 CG2O5 CG321 CG321, penalty= 6.4
 CG311 CG2O5 CG311 CG321 0.7500 1 0.00 ! * , from CG321 CG2O5 CG321 CG321, penalty= 4.6
 CG311 CG2O5 CG311 CG321 0.1800 2 180.00 ! * , from CG321 CG2O5 CG321 CG321, penalty= 4.6
 CG311 CG2O5 CG311 CG321 0.0650 3 0.00 ! * , from CG321 CG2O5 CG321 CG321, penalty= 4.6
 CG311 CG2O5 CG311 CG321 0.0300 6 0.00 ! * , from CG321 CG2O5 CG321 CG321, penalty= 4.6
 CG311 CG2O5 CG311 OG3O2 0.7500 1 0.00 ! * , from CG321 CG2O5 CG321 CG321, penalty= 49.6
 CG311 CG2O5 CG311 OG3O2 0.1800 2 180.00 ! * , from CG321 CG2O5 CG321 CG321, penalty= 49.6
 CG311 CG2O5 CG311 OG3O2 0.0650 3 0.00 ! * , from CG321 CG2O5 CG321 CG321, penalty= 49.6
 CG311 CG2O5 CG311 OG3O2 0.0300 6 0.00 ! * , from CG321 CG2O5 CG321 CG321, penalty= 49.6
 CG311 CG2O5 CG311 HGA1 0.1000 3 0.00 ! * , from CG321 CG2O5 CG321 HGA2, penalty= 4.6
 OG2D3 CG2O5 CG311 CG3O1 0.7500 1 180.00 ! * , from OG2D3 CG2O5 CG321 CG321, penalty= 5.8
 OG2D3 CG2O5 CG311 CG3O1 0.1800 2 180.00 ! * , from OG2D3 CG2O5 CG321 CG321, penalty= 5.8
 OG2D3 CG2O5 CG311 CG3O1 0.0650 3 180.00 ! * , from OG2D3 CG2O5 CG321 CG321, penalty= 5.8
 OG2D3 CG2O5 CG311 CG3O1 0.0300 6 0.00 ! * , from OG2D3 CG2O5 CG321 CG321, penalty= 5.8
 OG2D3 CG2O5 CG311 CG321 0.7500 1 180.00 ! * , from OG2D3 CG2O5 CG321 CG321, penalty= 4
 OG2D3 CG2O5 CG311 CG321 0.1800 2 180.00 ! * , from OG2D3 CG2O5 CG321 CG321, penalty= 4
 OG2D3 CG2O5 CG311 CG321 0.0650 3 180.00 ! * , from OG2D3 CG2O5 CG321 CG321, penalty= 4
 OG2D3 CG2O5 CG311 CG321 0.0300 6 0.00 ! * , from OG2D3 CG2O5 CG321 CG321, penalty= 4
 OG2D3 CG2O5 CG311 OG3O2 0.0000 2 0.00 ! * , from OG2D3 CG2O5 CG311 OG311, penalty= 15

| | | | | | | | | | |
|--------|--------|--------|--------|--------|---|--------|---|---|--|
| CG2R51 | CG2R51 | CG2R51 | CG311 | 4.0000 | 2 | 180.00 | ! | * | , from CG2R51 CG2R51 CG2R51 CG3C52, penalty= 31 |
| CG311 | CG2R51 | CG2R51 | OG2R50 | 3.0000 | 2 | 180.00 | ! | * | , from CG321 CG2R51 CG2R51 NG2R51, penalty= 45.6 |
| CG311 | CG2R51 | CG2R51 | HGR51 | 1.0000 | 2 | 180.00 | ! | * | , from CG321 CG2R51 CG2R51 HGR52, penalty= 1.1 |
| CG311 | CG2R51 | CG2R51 | HGR52 | 1.0000 | 2 | 180.00 | ! | * | , from CG321 CG2R51 CG2R51 HGR52, penalty= 0.6 |
| CG2R51 | CG2R51 | CG311 | CG321 | 0.2000 | 1 | 0.00 | ! | * | , from CG2R51 CG2R51 CG321 CG311, penalty= 4.6 |
| CG2R51 | CG2R51 | CG311 | CG321 | 0.2700 | 2 | 0.00 | ! | * | , from CG2R51 CG2R51 CG321 CG311, penalty= 4.6 |
| CG2R51 | CG2R51 | CG311 | CG321 | 0.0000 | 3 | 0.00 | ! | * | , from CG2R51 CG2R51 CG321 CG311, penalty= 4.6 |
| CG2R51 | CG2R51 | CG311 | OG3R60 | 0.2000 | 1 | 0.00 | ! | * | , from CG2R51 CG2R51 CG321 CG311, penalty= 49.6 |
| CG2R51 | CG2R51 | CG311 | OG3R60 | 0.2700 | 2 | 0.00 | ! | * | , from CG2R51 CG2R51 CG321 CG311, penalty= 49.6 |
| CG2R51 | CG2R51 | CG311 | OG3R60 | 0.0000 | 3 | 0.00 | ! | * | , from CG2R51 CG2R51 CG321 CG311, penalty= 49.6 |
| CG2R51 | CG2R51 | CG311 | HGA1 | 0.0000 | 3 | 0.00 | ! | * | , from CG2R51 CG2R51 CG321 HGA2, penalty= 4 |
| CG311 | CG301 | CG311 | CG202 | 0.2000 | 3 | 0.00 | ! | * | , from CG201 CG311 CG311 CG321, penalty= 11.1 |
| CG311 | CG301 | CG311 | CG205 | 0.2000 | 3 | 0.00 | ! | * | , from CG201 CG311 CG311 CG321, penalty= 11.6 |
| CG311 | CG301 | CG311 | CG301 | 0.2000 | 3 | 0.00 | ! | * | , from CG311 CG301 CG311 CG311, penalty= 1.2 |
| CG321 | CG301 | CG311 | CG202 | 0.2000 | 3 | 0.00 | ! | * | , from CG201 CG311 CG311 CG321, penalty= 10.5 |
| CG321 | CG301 | CG311 | CG205 | 0.2000 | 3 | 0.00 | ! | * | , from CG201 CG311 CG311 CG321, penalty= 11 |
| CG321 | CG301 | CG311 | CG301 | 0.2000 | 3 | 0.00 | ! | * | , from CG321 CG301 CG311 CG311, penalty= 1.2 |
| CG331 | CG301 | CG311 | CG202 | 0.2000 | 3 | 0.00 | ! | * | , from CG201 CG311 CG311 CG331, penalty= 10.5 |
| CG331 | CG301 | CG311 | CG205 | 0.2000 | 3 | 0.00 | ! | * | , from CG201 CG311 CG311 CG331, penalty= 11 |
| CG331 | CG301 | CG311 | CG301 | 0.2000 | 3 | 0.00 | ! | * | , from CG331 CG301 CG311 CG311, penalty= 1.2 |
| CG311 | CG301 | CG321 | CG311 | 0.2000 | 3 | 0.00 | ! | * | , from CG311 CG301 CG321 CG321, penalty= 0.6 |
| CG331 | CG301 | CG321 | CG311 | 0.2000 | 3 | 0.00 | ! | * | , from CG331 CG301 CG321 CG321, penalty= 0.6 |
| CG202 | CG311 | CG321 | CG311 | 0.2000 | 3 | 0.00 | ! | * | , from CG202 CG311 CG321 CG321, penalty= 0.6 |
| CG205 | CG311 | CG321 | CG311 | 0.2000 | 3 | 0.00 | ! | * | , from CG202 CG311 CG321 CG321, penalty= 2.6 |
| CG205 | CG311 | CG321 | HGA2 | 0.2000 | 3 | 0.00 | ! | * | , from CG202 CG311 CG321 HGA2, penalty= 2 |
| CG2R51 | CG311 | CG321 | CG301 | 0.0400 | 3 | 0.00 | ! | * | , from CG2R61 CG321 CG321 CG321, penalty= 14.3 |
| CG2R51 | CG311 | CG321 | HGA2 | 0.2000 | 3 | 0.00 | ! | * | , from HGA1 CG311 CG321 CG2R51, penalty= 8.1 |
| OG302 | CG311 | CG321 | CG311 | 0.1950 | 3 | 0.00 | ! | * | , from CG321 CG321 CG321 OG302, penalty= 4.6 |
| OG3R60 | CG311 | CG321 | CG301 | 0.1900 | 1 | 180.00 | ! | * | , from CG321 CG321 CG321 OG3C61, penalty= 6.5 |
| OG3R60 | CG311 | CG321 | CG301 | 1.0000 | 2 | 180.00 | ! | * | , from CG321 CG321 CG321 OG3C61, penalty= 6.5 |
| OG3R60 | CG311 | CG321 | CG301 | 0.6000 | 3 | 0.00 | ! | * | , from CG321 CG321 CG321 OG3C61, penalty= 6.5 |
| OG3R60 | CG311 | CG321 | CG301 | 0.0800 | 4 | 180.00 | ! | * | , from CG321 CG321 CG321 OG3C61, penalty= 6.5 |
| OG3R60 | CG311 | CG321 | HGA2 | 0.1950 | 3 | 0.00 | ! | * | , from OG3C61 CG321 CG321 HGA2, penalty= 4.7 |
| HGA1 | CG311 | CG321 | CG301 | 0.1950 | 3 | 0.00 | ! | * | , from HGA1 CG311 CG321 CG311, penalty= 1.2 |
| CG205 | CG311 | OG302 | CG202 | 0.0000 | 3 | 0.00 | ! | * | , from CG2R61 CG321 OG302 CG202, penalty= 29 |
| CG2R51 | CG311 | OG3R60 | CG202 | 0.7000 | 3 | 0.00 | ! | * | , from CG2DC1 CG321 OG3R60 CG2D20, penalty= 56.5 |
| CG321 | CG311 | OG3R60 | CG202 | 0.7000 | 1 | 180.00 | ! | * | , from CG321 CG311 OG302 CG202, penalty= 55 |
| HGA1 | CG311 | OG3R60 | CG202 | 0.9000 | 3 | 0.00 | ! | * | , from HGA2 CG321 OG3R60 CG2D10, penalty= 34 |

IMPROPERS

| | | | | | | | | | |
|-------|-------|-------|--------|---------|---|------|---|---|--|
| CG202 | CG311 | OG2D1 | OG3R60 | 62.0000 | 0 | 0.00 | ! | * | , from CG202 CG311 OG2D1 OG302, penalty= 5.5 |
| CG205 | CG311 | CG311 | OG2D3 | 70.0000 | 0 | 0.00 | ! | * | , from CG205 CG321 CG321 OG2D3, penalty= 0.8 |

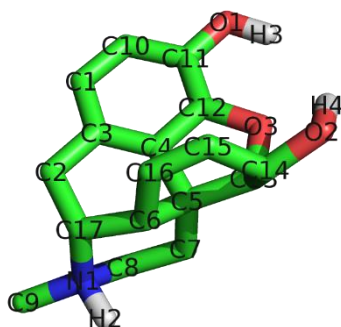
A.5.2 Morfina

* Topologies generated by
 * CHARMM General Force Field (CGenFF) program version 1.0.0

36 1

! "penalty" is the highest penalty score of the associated parameters.
 ! Penalties lower than 10 indicate the analogy is fair; penalties between 10
 ! and 50 mean some basic validation is recommended; penalties higher than
 ! 50 indicate poor analogy and mandate extensive validation/optimization.

| RESI * | GROUP | CHARGE | CH_PENALTY |
|----------|--------|----------|------------|
| ATOM C1 | CG2R61 | -0.219 ! | 5.398 |
| ATOM N1 | NG3P1 | -0.392 ! | 25.936 |
| ATOM O1 | OG311 | -0.530 ! | 3.568 |
| ATOM C2 | CG321 | -0.151 ! | 43.485 |
| ATOM O2 | OG311 | -0.656 ! | 9.602 |
| ATOM C3 | CG2R61 | -0.189 ! | 36.332 |
| ATOM O3 | OG3C51 | -0.227 ! | 26.088 |
| ATOM C4 | CG2RC0 | 0.079 ! | 67.831 |
| ATOM C5 | CG3RC1 | 0.072 ! | 44.265 |
| ATOM C6 | CG311 | -0.046 ! | 48.845 |
| ATOM C7 | CG321 | -0.176 ! | 30.018 |
| ATOM C8 | CG324 | 0.141 ! | 9.233 |
| ATOM C9 | CG334 | 0.152 ! | 1.957 |
| ATOM C10 | CG2R61 | -0.147 ! | 0.000 |
| ATOM C11 | CG2R61 | 0.018 ! | 3.646 |
| ATOM C12 | CG2RC0 | 0.158 ! | 41.430 |
| ATOM C13 | CG3RC1 | 0.059 ! | 37.679 |
| ATOM C14 | CG311 | 0.179 ! | 27.350 |
| ATOM C15 | CG2D1 | -0.148 ! | 8.172 |
| ATOM C16 | CG2D1 | -0.147 ! | 11.754 |
| ATOM C17 | CG314 | 0.155 ! | 58.262 |
| ATOM H1 | HGR61 | 0.196 ! | 0.000 |
| ATOM H2 | HGP2 | 0.320 ! | 0.520 |



| | | | |
|----------|-------|---------|-------|
| ATOM H3 | HGP1 | 0.420 ! | 0.075 |
| ATOM H4 | HGP1 | 0.413 ! | 0.300 |
| ATOM H6 | HGA1 | 0.090 ! | 2.606 |
| ATOM H10 | HGR61 | 0.196 ! | 0.000 |
| ATOM H13 | HGA1 | 0.090 ! | 3.729 |
| ATOM H14 | HGA1 | 0.090 ! | 1.172 |
| ATOM H15 | HGA4 | 0.150 ! | 1.078 |
| ATOM H16 | HGA4 | 0.150 ! | 1.547 |
| ATOM H17 | HGA1 | 0.090 ! | 3.424 |
| ATOM H21 | HGA2 | 0.090 ! | 0.086 |
| ATOM H22 | HGA2 | 0.090 ! | 0.086 |
| ATOM H71 | HGA2 | 0.090 ! | 2.501 |
| ATOM H72 | HGA2 | 0.090 ! | 2.501 |
| ATOM H81 | HGA2 | 0.090 ! | 0.691 |
| ATOM H82 | HGA2 | 0.090 ! | 0.691 |
| ATOM H91 | HGA3 | 0.090 ! | 0.030 |
| ATOM H92 | HGA3 | 0.090 ! | 0.030 |
| ATOM H93 | HGA3 | 0.090 ! | 0.030 |

| | |
|----------|-----|
| BOND H10 | C10 |
| BOND H1 | C1 |
| BOND C10 | C1 |
| BOND C10 | C11 |
| BOND C1 | C3 |
| BOND O1 | C11 |
| BOND O1 | H3 |
| BOND C11 | C12 |
| BOND H21 | C2 |
| BOND H92 | C9 |
| BOND C3 | C2 |
| BOND C3 | C4 |
| BOND H82 | C8 |
| BOND H22 | C2 |
| BOND C2 | C17 |
| BOND C12 | C4 |
| BOND C12 | O3 |
| BOND C4 | C5 |
| BOND C9 | H91 |
| BOND C9 | H93 |
| BOND C9 | N1 |
| BOND C8 | H81 |
| BOND C8 | N1 |
| BOND C8 | C7 |
| BOND C17 | N1 |
| BOND C17 | H17 |
| BOND C17 | C6 |
| BOND N1 | H2 |
| BOND H72 | C7 |
| BOND O3 | C13 |
| BOND C7 | C5 |
| BOND C7 | H71 |
| BOND C5 | C6 |
| BOND C5 | C13 |
| BOND C6 | C16 |
| BOND C6 | H6 |
| BOND H16 | C16 |
| BOND C13 | H13 |
| BOND C13 | C14 |
| BOND C16 | C15 |
| BOND C15 | H15 |
| BOND C15 | C14 |
| BOND H4 | O2 |
| BOND C14 | O2 |
| BOND C14 | H14 |

| | | | |
|--------|--------|--------|--|
| BONDS | | | |
| CG2D1 | CG311 | 365.00 | 1.5020 ! * , from CG2D1 CG321, penalty= 4 |
| CG2RC0 | CG3RC1 | 305.00 | 1.5200 ! * , from CG2RC0 CG3C52, penalty= 20 |
| CG314 | NG3P1 | 200.00 | 1.4800 ! * , from CG324 NG3P1, penalty= 4 |

ANGLES

| | | | | |
|--------|--------|--------|--------|--|
| CG2D1 | CG2D1 | CG311 | 48.00 | 123.50 ! * , from CG2D1 CG2D1 CG321, penalty= 0.6 |
| CG311 | CG2D1 | HGA4 | 40.00 | 116.00 ! * , from CG321 CG2D1 HGA4, penalty= 0.6 |
| CG2RC0 | CG2R61 | CG321 | 45.80 | 120.00 ! * , from CG2R61 CG2R61 CG321, penalty= 1.5 |
| CG2RC0 | CG2R61 | OG311 | 45.20 | 120.00 ! * , from CG2R61 CG2R61 OG311, penalty= 1.5 |
| CG2R61 | CG2RC0 | CG3RC1 | 60.00 | 130.00 ! * , from CG2R61 CG2RC0 CG3C52, penalty= 1.1 |
| CG2RC0 | CG2RC0 | CG3RC1 | 110.00 | 110.00 ! * , from CG2RC0 CG2RC0 CG3C52, penalty= 1.1 |
| CG2D1 | CG311 | CG314 | 32.00 | 112.20 ! * , from CG2D1 CG321 CG321, penalty= 21 |
| CG2D1 | CG311 | CG3RC1 | 32.00 | 112.20 ! * , from CG2D1 CG321 CG321, penalty= 17.8 |
| CG2D1 | CG311 | OG311 | 75.70 | 110.10 ! * , from CG2D1 CG321 OG311, penalty= 4 |
| CG2D1 | CG311 | HGA1 | 45.00 | 111.50 ! * , from CG2D1 CG321 HGA2, penalty= 4 |
| CG314 | CG311 | CG3RC1 | 53.35 | 111.00 8.00 2.56100 ! * , from CG314 CG311 CG321, penalty= 13.8 |
| CG311 | CG314 | CG321 | 58.35 | 113.50 11.16 2.56100 ! * , from CG321 CG314 CG321, penalty= 0.6 |
| CG311 | CG314 | NG3P1 | 40.00 | 110.00 ! * , from CG321 CG314 NG3P2, penalty= 1.2 |
| CG321 | CG314 | NG3P1 | 40.00 | 110.00 ! * , from CG321 CG314 NG3P2, penalty= 0.6 |
| NG3P1 | CG314 | HGA1 | 45.00 | 102.30 35.00 2.10100 ! * , from NG3P2 CG314 HGA1, penalty= 0.6 |
| CG324 | CG321 | CG3RC1 | 58.35 | 110.50 11.16 2.56100 ! * , from CG321 CG321 CG324, penalty= 13.8 |
| CG2RC0 | CG3RC1 | CG311 | 62.00 | 103.00 ! * , from CG2R51 CG3C54 NG3P2, penalty= 70.5 |
| CG2RC0 | CG3RC1 | CG321 | 62.00 | 103.00 ! * , from CG2R51 CG3C54 NG3P2, penalty= 70.5 |
| CG2RC0 | CG3RC1 | CG3RC1 | 70.00 | 113.70 ! * , from CG3RC1 CG3RC1 NG2R51, penalty= 52 |
| CG311 | CG3RC1 | CG321 | 58.35 | 113.50 11.16 2.56100 ! * , from CG311 CG3RC1 CG331, penalty= 0.9 |
| CG311 | CG3RC1 | OG3C51 | 45.00 | 111.50 ! * , from CG321 CG3C51 OG3C51, penalty= 16.6 |
| CG314 | NG3P1 | CG324 | 45.00 | 115.20 ! * , from CG324 NG3P1 CG324, penalty= 0.6 |
| CG314 | NG3P1 | CG334 | 45.00 | 109.50 ! * , from CG324 NG3P1 CG334, penalty= 0.6 |
| CG314 | NG3P1 | HGP2 | 30.00 | 110.80 27.00 2.07400 ! * , from CG324 NG3P1 HGP2, penalty= 0.6 |

CG2RC0 OG3C51 CG3RC1 76.00 108.05 ! * , from CG2RC0 OG3C51 CG3C52, penalty= 1.1

DIHEDRALS

CG311 CG2D1 CG2D1 CG311 0.4500 1 180.00 ! * , from CG321 CG2D1 CG2D1 CG321, penalty= 1.2
CG311 CG2D1 CG2D1 CG311 8.5000 2 180.00 ! * , from CG321 CG2D1 CG2D1 CG321, penalty= 1.2
CG311 CG2D1 CG2D1 HGA4 1.0000 2 180.00 ! * , from CG321 CG2D1 CG2D1 HGA4, penalty= 0.6
CG2D1 CG2D1 CG311 CG314 0.6000 1 180.00 ! * , from CG2D1 CG2D1 CG321 CG321, penalty= 21
CG2D1 CG2D1 CG311 CG3RC1 0.6000 1 180.00 ! * , from CG2D1 CG2D1 CG321 CG321, penalty= 17.8
CG2D1 CG2D1 CG311 CG311 1.9000 1 180.00 ! * , from CG2D2 CG2D1 CG321 OG311, penalty= 7.5
CG2D1 CG2D1 CG311 OG311 0.4000 2 180.00 ! * , from CG2D2 CG2D1 CG321 OG311, penalty= 7.5
CG2D1 CG2D1 CG311 OG311 0.6000 3 180.00 ! * , from CG2D2 CG2D1 CG321 OG311, penalty= 7.5
CG2D1 CG2D1 CG311 HGA1 0.3000 3 180.00 ! * , from CG2D1 CG2D1 CG321 HGA2, penalty= 4
HGA4 CG2D1 CG311 CG314 0.1200 3 0.00 ! * , from HGA4 CG2D1 CG321 CG321, penalty= 21
HGA4 CG2D1 CG311 CG3RC1 0.1200 3 0.00 ! * , from HGA4 CG2D1 CG321 CG321, penalty= 17.8
HGA4 CG2D1 CG311 OG311 0.2000 3 0.00 ! * , from HGA4 CG2D1 CG321 OG311, penalty= 4
HGA4 CG2D1 CG311 HGA1 0.0000 3 0.00 ! * , from HGA4 CG2D1 CG321 HGA2, penalty= 4
CG2R61 CG2R61 CG2RC0 CG3RC1 0.0000 2 180.00 ! * , from CG2R61 CG2R61 CG2RC0 CG3C52, penalty= 1.1
CG321 CG2R61 CG2RC0 CG2RC0 3.1000 2 180.00 ! * , from CG2R61 CG2R61 CG2R61 CG321, penalty= 61.5
CG321 CG2R61 CG2RC0 CG3RC1 2.4000 2 180.00 ! * , from CG331 CG2R61 CG2R61 CG331, penalty= 55.6
OG311 CG2R61 CG2RC0 CG2RC0 3.1000 2 180.00 ! * , from CG2R61 CG2R61 CG2R61 OG311, penalty= 61.5
OG311 CG2R61 CG2RC0 OG3C51 2.5800 2 180.00 ! * , from NG311 CG2R61 CG2R61 OG3R60, penalty= 75.1
CG2RC0 CG2R61 CG321 CG314 0.2300 2 180.00 ! * , from CG2R61 CG2R61 CG321 CG314, penalty= 1.5
CG2RC0 CG2R61 CG321 HGA2 0.0020 6 0.00 ! * , from CG2R61 CG2R61 CG321 HGA2, penalty= 1.5
CG2RC0 CG2R61 OG311 HGP1 0.9900 2 180.00 ! * , from CG2R61 CG2R61 OG311 HGP1, penalty= 1.5
CG2R61 CG2RC0 CG2RC0 CG3RC1 6.5000 2 180.00 ! * , from CG2R61 CG2RC0 CG2RC0 CG3C52, penalty= 1.1
CG3RC1 CG2RC0 CG2RC0 OG3C51 6.0000 2 180.00 ! * , from CG3C52 CG2RC0 CG2RC0 NG3C51, penalty= 37.1
CG2R61 CG2RC0 CG3RC1 CG311 3.0000 2 180.00 ! * , from CG2R61 CG2RC0 CG3C52 CG3C52, penalty= 51
CG2R61 CG2RC0 CG3RC1 CG321 3.0000 2 180.00 ! * , from CG2R61 CG2RC0 CG3C52 CG3C52, penalty= 51
CG2R61 CG2RC0 CG3RC1 CG3RC1 3.0000 2 180.00 ! * , from CG2R61 CG2RC0 CG3C52 CG3C52, penalty= 61.1
CG2RC0 CG2RC0 CG3RC1 CG311 1.0300 3 180.00 ! * , from CG2RC0 CG2RC0 CG3C52 CG3C52, penalty= 51
CG2RC0 CG2RC0 CG3RC1 CG321 1.0300 3 180.00 ! * , from CG2RC0 CG2RC0 CG3C52 CG3C52, penalty= 51
CG2RC0 CG2RC0 CG3RC1 CG3RC1 1.0300 3 180.00 ! * , from CG2RC0 CG2RC0 CG3C52 CG3C52, penalty= 61.1
CG2R61 CG2RC0 OG3C51 CG3RC1 0.3000 2 180.00 ! * , from CG2R61 CG2RC0 OG3C51 CG3C52, penalty= 1.1
CG2RC0 CG2RC0 OG3C51 CG3RC1 0.3000 2 180.00 ! * , from CG2RC0 CG2RC0 OG3C51 CG3C52, penalty= 1.1
CG2D1 CG311 CG314 CG321 0.2000 3 0.00 ! * , from CG321 CG311 CG321 CG2D1, penalty= 5
CG2D1 CG311 CG314 NG3P1 0.2000 3 0.00 ! * , from NG3P3 CG314 CG321 CG2R61, penalty= 26.5
CG2D1 CG311 CG314 HGA1 0.2000 3 0.00 ! * , from HGA1 CG311 CG321 CG2D1, penalty= 5
CG3RC1 CG311 CG314 CG321 0.1500 3 0.00 ! * , from CG321 CG311 CG311 CG3RC1, penalty= 1
CG3RC1 CG311 CG314 NG3P1 0.2000 3 0.00 ! * , from CG321 CG311 CG314 NG3P3, penalty= 15.3
CG3RC1 CG311 CG314 HGA1 0.1500 3 0.00 ! * , from CG3RC1 CG311 CG311 HGA1, penalty= 1
HGA1 CG311 CG314 CG321 0.1950 3 0.00 ! * , from CG321 CG311 CG311 HGA1, penalty= 1
HGA1 CG311 CG314 NG3P1 0.2000 3 0.00 ! * , from HGA1 CG311 CG314 NG3P3, penalty= 1.5
CG2D1 CG311 CG3RC1 CG2RC0 0.2000 3 0.00 ! * , from CG201 CG311 CG321 CG2R51, penalty= 125
CG2D1 CG311 CG3RC1 CG321 0.0500 3 0.00 ! * , from CG321 CG311 CG3RC1 CG331, penalty= 70.9
CG2D1 CG311 CG3RC1 CG3RC1 0.1500 3 0.00 ! * , from CG321 CG311 CG3RC1 CG3RC1, penalty= 70
CG2D1 CG311 CG3RC1 OG3C51 3.4000 1 180.00 ! * , from OG303 CG321 CG3C51 OG3C51, penalty= 97.5
CG2D1 CG311 CG3RC1 HGA1 0.1500 3 0.00 ! * , from CG321 CG311 CG3RC1 HGA1, penalty= 70
CG314 CG311 CG3RC1 CG2RC0 0.5000 4 180.00 ! * , from CG321 CG311 CG3RC1 CG3C52, penalty= 91
CG314 CG311 CG3RC1 CG321 0.0500 3 0.00 ! * , from CG321 CG311 CG3RC1 CG331, penalty= 17.9
CG314 CG311 CG3RC1 CG3RC1 0.1500 3 0.00 ! * , from CG321 CG311 CG3RC1 CG3RC1, penalty= 17
OG311 CG311 CG3RC1 OG3C51 3.4000 1 180.00 ! * , from OG311 CG321 CG3C51 OG3C51, penalty= 20
OG311 CG311 CG3RC1 HGA1 0.1950 3 0.00 ! * , from OG311 CG321 CG3C51 HGA1, penalty= 20
HGA1 CG311 CG3RC1 CG2RC0 0.1950 3 0.00 ! * , from HGA1 CG311 CG3RC1 CG3C52, penalty= 74
HGA1 CG311 CG3RC1 CG321 0.0500 3 0.00 ! * , from HGA1 CG311 CG3RC1 CG331, penalty= 0.9
HGA1 CG311 CG3RC1 OG3C51 0.1600 3 0.00 ! * , from HGA2 CG321 CG3C51 OG3C51, penalty= 20
CG2D1 CG311 OG311 HGP1 1.3000 1 0.00 ! * , from CG2D1 CG321 OG311 HGP1, penalty= 4
CG2D1 CG311 OG311 HGP1 0.7000 2 0.00 ! * , from CG2D1 CG321 OG311 HGP1, penalty= 4
CG2D1 CG311 OG311 HGP1 0.1400 3 0.00 ! * , from CG2D1 CG321 OG311 HGP1, penalty= 4
CG311 CG314 CG321 CG2R61 0.0400 3 0.00 ! * , from CG331 CG311 CG321 CG2R61, penalty= 2.5
CG311 CG314 CG321 HGA2 0.1950 3 0.00 ! * , from CG321 CG314 CG321 HGA2, penalty= 0.6
NG3P1 CG314 CG321 CG2R61 0.2000 3 0.00 ! * , from NG3P3 CG314 CG321 CG2R61, penalty= 1.5
NG3P1 CG314 CG321 HGA2 0.1950 3 0.00 ! * , from NG3P2 CG314 CG321 HGA2, penalty= 0.6
CG311 CG314 NG3P1 CG324 0.1000 3 0.00 ! * , from CG311 CG324 NG3P1 CG324, penalty= 4
CG311 CG314 NG3P1 CG334 0.1000 3 0.00 ! * , from CG311 CG324 NG3P1 CG334, penalty= 4
CG311 CG314 NG3P1 HGP2 0.1000 3 0.00 ! * , from CG311 CG324 NG3P1 HGP2, penalty= 4
CG321 CG314 NG3P1 CG324 0.1000 3 0.00 ! * , from CG321 CG324 NG3P1 CG324, penalty= 4
CG321 CG314 NG3P1 CG334 0.1000 3 0.00 ! * , from CG321 CG324 NG3P1 CG334, penalty= 4
CG321 CG314 NG3P1 HGP2 0.1000 3 0.00 ! * , from CG321 CG324 NG3P1 HGP2, penalty= 4
HGA1 CG314 NG3P1 CG324 0.1000 3 0.00 ! * , from HGA2 CG324 NG3P1 CG324, penalty= 4
HGA1 CG314 NG3P1 CG334 0.1000 3 0.00 ! * , from HGA2 CG324 NG3P1 CG334, penalty= 4
HGA1 CG314 NG3P1 HGP2 0.1000 3 0.00 ! * , from HGA2 CG324 NG3P1 HGP2, penalty= 4
CG3RC1 CG321 CG324 NG3P1 1.0000 3 0.00 ! * , from CG321 CG321 CG324 NG3P1, penalty= 13.8
CG3RC1 CG321 CG324 HGA2 0.1950 3 0.00 ! * , from CG3RC1 CG321 CG321 HGA2, penalty= 1
CG324 CG321 CG3RC1 CG2RC0 0.2000 3 0.00 ! * , from CG321 CG321 CG3RC1 CG3C52, penalty= 91
CG324 CG321 CG3RC1 CG311 0.2000 3 0.00 ! * , from CG321 CG321 CG3RC1 CG331, penalty= 18.5
CG324 CG321 CG3RC1 CG3RC1 0.1500 3 0.00 ! * , from CG321 CG321 CG3RC1 CG3RC1, penalty= 17
HGA2 CG321 CG3RC1 CG2RC0 0.1950 1 0.00 ! * , from HGA2 CG321 CG3RC1 CG3C52, penalty= 74
HGA2 CG321 CG3RC1 CG311 0.1900 3 0.00 ! * , from HGA2 CG321 CG3RC1 CG331, penalty= 1.5
CG321 CG324 NG3P1 CG314 0.1000 3 0.00 ! * , from CG321 CG324 NG3P1 CG324, penalty= 0.6
HGA2 CG324 NG3P1 CG314 0.1000 3 0.00 ! * , from HGA2 CG324 NG3P1 CG324, penalty= 0.6
HGA3 CG334 NG3P1 CG314 0.1000 3 0.00 ! * , from HGA3 CG334 NG3P1 CG324, penalty= 0.6
CG2RC0 CG3RC1 CG3RC1 CG311 0.1500 3 0.00 ! * , from CG311 CG3RC1 CG3RC1 CG3C52, penalty= 74
CG2RC0 CG3RC1 CG3RC1 OG3C51 1.2000 3 0.00 ! * , from CG3C52 CG3RC1 CG3RC1 OG3C51, penalty= 74
CG2RC0 CG3RC1 CG3RC1 HGA1 0.1500 3 0.00 ! * , from NG2R51 CG3RC1 CG3RC1 HGA1, penalty= 52
CG311 CG3RC1 CG3RC1 OG3C51 1.2000 3 0.00 ! * , from CG3C52 CG3RC1 CG3RC1 OG3C51, penalty= 31
CG321 CG3RC1 CG3RC1 OG3C51 1.2000 3 0.00 ! * , from CG3C52 CG3RC1 CG3RC1 OG3C51, penalty= 31
CG311 CG3RC1 CG3RC1 CG2RC0 0.7300 3 0.00 ! * , from CG3C52 CG3C52 OG3C51 CG2R51, penalty= 52
CG3RC1 CG3RC1 OG3C51 CG2RC0 0.7300 3 0.00 ! * , from CG3C52 CG3C52 OG3C51 CG2R51, penalty= 62.1
HGA1 CG3RC1 OG3C51 CG2RC0 0.3000 3 0.00 ! * , from HGA2 CG3C52 OG3C51 CG2RC0, penalty= 20

IMPROPERS

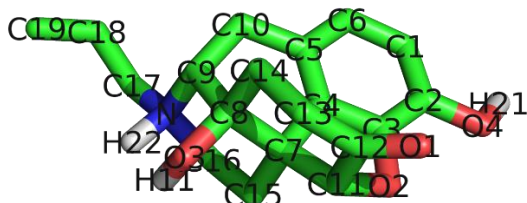
A.5.3 Naloxona

* Topologies generated by
 * CHARMM General Force Field (CGenFF) program version 1.0.0
 *

36 1

! "penalty" is the highest penalty score of the associated parameters.
 ! Penalties lower than 10 indicate the analogy is fair; penalties between 10
 ! and 50 mean some basic validation is recommended; penalties higher than
 ! 50 indicate poor analogy and mandate extensive validation/optimization.

| RESI N | | 1.000 | | |
|----------|--------|--------|---|------------|
| GROUP | ! | CHARGE | ! | CH_PENALTY |
| ATOM C1 | CG2R61 | -0.147 | ! | 0.000 |
| ATOM C2 | CG2R61 | 0.018 | ! | 3.646 |
| ATOM C3 | CG2RC0 | 0.161 | ! | 38.158 |
| ATOM C4 | CG2RC0 | 0.079 | ! | 67.997 |
| ATOM C5 | CG2R61 | -0.189 | ! | 36.336 |
| ATOM C6 | CG2R61 | -0.219 | ! | 5.398 |
| ATOM C7 | CG3RC1 | 0.072 | ! | 50.568 |
| ATOM C8 | CG301 | 0.188 | ! | 35.748 |
| ATOM C9 | CG314 | 0.187 | ! | 47.999 |
| ATOM C10 | CG321 | -0.135 | ! | 43.131 |
| ATOM C11 | CG3RC1 | 0.115 | ! | 48.044 |
| ATOM C12 | CG2O5 | 0.438 | ! | 42.830 |
| ATOM C13 | CG321 | -0.158 | ! | 8.002 |
| ATOM C14 | CG321 | -0.168 | ! | 13.559 |
| ATOM O1 | OG2D3 | -0.483 | ! | 17.243 |
| ATOM O2 | OG3C51 | -0.252 | ! | 33.933 |
| ATOM O3 | OG311 | -0.618 | ! | 16.116 |
| ATOM C15 | CG321 | -0.176 | ! | 30.080 |
| ATOM C16 | CG324 | 0.142 | ! | 14.875 |
| ATOM N | NG3P1 | -0.373 | ! | 31.237 |
| ATOM C17 | CG324 | 0.213 | ! | 57.908 |
| ATOM C18 | CG2D1 | -0.139 | ! | 56.957 |
| ATOM C19 | CG2D2 | -0.420 | ! | 4.574 |
| ATOM O4 | OG311 | -0.530 | ! | 3.568 |
| ATOM H1 | HGR61 | 0.196 | ! | 0.000 |
| ATOM H2 | HGR61 | 0.196 | ! | 0.000 |
| ATOM H3 | HGA1 | 0.090 | ! | 3.008 |
| ATOM H4 | HGA2 | 0.090 | ! | 0.121 |
| ATOM H5 | HGA2 | 0.090 | ! | 0.121 |
| ATOM H6 | HGA1 | 0.090 | ! | 4.335 |
| ATOM H7 | HGA2 | 0.090 | ! | 0.690 |
| ATOM H8 | HGA2 | 0.090 | ! | 0.690 |
| ATOM H9 | HGA2 | 0.090 | ! | 0.905 |
| ATOM H10 | HGA2 | 0.090 | ! | 0.905 |
| ATOM H11 | HGP1 | 0.432 | ! | 7.417 |
| ATOM H12 | HGA2 | 0.090 | ! | 2.504 |
| ATOM H13 | HGA2 | 0.090 | ! | 2.504 |
| ATOM H14 | HGA2 | 0.090 | ! | 0.691 |
| ATOM H15 | HGA2 | 0.090 | ! | 0.691 |
| ATOM H16 | HGA2 | 0.090 | ! | 3.688 |
| ATOM H17 | HGA2 | 0.090 | ! | 3.688 |
| ATOM H18 | HGA4 | 0.150 | ! | 4.413 |
| ATOM H19 | HGA5 | 0.210 | ! | 0.850 |
| ATOM H20 | HGA5 | 0.210 | ! | 0.850 |
| ATOM H21 | HGP1 | 0.420 | ! | 0.075 |
| ATOM H22 | HGP2 | 0.320 | ! | 1.189 |



| | |
|----------|-----|
| BOND H19 | C19 |
| BOND H20 | C19 |
| BOND C19 | C18 |
| BOND C18 | H18 |
| BOND C18 | C17 |
| BOND H11 | O3 |
| BOND H3 | C9 |
| BOND H10 | C14 |
| BOND H22 | N |
| BOND H17 | C17 |
| BOND O3 | C8 |
| BOND C17 | N |
| BOND C17 | H16 |
| BOND C9 | N |
| BOND C9 | C8 |
| BOND C9 | C10 |
| BOND N | C16 |
| BOND H7 | C13 |
| BOND C14 | C8 |
| BOND C14 | C13 |
| BOND C14 | H9 |
| BOND C8 | C7 |
| BOND H5 | C10 |
| BOND H8 | C13 |
| BOND C13 | C12 |
| BOND H4 | C10 |
| BOND C10 | C5 |
| BOND H14 | C16 |
| BOND H12 | C15 |
| BOND C16 | C15 |
| BOND C16 | H15 |
| BOND C7 | C15 |
| BOND C7 | C11 |
| BOND C7 | C4 |

BOND C15 H13
 BOND C12 C11
 BOND C12 O1
 BOND C5 C4
 BOND C5 C6
 BOND H6 C11
 BOND C11 O2
 BOND C4 C3
 BOND H2 C6
 BOND C6 C1
 BOND C3 O2
 BOND C3 C2
 BOND C1 C2
 BOND C1 H1
 BOND C2 O4
 BOND H21 O4
 IMPR C12 C13 C11 O1

BONDS

CG2D1 CG324 365.00 1.5020 ! n , from CG2D1 CG321, penalty= 1
 CG2O5 CG3RC1 330.00 1.5000 ! n , from CG2O5 CG321, penalty= 75
 CG2RC0 CG3RC1 305.00 1.5200 ! n , from CG2RC0 CG3C52, penalty= 20
 CG301 CG314 222.50 1.5000 ! n , from CG301 CG311, penalty= 1
 CG301 CG3RC1 222.50 1.5240 ! n , from CG311 CG3RC1, penalty= 8
 CG314 NG3P1 200.00 1.4800 ! n , from CG324 NG3P1, penalty= 4

ANGLES

CG2D2 CG2D1 CG324 48.00 126.00 ! n , from CG2D2 CG2D1 CG321, penalty= 17
 CG324 CG2D1 HGA4 40.00 116.00 ! n , from CG321 CG2D1 HGA4, penalty= 17
 CG321 CG2O5 CG3RC1 35.00 115.60 ! n , from CG321 CG2O5 CG321, penalty= 13.8
 CG3RC1 CG2O5 OG2D3 75.00 122.20 ! n , from CG321 CG2O5 OG2D3, penalty= 13.8
 CG2RC0 CG2R61 CG321 45.80 120.00 ! n , from CG2R61 CG2R61 CG321, penalty= 1.5
 CG2RC0 CG2R61 OG311 45.20 120.00 ! n , from CG2R61 CG2R61 OG311, penalty= 1.5
 CG2R61 CG2RC0 CG3RC1 60.00 130.00 ! n , from CG2R61 CG2RC0 CG3C52, penalty= 1.1
 CG2RC0 CG2RC0 CG3RC1 110.00 110.00 ! n , from CG2RC0 CG2RC0 CG3C52, penalty= 1.1
 CG314 CG301 CG321 53.35 111.00 8.00 2.56100 ! n , from CG314 CG311 CG321, penalty= 8
 CG314 CG301 CG3RC1 53.35 111.00 8.00 2.56100 ! n , from CG314 CG311 CG321, penalty= 21.8
 CG314 CG301 OG311 75.70 112.10 ! n , from CG324 CG311 OG311, penalty= 8.6
 CG321 CG301 CG3RC1 53.35 103.70 8.00 2.56100 ! n , from CG321 CG311 CG3RC1, penalty= 8
 CG321 CG301 OG311 75.70 110.10 ! n , from CG331 CG301 OG311, penalty= 0.9
 CG3RC1 CG301 OG311 75.70 110.10 ! n , from CG3RC1 CG311 OG311, penalty= 8
 CG301 CG314 CG321 58.35 113.50 11.16 2.56100 ! n , from CG301 CG311 CG321, penalty= 1
 CG301 CG314 NG3P1 40.00 110.00 ! n , from CG321 CG314 NG3P2, penalty= 2.4
 CG301 CG314 HGA1 34.60 110.10 22.53 2.17900 ! n , from CG301 CG311 HGA1, penalty= 1
 CG321 CG314 NG3P1 40.00 110.00 ! n , from CG321 CG314 NG3P2, penalty= 0.6
 NG3P1 CG314 HGA1 45.00 102.30 35.00 2.10100 ! n , from NG3P2 CG314 HGA1, penalty= 0.6
 CG324 CG321 CG3RC1 58.35 110.50 11.16 2.56100 ! n , from CG321 CG321 CG324, penalty= 13.8
 CG2D1 CG324 NG3P1 45.00 102.30 35.00 2.10100 ! n , from CG2R61 CG324 NG3P1, penalty= 21
 CG2D1 CG324 HGA2 45.00 111.50 ! n , from CG2D1 CG321 HGA2, penalty= 1
 CG2O5 CG3RC1 CG3RC1 70.00 113.70 ! n , from CG3RC1 CG3RC1 NG2R61, penalty= 48
 CG2O5 CG3RC1 OG3C51 110.00 108.00 ! n , from NG2R61 CG3C51 OG3C51, penalty= 64
 CG2O5 CG3RC1 HGA1 50.00 112.00 ! n , from CG2O1 CG3C51 HGA1, penalty= 19
 CG2RC0 CG3RC1 CG301 62.00 103.00 ! n , from CG2R51 CG3C54 NG3P2, penalty= 70.5
 CG2RC0 CG3RC1 CG321 62.00 103.00 ! n , from CG2R51 CG3C54 NG3P2, penalty= 70.5
 CG2RC0 CG3RC1 CG3RC1 70.00 113.70 ! n , from CG3RC1 CG3RC1 NG2R51, penalty= 52
 CG301 CG3RC1 CG321 58.35 113.50 11.16 2.56100 ! n , from CG311 CG3RC1 CG331, penalty= 2.1
 CG301 CG3RC1 CG3RC1 53.35 108.00 8.00 2.56100 ! n , from CG311 CG3RC1 CG3RC1, penalty= 1.2
 CG314 NG3P1 CG324 45.00 115.20 ! n , from CG324 NG3P1 CG324, penalty= 0.6
 CG314 NG3P1 HGP2 30.00 110.80 27.00 2.07400 ! n , from CG324 NG3P1 HGP2, penalty= 0.6
 CG2RC0 OG3C51 CG3RC1 76.00 108.05 ! n , from CG2RC0 OG3C51 CG3C52, penalty= 1.1

DIHEDRALS

CG324 CG2D1 CG2D2 HGA5 5.2000 2 180.00 ! n , from CG321 CG2D1 CG2D2 HGA5, penalty= 17
 CG2D2 CG2D1 CG324 NG3P1 1.9000 1 180.00 ! n , from CG2D2 CG2D1 CG321 OG311, penalty= 45
 CG2D2 CG2D1 CG324 NG3P1 0.4000 2 180.00 ! n , from CG2D2 CG2D1 CG321 OG311, penalty= 45
 CG2D2 CG2D1 CG324 NG3P1 0.6000 3 180.00 ! n , from CG2D2 CG2D1 CG321 OG311, penalty= 45
 CG2D2 CG2D1 CG324 HGA2 0.1200 3 0.00 ! n , from CG2D2 CG2D1 CG321 HGA2, penalty= 1
 HGA4 CG2D1 CG324 NG3P1 0.2000 3 0.00 ! n , from HGA4 CG2D1 CG321 OG311, penalty= 45
 HGA4 CG2D1 CG324 HGA2 0.0000 3 0.00 ! n , from HGA4 CG2D1 CG321 HGA2, penalty= 1
 CG3RC1 CG2O5 CG321 CG321 0.7500 1 0.00 ! n , from CG321 CG2O5 CG321 CG321, penalty= 13.8
 CG3RC1 CG2O5 CG321 CG321 0.1800 2 180.00 ! n , from CG321 CG2O5 CG321 CG321, penalty= 13.8
 CG3RC1 CG2O5 CG321 CG321 0.0650 3 0.00 ! n , from CG321 CG2O5 CG321 CG321, penalty= 13.8
 CG3RC1 CG2O5 CG321 CG321 0.0300 6 0.00 ! n , from CG321 CG2O5 CG321 CG321, penalty= 13.8
 CG3RC1 CG2O5 CG321 HGA2 0.1000 3 0.00 ! n , from CG321 CG2O5 CG321 HGA2, penalty= 13.8
 CG321 CG2O5 CG3RC1 CG3RC1 0.7500 1 0.00 ! n , from CG321 CG2O5 CG321 CG321, penalty= 148.8
 CG321 CG2O5 CG3RC1 CG3RC1 0.1800 2 180.00 ! n , from CG321 CG2O5 CG321 CG321, penalty= 148.8
 CG321 CG2O5 CG3RC1 CG3RC1 0.0650 3 0.00 ! n , from CG321 CG2O5 CG321 CG321, penalty= 148.8
 CG321 CG2O5 CG3RC1 CG3RC1 0.0300 6 0.00 ! n , from CG321 CG2O5 CG321 CG321, penalty= 148.8
 CG321 CG2O5 CG3RC1 OG3C51 0.7500 1 0.00 ! n , from CG321 CG2O5 CG321 CG321, penalty= 140
 CG321 CG2O5 CG3RC1 OG3C51 0.1800 2 180.00 ! n , from CG321 CG2O5 CG321 CG321, penalty= 140
 CG321 CG2O5 CG3RC1 OG3C51 0.0650 3 0.00 ! n , from CG321 CG2O5 CG321 CG321, penalty= 140
 CG321 CG2O5 CG3RC1 OG3C51 0.0300 6 0.00 ! n , from CG321 CG2O5 CG321 CG321, penalty= 140
 CG321 CG2O5 CG3RC1 HGA1 0.1000 3 0.00 ! n , from CG321 CG2O5 CG321 HGA2, penalty= 75
 OG2D3 CG2O5 CG3RC1 CG3RC1 0.7500 1 180.00 ! n , from OG2D3 CG2O5 CG321 CG321, penalty= 148.8
 OG2D3 CG2O5 CG3RC1 CG3RC1 0.1800 2 180.00 ! n , from OG2D3 CG2O5 CG321 CG321, penalty= 148.8
 OG2D3 CG2O5 CG3RC1 CG3RC1 0.0650 3 180.00 ! n , from OG2D3 CG2O5 CG321 CG321, penalty= 148.8
 OG2D3 CG2O5 CG3RC1 CG3RC1 0.0300 6 0.00 ! n , from OG2D3 CG2O5 CG321 CG321, penalty= 148.8
 OG2D3 CG2O5 CG3RC1 OG3C51 0.0000 2 0.00 ! n , from OG2D3 CG2O5 CG311 OG311, penalty= 114
 OG2D3 CG2O5 CG3RC1 HGA1 0.0000 3 0.00 ! n , from OG2D3 CG2O5 CG321 HGA2, penalty= 75
 CG2R61 CG2R61 CG2RC0 CG3RC1 0.0000 2 180.00 ! n , from CG2R61 CG2R61 CG2RC0 CG3C52, penalty= 1.1
 CG321 CG2R61 CG2RC0 CG2RC0 3.1000 2 180.00 ! n , from CG2R61 CG2R61 CG2R61 CG321, penalty= 61.5
 CG321 CG2R61 CG2RC0 CG3RC1 2.4000 2 180.00 ! n , from CG331 CG2R61 CG2R61 CG331, penalty= 55.6
 CG311 CG2R61 CG2RC0 CG2RC0 3.1000 2 180.00 ! n , from CG2R61 CG2R61 CG2R61 OG311, penalty= 61.5
 OG311 CG2R61 CG2RC0 OG3C51 2.5800 2 180.00 ! n , from NG311 CG2R61 CG2R61 OG3R60, penalty= 75.1
 CG2RC0 CG2R61 CG321 CG314 0.2300 2 180.00 ! n , from CG2R61 CG2R61 CG321 CG314, penalty= 1.5

| | | | | | | | | | |
|--------|--------|--------|--------|--------|---|--------|---|---|---|
| CG2RC0 | CG2R61 | CG321 | HGA2 | 0.0020 | 6 | 0.00 | ! | n | , from CG2R61 CG2R61 CG321 HGA2, penalty= 1.5 |
| CG2RC0 | CG2R61 | OG311 | HGP1 | 0.9900 | 2 | 180.00 | ! | n | , from CG2R61 CG2R61 OG311 HGP1, penalty= 1.5 |
| CG2R61 | CG2RC0 | CG2RC0 | CG3RC1 | 6.5000 | 2 | 180.00 | ! | n | , from CG2R61 CG2RC0 CG2RC0 CG3C52, penalty= 1.1 |
| CG3RC1 | CG2RC0 | CG2RC0 | OG3C51 | 6.0000 | 2 | 180.00 | ! | n | , from CG3C52 CG2RC0 CG2RC0 NG3C51, penalty= 37.1 |
| CG2R61 | CG2RC0 | CG3RC1 | CG301 | 3.0000 | 2 | 180.00 | ! | n | , from CG2R61 CG2RC0 CG3C52 CG3C52, penalty= 51 |
| CG2R61 | CG2RC0 | CG3RC1 | CG321 | 3.0000 | 2 | 180.00 | ! | n | , from CG2R61 CG2RC0 CG3C52 CG3C52, penalty= 51 |
| CG2R61 | CG2RC0 | CG3RC1 | CG3RC1 | 3.0000 | 2 | 180.00 | ! | n | , from CG2R61 CG2RC0 CG3C52 CG3C52, penalty= 61.1 |
| CG2RC0 | CG2RC0 | CG3RC1 | CG301 | 1.0300 | 3 | 180.00 | ! | n | , from CG2RC0 CG2RC0 CG3C52 CG3C52, penalty= 51 |
| CG2RC0 | CG2RC0 | CG3RC1 | CG321 | 1.0300 | 3 | 180.00 | ! | n | , from CG2RC0 CG2RC0 CG3C52 CG3C52, penalty= 51 |
| CG2RC0 | CG2RC0 | CG3RC1 | CG3RC1 | 1.0300 | 3 | 180.00 | ! | n | , from CG2RC0 CG2RC0 CG3C52 CG3C52, penalty= 61.1 |
| CG2R61 | CG2RC0 | OG3C51 | CG3RC1 | 0.3000 | 2 | 180.00 | ! | n | , from CG2R61 CG2RC0 OG3C51 CG3C52, penalty= 1.1 |
| CG2RC0 | CG2RC0 | OG3C51 | CG3RC1 | 0.3000 | 2 | 180.00 | ! | n | , from CG2RC0 CG2RC0 OG3C51 CG3C52, penalty= 1.1 |
| CG321 | CG301 | CG314 | CG321 | 0.2000 | 3 | 0.00 | ! | n | , from CG321 CG301 CG311 CG321, penalty= 1 |
| CG321 | CG301 | CG314 | NG3P1 | 0.2000 | 3 | 0.00 | ! | n | , from CG321 CG311 CG314 NG3P3, penalty= 9.5 |
| CG321 | CG301 | CG314 | HGA1 | 0.1950 | 3 | 0.00 | ! | n | , from CG321 CG301 CG311 HGA1, penalty= 1 |
| CG3RC1 | CG301 | CG314 | CG321 | 0.1500 | 3 | 0.00 | ! | n | , from CG321 CG311 CG311 CG3RC1, penalty= 9 |
| CG3RC1 | CG301 | CG314 | NG3P1 | 0.2000 | 3 | 0.00 | ! | n | , from CG321 CG311 CG314 NG3P3, penalty= 23.3 |
| CG3RC1 | CG301 | CG314 | HGA1 | 0.1500 | 3 | 0.00 | ! | n | , from CG3RC1 CG311 CG311 HGA1, penalty= 9 |
| OG311 | CG301 | CG314 | CG321 | 0.1400 | 3 | 0.00 | ! | n | , from CG311 CG311 CG311 OG311, penalty= 9.6 |
| OG311 | CG301 | CG314 | NG3P1 | 0.1950 | 3 | 0.00 | ! | n | , from OG311 CG311 CG324 NG3P1, penalty= 12 |
| OG311 | CG301 | CG314 | HGA1 | 0.1950 | 3 | 0.00 | ! | n | , from OG311 CG311 CG311 HGA1, penalty= 9 |
| CG314 | CG301 | CG321 | CG321 | 0.1950 | 3 | 0.00 | ! | n | , from CG324 CG311 CG321 CG321, penalty= 8.6 |
| CG314 | CG301 | CG321 | HGA2 | 0.1950 | 3 | 0.00 | ! | n | , from CG314 CG311 CG321 HGA2, penalty= 8 |
| CG3RC1 | CG301 | CG321 | CG321 | 0.1500 | 3 | 0.00 | ! | n | , from CG3RC1 CG311 CG321 CG321, penalty= 8 |
| CG3RC1 | CG301 | CG321 | HGA2 | 0.1500 | 3 | 0.00 | ! | n | , from CG3RC1 CG311 CG321 HGA2, penalty= 8 |
| OG311 | CG301 | CG321 | CG321 | 0.8000 | 3 | 0.00 | ! | n | , from OG301 CG301 CG321 CG331, penalty= 5.9 |
| OG311 | CG301 | CG321 | HGA2 | 0.1600 | 3 | 0.00 | ! | n | , from OG301 CG301 CG321 HGA2, penalty= 5 |
| CG314 | CG301 | CG3RC1 | CG2RC0 | 0.5000 | 4 | 180.00 | ! | n | , from CG321 CG311 CG3RC1 CG3C52, penalty= 99 |
| CG314 | CG301 | CG3RC1 | CG321 | 0.0500 | 3 | 0.00 | ! | n | , from CG321 CG311 CG3RC1 CG331, penalty= 25.9 |
| CG314 | CG301 | CG3RC1 | CG3RC1 | 0.1500 | 3 | 0.00 | ! | n | , from CG321 CG311 CG3RC1 CG3RC1, penalty= 25 |
| CG321 | CG301 | CG3RC1 | CG2RC0 | 0.5000 | 4 | 180.00 | ! | n | , from CG321 CG311 CG3RC1 CG3C52, penalty= 82 |
| CG321 | CG301 | CG3RC1 | CG321 | 0.0500 | 3 | 0.00 | ! | n | , from CG321 CG311 CG3RC1 CG331, penalty= 8.9 |
| CG321 | CG301 | CG3RC1 | CG3RC1 | 0.1500 | 3 | 0.00 | ! | n | , from CG321 CG311 CG3RC1 CG3RC1, penalty= 8 |
| OG311 | CG301 | CG3RC1 | CG2RC0 | 0.1580 | 3 | 0.00 | ! | n | , from OG311 CG311 CG3RC1 CG3C51, penalty= 82.4 |
| OG311 | CG301 | CG3RC1 | CG321 | 0.1580 | 3 | 0.00 | ! | n | , from OG311 CG311 CG3RC1 CG331, penalty= 8.9 |
| OG311 | CG301 | CG3RC1 | CG3RC1 | 0.4500 | 2 | 0.00 | ! | n | , from OG311 CG311 CG3RC1 CG3RC1, penalty= 8 |
| CG314 | CG301 | OG311 | HGP1 | 0.5000 | 1 | 0.00 | ! | n | , from CG324 CG311 OG311 HGP1, penalty= 8.6 |
| CG314 | CG301 | OG311 | HGP1 | 0.7000 | 2 | 0.00 | ! | n | , from CG324 CG311 OG311 HGP1, penalty= 8.6 |
| CG321 | CG301 | OG311 | HGP1 | 1.1300 | 1 | 0.00 | ! | n | , from CG331 CG301 OG311 HGP1, penalty= 0.9 |
| CG321 | CG301 | OG311 | HGP1 | 0.1400 | 2 | 0.00 | ! | n | , from CG331 CG301 OG311 HGP1, penalty= 0.9 |
| CG321 | CG301 | OG311 | HGP1 | 0.2400 | 3 | 0.00 | ! | n | , from CG331 CG301 OG311 HGP1, penalty= 0.9 |
| CG3RC1 | CG301 | OG311 | HGP1 | 1.5000 | 1 | 0.00 | ! | n | , from CG3RC1 CG311 OG311 HGP1, penalty= 8 |
| CG3RC1 | CG301 | OG311 | HGP1 | 0.3000 | 2 | 180.00 | ! | n | , from CG3RC1 CG311 OG311 HGP1, penalty= 8 |
| CG3RC1 | CG301 | OG311 | HGP1 | 0.5000 | 3 | 0.00 | ! | n | , from CG3RC1 CG311 OG311 HGP1, penalty= 8 |
| CG301 | CG314 | CG321 | CG2R61 | 0.0400 | 3 | 0.00 | ! | n | , from CG331 CG311 CG321 CG2R61, penalty= 3.7 |
| CG301 | CG314 | CG321 | HGA2 | 0.1950 | 3 | 0.00 | ! | n | , from CG301 CG311 CG321 HGA2, penalty= 1 |
| NG3P1 | CG314 | CG321 | CG2R61 | 0.2000 | 3 | 0.00 | ! | n | , from NG3P3 CG314 CG321 CG2R61, penalty= 1.5 |
| NG3P1 | CG314 | CG321 | HGA2 | 0.1950 | 3 | 0.00 | ! | n | , from NG3P2 CG314 CG321 HGA2, penalty= 0.6 |
| CG301 | CG314 | NG3P1 | CG324 | 0.1000 | 3 | 0.00 | ! | n | , from CG311 CG324 NG3P1 CG324, penalty= 5.2 |
| CG301 | CG314 | NG3P1 | HGP2 | 0.1000 | 3 | 0.00 | ! | n | , from CG311 CG324 NG3P1 HGP2, penalty= 5.2 |
| CG321 | CG314 | NG3P1 | CG324 | 0.1000 | 3 | 0.00 | ! | n | , from CG321 CG324 NG3P1 CG324, penalty= 4 |
| CG321 | CG314 | NG3P1 | HGP2 | 0.1000 | 3 | 0.00 | ! | n | , from CG321 CG324 NG3P1 HGP2, penalty= 4 |
| HGA1 | CG314 | NG3P1 | CG324 | 0.1000 | 3 | 0.00 | ! | n | , from HGA2 CG324 NG3P1 CG324, penalty= 4 |
| HGA1 | CG314 | NG3P1 | HGP2 | 0.1000 | 3 | 0.00 | ! | n | , from HGA2 CG324 NG3P1 HGP2, penalty= 4 |
| CG205 | CG321 | CG321 | CG301 | 0.2100 | 1 | 180.00 | ! | n | , from CG205 CG321 CG321 CG321, penalty= 1.8 |
| CG205 | CG321 | CG321 | CG301 | 0.3900 | 2 | 0.00 | ! | n | , from CG205 CG321 CG321 CG321, penalty= 1.8 |
| CG205 | CG321 | CG321 | CG301 | 0.3500 | 3 | 180.00 | ! | n | , from CG205 CG321 CG321 CG321, penalty= 1.8 |
| CG205 | CG321 | CG321 | CG301 | 0.1100 | 4 | 0.00 | ! | n | , from CG205 CG321 CG321 CG321, penalty= 1.8 |
| CG205 | CG321 | CG321 | CG301 | 0.0900 | 6 | 180.00 | ! | n | , from CG205 CG321 CG321 CG321, penalty= 1.8 |
| CG3RC1 | CG321 | CG324 | NG3P1 | 1.0000 | 3 | 0.00 | ! | n | , from CG321 CG321 CG324 NG3P1, penalty= 13.8 |
| CG3RC1 | CG321 | CG324 | HGA2 | 0.1950 | 3 | 0.00 | ! | n | , from CG3RC1 CG321 CG321 HGA2, penalty= 1 |
| CG324 | CG321 | CG3RC1 | CG2RC0 | 0.2000 | 3 | 0.00 | ! | n | , from CG321 CG321 CG3RC1 CG3C52, penalty= 91 |
| CG324 | CG321 | CG3RC1 | CG301 | 0.2000 | 3 | 0.00 | ! | n | , from CG321 CG321 CG3RC1 CG331, penalty= 19.7 |
| CG324 | CG321 | CG3RC1 | CG3RC1 | 0.1500 | 3 | 0.00 | ! | n | , from CG321 CG321 CG3RC1 CG3RC1, penalty= 17 |
| HGA2 | CG321 | CG3RC1 | CG2RC0 | 0.1950 | 1 | 0.00 | ! | n | , from HGA2 CG321 CG3RC1 CG3C52, penalty= 74 |
| HGA2 | CG321 | CG3RC1 | CG301 | 0.1900 | 3 | 0.00 | ! | n | , from HGA2 CG321 CG3RC1 CG331, penalty= 2.7 |
| CG2D1 | CG324 | NG3P1 | CG314 | 1.7000 | 1 | 180.00 | ! | n | , from CG2R61 CG324 NG3P1 CG324, penalty= 21.6 |
| CG2D1 | CG324 | NG3P1 | CG314 | 0.8000 | 2 | 180.00 | ! | n | , from CG2R61 CG324 NG3P1 CG324, penalty= 21.6 |
| CG2D1 | CG324 | NG3P1 | CG314 | 0.5800 | 3 | 0.00 | ! | n | , from CG2R61 CG324 NG3P1 CG324, penalty= 21.6 |
| CG2D1 | CG324 | NG3P1 | CG324 | 1.7000 | 1 | 180.00 | ! | n | , from CG2R61 CG324 NG3P1 CG324, penalty= 21 |
| CG2D1 | CG324 | NG3P1 | CG324 | 0.8000 | 2 | 180.00 | ! | n | , from CG2R61 CG324 NG3P1 CG324, penalty= 21 |
| CG2D1 | CG324 | NG3P1 | CG324 | 0.5800 | 3 | 0.00 | ! | n | , from CG2R61 CG324 NG3P1 CG324, penalty= 21 |
| CG2D1 | CG324 | NG3P1 | HGP2 | 0.0400 | 3 | 0.00 | ! | n | , from CG2R61 CG324 NG3P1 HGP2, penalty= 21 |
| CG321 | CG324 | NG3P1 | CG314 | 0.1000 | 3 | 0.00 | ! | n | , from CG321 CG324 NG3P1 CG324, penalty= 0.6 |
| HGA2 | CG324 | NG3P1 | CG314 | 0.1000 | 3 | 0.00 | ! | n | , from HGA2 CG324 NG3P1 CG324, penalty= 0.6 |
| CG205 | CG3RC1 | CG3RC1 | CG2RC0 | 0.1500 | 3 | 0.00 | ! | n | , from CG3C52 CG3RC1 CG3RC1 NG2R61, penalty= 122 |
| CG205 | CG3RC1 | CG3RC1 | CG301 | 4.0000 | 3 | 0.00 | ! | n | , from CG311 CG3RC1 CG3RC1 CG321, penalty= 72.2 |
| CG205 | CG3RC1 | CG3RC1 | CG321 | 0.1500 | 3 | 0.00 | ! | n | , from CG321 CG3RC1 CG3RC1 CG321, penalty= 71 |
| CG2RC0 | CG3RC1 | CG3RC1 | OG3C51 | 1.2000 | 3 | 0.00 | ! | n | , from CG3C52 CG3RC1 CG3RC1 OG3C51, penalty= 74 |
| CG2RC0 | CG3RC1 | CG3RC1 | HGA1 | 0.1500 | 3 | 0.00 | ! | n | , from NG2R51 CG3RC1 CG3RC1 HGA1, penalty= 52 |
| CG301 | CG3RC1 | CG3RC1 | OG3C51 | 1.2000 | 3 | 0.00 | ! | n | , from CG3C52 CG3RC1 CG3RC1 OG3C51, penalty= 31 |
| CG301 | CG3RC1 | CG3RC1 | HGA1 | 0.1500 | 3 | 0.00 | ! | n | , from CG311 CG3RC1 CG3RC1 HGA1, penalty= 1.2 |
| CG321 | CG3RC1 | CG3RC1 | OG3C51 | 1.2000 | 3 | 0.00 | ! | n | , from CG3C52 CG3RC1 CG3RC1 OG3C51, penalty= 31 |
| CG205 | CG3RC1 | OG3C51 | CG2RC0 | 0.3100 | 1 | 180.00 | ! | n | , from CG2R51 CG3C52 OG3C51 CG2R53, penalty= 70.5 |
| CG205 | CG3RC1 | OG3C51 | CG2RC0 | 0.2800 | 6 | 0.00 | ! | n | , from CG2R51 CG3C52 OG3C51 CG2R53, penalty= 70.5 |
| CG3RC1 | CG3RC1 | OG3C51 | CG2RC0 | 0.7300 | 3 | 0.00 | ! | n | , from CG3C52 CG3C52 OG3C51 CG2R51, penalty= 62.1 |
| HGA1 | CG3RC1 | OG3C51 | CG2RC0 | 0.3000 | 3 | 0.00 | ! | n | , from HGA2 CG3C52 OG3C51 CG2RC0, penalty= 20 |

IMPROPERS

| | | | | | | | | | |
|-------|-------|--------|-------|---------|---|------|---|---|--|
| CG205 | CG321 | CG3RC1 | OG2D3 | 70.0000 | 0 | 0.00 | ! | n | , from CG205 CG321 CG321 OG2D3, penalty= 7.5 |
|-------|-------|--------|-------|---------|---|------|---|---|--|

A.5.4 DAMGO

* Topologies generated by

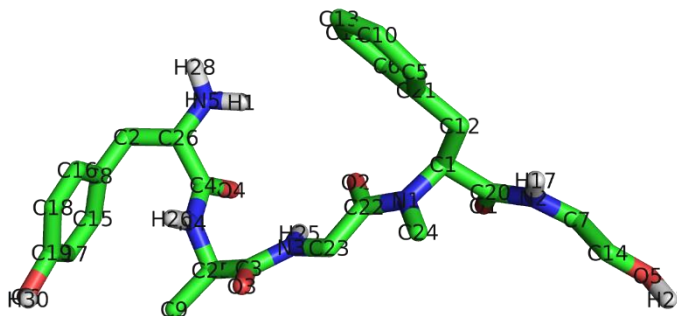
* CHARMM General Force Field (CGenFF) program version 1.0.0

*
36 1

! "penalty" is the highest penalty score of the associated parameters.
! Penalties lower than 10 indicate the analogy is fair; penalties between 10
! and 50 mean some basic validation is recommended; penalties higher than
! 50 indicate poor analogy and mandate extensive validation/optimization.

| RESI | RES | 1.000 ! | |
|----------|--------|----------|------------|
| GROUP | | ! CHARGE | CH PENALTY |
| ATOM H01 | HGP2 | 0.330 ! | 2.339 |
| ATOM H02 | HGA2 | 0.090 ! | 0.050 |
| ATOM H03 | HGA2 | 0.090 ! | 0.000 |
| ATOM O1 | OG2D1 | -0.509 ! | 0.414 |
| ATOM C1 | CG311 | 0.047 ! | 10.296 |
| ATOM N1 | NG2S0 | -0.270 ! | 10.823 |
| ATOM C10 | CG321 | -0.184 ! | 43.258 |
| ATOM H0 | HGA2 | 0.090 ! | 2.500 |
| ATOM H1 | HGA2 | 0.090 ! | 2.500 |
| ATOM H11 | HGA1 | 0.090 ! | 0.945 |
| ATOM C11 | CG2O1 | 0.584 ! | 2.497 |
| ATOM C12 | CG2O1 | 0.397 ! | 56.827 |
| ATOM C13 | CG2R61 | -0.118 ! | 0.000 |
| ATOM H2 | HGR61 | 0.115 ! | 0.000 |
| ATOM C14 | CG2R61 | -0.118 ! | 0.000 |
| ATOM H3 | HGR61 | 0.115 ! | 0.000 |
| ATOM C15 | CG321 | -0.037 ! | 0.303 |
| ATOM H4 | HGA2 | 0.090 ! | 0.000 |
| ATOM H5 | HGA2 | 0.090 ! | 0.000 |
| ATOM C16 | CG2R61 | -0.006 ! | 6.785 |
| ATOM C17 | CG331 | -0.269 ! | 0.000 |
| ATOM H6 | HGA3 | 0.090 ! | 0.000 |
| ATOM H7 | HGA3 | 0.090 ! | 0.000 |
| ATOM H8 | HGA3 | 0.090 ! | 0.000 |
| ATOM C18 | CG2R61 | -0.108 ! | 0.000 |
| ATOM H18 | HGR61 | 0.115 ! | 0.000 |
| ATOM C19 | CG2R61 | -0.108 ! | 0.000 |
| ATOM H9 | HGR61 | 0.115 ! | 0.000 |
| ATOM N2 | NG2S1 | -0.523 ! | 1.972 |
| ATOM C2 | CG321 | -0.179 ! | 4.091 |
| ATOM O2 | OG2D1 | -0.532 ! | 0.474 |
| ATOM C20 | CG2R61 | -0.115 ! | 0.000 |
| ATOM H96 | HGR61 | 0.115 ! | 0.000 |
| ATOM C21 | CG321 | 0.048 ! | 1.897 |
| ATOM H21 | HGP1 | 0.318 ! | 0.000 |
| ATOM H99 | HGA2 | 0.090 ! | 0.000 |
| ATOM H98 | HGA2 | 0.090 ! | 0.000 |
| ATOM H22 | HGA2 | 0.090 ! | 0.050 |
| ATOM C22 | CG2R61 | -0.115 ! | 5.376 |
| ATOM H97 | HGR61 | 0.115 ! | 0.000 |
| ATOM C23 | CG2R61 | -0.115 ! | 5.376 |
| ATOM H95 | HGR61 | 0.115 ! | 0.000 |
| ATOM C24 | CG2R61 | -0.110 ! | 0.000 |
| ATOM H94 | HGR61 | 0.115 ! | 0.000 |
| ATOM C25 | CG2R61 | -0.110 ! | 0.000 |
| ATOM H93 | HGR61 | 0.115 ! | 0.000 |
| ATOM C26 | CG2R61 | 0.108 ! | 0.000 |
| ATOM C3 | CG2O1 | 0.535 ! | 4.885 |
| ATOM N3 | NG2S1 | -0.469 ! | 2.531 |
| ATOM O3 | OG2D1 | -0.506 ! | 0.000 |
| ATOM H31 | HGP1 | 0.326 ! | 0.000 |
| ATOM C4 | CG2R61 | -0.003 ! | 0.355 |
| ATOM N4 | NG2S1 | -0.346 ! | 13.640 |
| ATOM O4 | OG2D1 | -0.477 ! | 5.225 |
| ATOM H41 | HGP1 | 0.300 ! | 7.085 |
| ATOM O5 | OG311 | -0.650 ! | 0.300 |
| ATOM C5 | CG2O1 | 0.400 ! | 8.152 |
| ATOM N5 | NG3P3 | -0.364 ! | 37.582 |
| ATOM H51 | HGP1 | 0.420 ! | 0.000 |
| ATOM H52 | HGP2 | 0.330 ! | 2.339 |
| ATOM H53 | HGP2 | 0.330 ! | 2.339 |
| ATOM C6 | CG321 | -0.001 ! | 3.813 |
| ATOM O6 | OG311 | -0.530 ! | 0.000 |
| ATOM H61 | HGP1 | 0.420 ! | 0.000 |
| ATOM H62 | HGA2 | 0.090 ! | 0.000 |
| ATOM C7 | CG331 | -0.087 ! | 3.627 |
| ATOM H71 | HGA3 | 0.090 ! | 0.075 |
| ATOM H72 | HGA3 | 0.090 ! | 0.075 |
| ATOM H73 | HGA3 | 0.090 ! | 0.075 |
| ATOM C8 | CG311 | 0.044 ! | 7.899 |
| ATOM H81 | HGA1 | 0.090 ! | 0.000 |
| ATOM C9 | CG314 | 0.277 ! | 68.688 |
| ATOM H91 | HGA1 | 0.090 ! | 4.449 |

BOND H9 C19
BOND H3 C14
BOND O2 C5
BOND H03 C6
BOND C19 C14
BOND C19 C20
BOND C14 C4
BOND H96 C20
BOND H02 C2
BOND C20 C18



BOND C5 C6
 BOND C5 N1
 BOND H31 N3
 BOND C6 N3
 BOND C6 H62
 BOND H11 C1
 BOND C4 C2
 BOND C4 C13
 BOND N3 C11
 BOND C2 C1
 BOND C2 H22
 BOND C18 C13
 BOND C18 H18
 BOND C1 N1
 BOND C1 C3
 BOND N1 C7
 BOND C13 H2
 BOND H21 N2
 BOND H7 C17
 BOND C11 C8
 BOND C11 O3
 BOND H81 C8
 BOND H99 C21
 BOND N2 C3
 BOND N2 C15
 BOND C17 C8
 BOND C17 H6
 BOND C17 H8
 BOND C8 N4
 BOND C3 O1
 BOND H51 O5
 BOND H73 C7
 BOND C7 H71
 BOND C7 H72
 BOND C21 O5
 BOND C21 C15
 BOND C21 H98
 BOND C15 H5
 BOND C15 H4
 BOND N4 H41
 BOND N4 C12
 BOND O4 C12
 BOND C12 C9
 BOND H01 N5
 BOND H94 C24
 BOND H61 O6
 BOND C9 N5
 BOND C9 H91
 BOND C9 C10
 BOND H53 N5
 BOND H97 C22
 BOND C24 C22
 BOND C24 C26
 BOND N5 H52
 BOND C22 C16
 BOND O6 C26
 BOND C26 C25
 BOND C16 C10
 BOND C16 C23
 BOND H0 C10
 BOND C10 H1
 BOND C25 C23
 BOND C25 H93
 BOND C23 H95
 IMPR C11 C8 N3 O3
 IMPR C12 C9 N4 O4
 IMPR C3 C1 N2 O1
 IMPR C5 C6 N1 O2

BONDS
 CG311 NG2S0 320.00 1.4300 ! mydock , from CG311 NG2S1, penalty= 10

ANGLES
 CG201 CG311 NG2S0 50.00 107.00 ! mydock , from CG201 CG311 NG2S1, penalty= 1
 CG321 CG311 NG2S0 70.00 113.50 ! mydock , from CG321 CG311 NG2S1, penalty= 1
 NG2S0 CG311 HGA1 48.00 108.00 ! mydock , from NG2S1 CG311 HGA1, penalty= 1
 CG201 NG2S0 CG311 42.00 119.50 ! mydock , from CG201 NG2S0 CG331, penalty= 1.5
 CG311 NG2S0 CG331 45.00 121.00 ! mydock , from CG331 NG2S0 CG331, penalty= 1.5

DIHEDRALS
 NG2S1 CG201 CG311 NG2S0 0.6000 1 0.00 ! mydock , from NG2S1 CG201 CG311 NG2S1, penalty= 1
 OG2D1 CG201 CG311 NG2S0 0.0000 1 0.00 ! mydock , from OG2D1 CG201 CG311 NG2S1, penalty= 1
 CG321 CG201 NG2S0 CG311 2.6000 2 180.00 ! mydock , from CG321 CG201 NG2S0 CG331, penalty= 1.5
 OG2D1 CG201 NG2S0 CG311 2.6000 2 180.00 ! mydock , from OG2D1 CG201 NG2S0 CG331, penalty= 1.5
 NG2S0 CG311 CG321 CG2R61 0.2000 3 0.00 ! mydock , from NG2S1 CG311 CG321 CG2R61, penalty= 1
 NG2S0 CG311 CG321 HGA2 0.2000 3 0.00 ! mydock , from NG2S1 CG311 CG321 HGA2, penalty= 1
 CG201 CG311 NG2S0 CG201 0.2000 1 180.00 ! mydock , from CG201 CG311 NG2S1 CG201, penalty= 10
 CG201 CG311 NG2S0 CG331 0.2000 1 180.00 ! mydock , from CG201 CG311 NG2S1 CG201, penalty= 91.5
 CG321 CG311 NG2S0 CG201 1.8000 1 0.00 ! mydock , from CG321 CG311 NG2S1 CG201, penalty= 10
 CG321 CG311 NG2S0 CG331 1.8000 1 0.00 ! mydock , from CG321 CG311 NG2S1 CG201, penalty= 91.5
 HGA1 CG311 NG2S0 CG201 0.0000 1 0.00 ! mydock , from HGA1 CG311 NG2S1 CG201, penalty= 10
 HGA1 CG311 NG2S0 CG331 0.4200 3 0.00 ! mydock , from HGA3 CG331 NG2S0 CG331, penalty= 11
 NG2S1 CG321 CG321 OG311 0.2000 3 0.00 ! mydock , from NG2S1 CG311 CG321 OG311, penalty= 4
 HGA3 CG331 NG2S0 CG311 0.4200 3 0.00 ! mydock , from HGA3 CG331 NG2S0 CG331, penalty= 1.5

A.6 Cálculos de energía libre alquímicos

Para el cálculo de la energía libre usando esta metodología tiene en cuenta que:

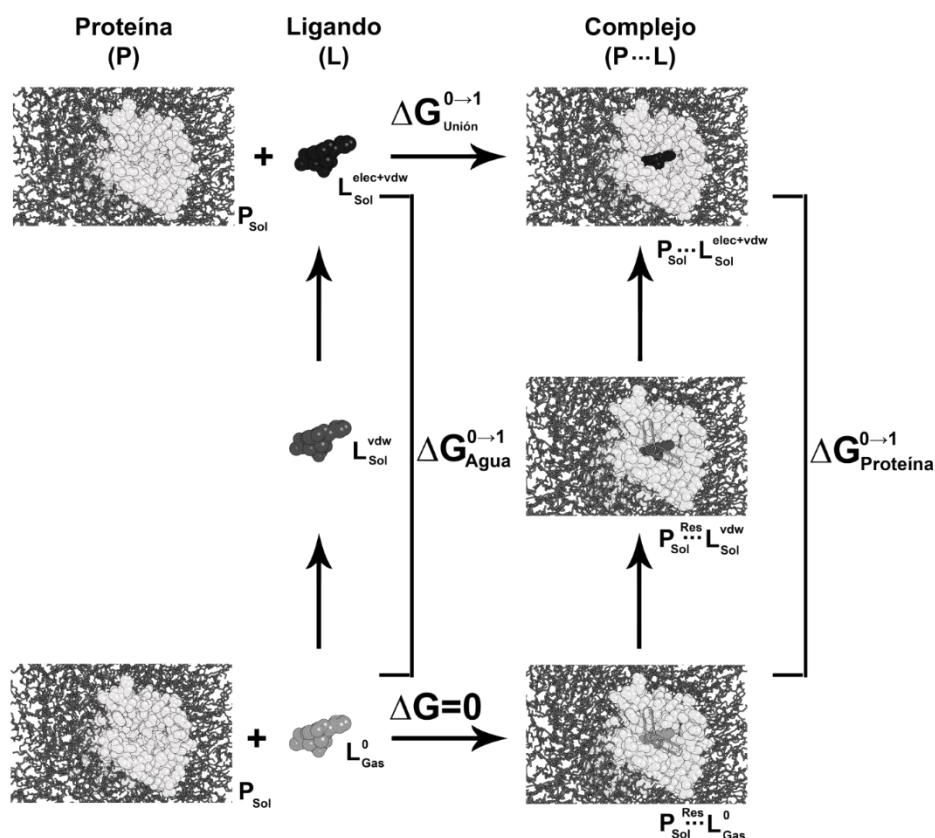
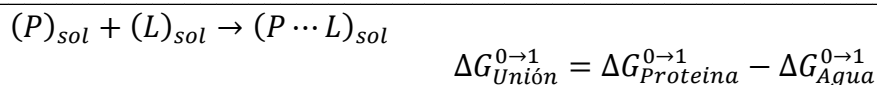
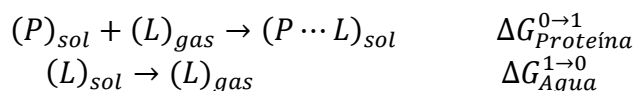


Figura A-1. Ciclo termodinámico para el cómputo de la energía libre absoluta alquímica ($\Delta G_{Unión}^{0 \rightarrow 1} = \Delta G_{Proteína}^{0 \rightarrow 1} - \Delta G_{Agua}^{0 \rightarrow 1}$). Representados en dos sistemas en el que el ligando se acopla/desacopla rodeado de moléculas de agua (ΔG_{Agua}) y otro acoplando/desacoplando en un complejo proteína-ligando ($\Delta G_{Proteína}$). Los superíndices indican hacia que lugar toma sentido las interacciones en donde el “0” representa el estado del ligando no interactuante y “1” al ligando interactuando totalmente con el sistema.

$\Delta G_{Protein}^{1 \rightarrow 0}$ y $\Delta G_{Proteina}^{0 \rightarrow 1}$ son las energías libres relacionadas al desacoplamiento y al acoplamiento del ligando en la proteína, respectivamente. $\Delta G_{Agua}^{1 \rightarrow 0}$ y $\Delta G_{Agua}^{0 \rightarrow 1}$ son las energías libres relacionadas a la desolvatación y solvatación del ligando en agua, respectivamente. $\Delta G_{Unión}^{0 \rightarrow 1}$ es la energía libre de unión entre proteína y ligando.

Según lo demostrado por Gilson y colaboradores (Gilson *et al.*, 1997) puede considerarse un sistema de un ligando dentro de la proteína como:

$$\Delta \bar{G}_{Protein}^{(0 \rightarrow 1)} = \int_0^1 \left\langle \frac{\delta U(\lambda, r_p, r_l, \zeta_l, r_s)}{\delta \lambda} \right\rangle_{\lambda, I(\xi_B)=1} d\lambda - RT \ln \left(\frac{\sigma_{p-l}}{\sigma_p \sigma_l} \right) + RT \ln \left(\frac{V_{pocket}}{V^o} \right) + RT \ln \left(\frac{\xi_A}{8\pi^2} \right) + P^o (\bar{V}_p - \bar{V}_{p-l}) \quad (15A)$$

σ_{p-l} , σ_p y σ_l es el número de simetría para el complejo proteína-ligando, proteína y ligando, respectivamente. $I(\xi_B) = 1$ es la función de paso que define el complejo, en este caso cuando el ligando está cerca al sitio activo. $U(\lambda, r_p, r_l, \zeta_l, r_s)$ es la energía potencial dependiente de la etapa de desacoplamiento λ , las posiciones de la proteína, ligando y entorno (r_p , r_l y r_s), la posición del ligando según tres coordenadas cartesianas externas y tres ángulos de Euler relativas a la proteína, llega a ser coordenadas internas del complejo ζ_l . \bar{V}_p y \bar{V}_{p-l} son los volúmenes parciales de la celda cuando se encuentra solo la proteína y cuando está el complejo proteína-ligando, respectivamente. V^o es el volumen estándar. P^o es la presión estándar. ξ_A son tres ángulos de Euler cuando se restringe al ligando en el sitio activo.

El tercer y cuarto término de la ecuación anterior se expresan para hacer la corrección cuando se ha hecho restricción para que el ligando se mantenga cerca del sitio activo o cuando se hacen restricciones para que no rote libremente en este mismo sitio, respectivamente. Las restricciones aportan a la energía por lo que hay que restarle esa energía. En nuestro caso la corrección tendrá la forma del tercer término de la ecuación.

El último término de la ecuación es una corrección cuando hay un cambio de volumen en el sistema luego de desacoplar al ligando, el cual siempre se espera sea despreciable.

A.6.1 Interacciones desacopladas en los sistemas estudiados

Las interacciones desacopladas serán vistas desde los potenciales entre átomos no enlazantes (tanto potenciales electrostáticos y potenciales de interacciones de Vdw) entre cada átomo del ligando y cada átomo del entorno (átomos de moléculas de aguas, proteína, lípidos y iones). Para el caso de sistemas solvatados los átomos del entorno sólo corresponden a los de moléculas de agua e iones del ambiente. Como ejemplo se presenta el acoplamiento de la herkinorina-D-ICM-1, morfina+Na⁺ y DAMGO-D-ICM-24 en ausencia de sodio, observado en las Figuras A-2 y A-3.

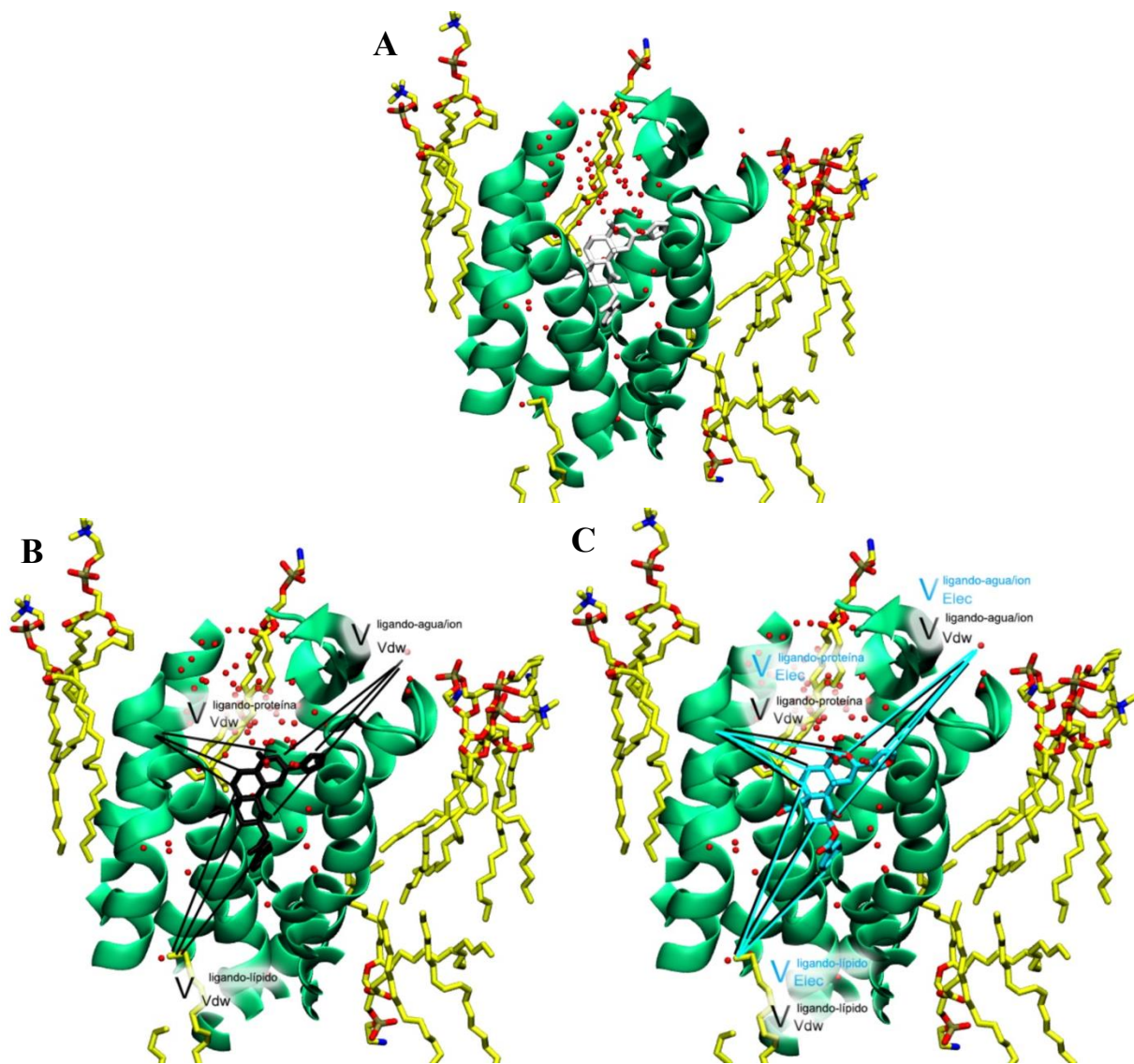


Figura A-2. Interacciones acopladas/desacopladas para el sistema receptor opiode mu y ligando herkinorina.
 A) Representa el estado donde no hay interacciones vistas con potenciales entre átomos no enlazantes. B) Representa el estado donde se acoplan las interacciones de V_{Vdw} vistas con potenciales V_{Vdw} entre átomos de cada grupo del sistema. B) Representa el evento de acoplar las interacciones electrostáticas vistas como potenciales V_{Elec} entre átomos de cada grupo del sistema, todo esto luego de que están acoplados todos los V_{Vdw} .

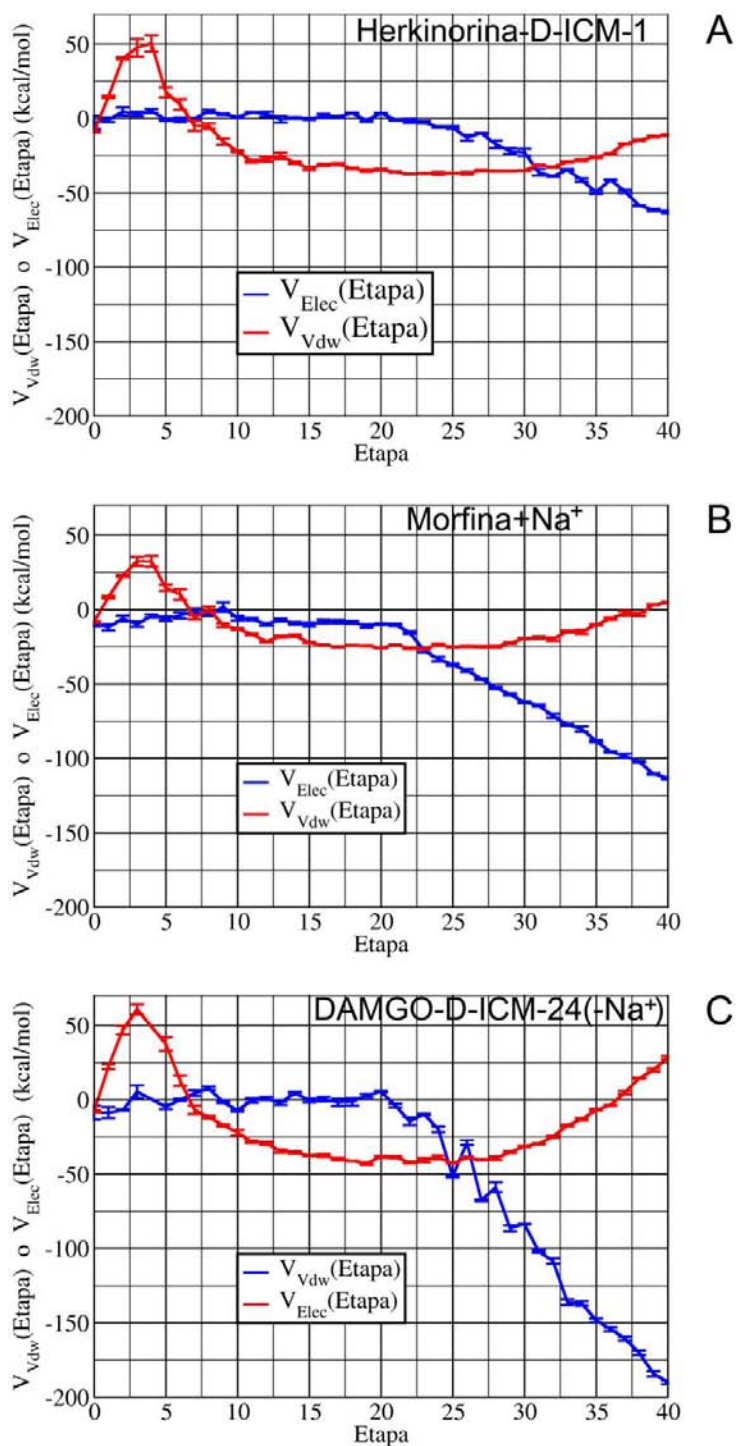


Figura A-3. Etapas en el acoplamiento de las interacciones tipo Van der Waals (V_{dw}) y electrostáticas ($Elec$) en el complejo receptor-ligando de los sistemas representativos. Desde $0 \leq Etapa \leq 20$ los potenciales que representan las interacciones de V_{dw} son acoplados ($0 \leq \lambda_i \leq 1$), mientras que los potenciales de interacciones $Elec$ se encuentran apagados ($\lambda_j = 0$). Para $20 \leq Etapa \leq 40$ se acoplan los potenciales que representan las interacciones $Elec$ ($0 \leq \lambda_j \leq 1$), mientras los potenciales de interacciones de V_{dw} se encuentran encendidos ($\lambda_i = 1$). A) Es la configuración de herkinorina-D-ICM-1. B) Morfina+Na⁺. Y C) DAMGO-D-ICM-24 sin sodio alostérico.

A.6.2 Método de BAR

El método de *Bennett acceptance ratio* (BAR) es una técnica de ajuste de curva que introduce a métodos de distribución de solapamiento, se trata de una interpolación entre dos estados consecutivos uno final λ_2 y uno inicial λ_1 con la cual se puede calcular la diferencia de energía libre entre estos estados (Bennett, 1976; Klimovich *et al.*, 2015). Para los ensambles NPT puede llegarse a la siguiente expresión que calcula la diferencia de energía libre:

$$\Delta G^{\lambda_2-\lambda_1} = \beta^{-1} \ln \left(\frac{\langle f(U_1 - U_2 + C) \rangle_{\lambda_2}}{\langle f(U_2 - U_1 - C) \rangle_{\lambda_1}} \right) + C \quad (16A)$$

Aquí, f es la función de fermi:

$$f(x) = \frac{1}{1 + \exp(\beta x)} \quad (17A)$$

Donde $U(q_1, \dots, q_N)$ es la función del potencial de un sistema de N grados de libertad configuracionales. $\Delta G^{\lambda_2-\lambda_1}$ la energía libre de Gibbs entre dos estados consecutivos. $\beta = 1/kT$, k es la constante de Boltzmann y T la temperatura en unidades Kelvin.

El valor de C es determinado iterativamente hasta $\langle f(U_1 - U_2 + C) \rangle_{\lambda_2} = \langle f(U_2 - U_1 - C) \rangle_{\lambda_1}$. La diferencia de energía entonces será (de Ruitter *et al.*, 2013):

$$\Delta G^{\lambda_2-\lambda_1} = -\beta^{-1} \ln \left(\frac{n_{\lambda_2}}{n_{\lambda_1}} \right) + C \quad (18A)$$

En la anterior ecuación n_{λ_1} y n_{λ_2} son el número de muestras para el estado λ_1 y λ_2 , respectivamente.

La varianza (σ^2) con la cual puede extraerse el valor estándar (σ) de la simulación individual debe estar dada por la siguiente expresión (Bennett, 1976):

$$\sigma^2 = \frac{\langle [f(x)]^2 \rangle_{\lambda_1} - \langle f(x) \rangle_{\lambda_1}^2}{n_{\lambda_1} \langle f(x) \rangle_{\lambda_1}^2} + \frac{\langle [f(-x)]^2 \rangle_{\lambda_2} - \langle f(-x) \rangle_{\lambda_2}^2}{n_{\lambda_2} \langle f(-x) \rangle_{\lambda_2}^2} \quad (19A)$$

$$x = [U_2 - U_1 - C] \quad (20A)$$

Así, la energía libre del sistema cuando el ligando está en la proteína o cuando está en agua será la sumatoria de las diferencias de las energías libre entre todos los pares intermediarios entre los dos estados finales.

A.7 Análisis de modos funcionales (FMA)

Según los creadores de esta rutina (Hub *et al.*, 2009), el análisis de modos funcionales (FMA) tiene como objetivo detectar el movimiento colectivo que está directamente relacionado con una función particular de una proteína. Basado en un conjunto de estructuras con una “cantidad funcional” arbitraria que cuantifica el estado de la proteína. La técnica detecta el movimiento colectivo que se correlaciona máximamente a la cantidad funcional.

Esto dado una trayectoria $X(t) \in \mathbb{R}^{3N}$, de átomos en una proteína, esqueleto del receptor (-N-C α -CO-), etc. Donde $X(t)$ denota las $3N$ coordenadas cartesianas de N átomos en tiempos t . Los movimientos se pueden relacionar a una función $f(t)$ para los átomos seleccionados. Como punto de partida para un movimiento correlacionado máximamente (MCM) se tiene que encontrar un vector colectivo normalizado $\mathbf{a} \in \mathbb{R}^{3N}$ tal que el movimiento a lo largo de \mathbf{a} esté máximamente correlacionado a la función $f(t)$. El MCM es una proyección relacionada a:

$$p_a(t) = [X(t) - \langle X \rangle] \cdot \mathbf{a} \quad (21A)$$

Correlacionando $p_a(t)$ con $f(t)$ por ejemplo a través del coeficiente de correlación de Pearson definido como:

$$R = \frac{cov(f, p_a)}{\sigma_f \sigma_a} \quad (22A)$$

Donde $cov(f, p_a)$ es la covariancia entre la función $f(t)$ y la proyección $p_a(t)$. σ_f y σ_a son las desviaciones estándar de la función y la proyección, respectivamente.

Siguiendo, hay que reducir dimensiones y una forma de hacerlo es a través de análisis de componentes principales (PCA), para esto se debe diagonalizar la matriz de covarianza:

$$C_{ij} = \langle (x_i - \langle x_i \rangle)(x_j - \langle x_j \rangle) \rangle \quad (23A)$$

Dado $3N$ coordenadas cartesianas $x_i(t)$ con $(i = 1, 2, 3, \dots, 3N)$.

El procedimiento da un conjunto de $3N$ vectores propios ortonormales e_i con sus correspondientes valores propios σ_i^2 . Ahora la proyección:

$$p_i = [X(t) - \langle X \rangle] \cdot e_i \quad (24A)$$

Es llamada el i -ésimo componente principal (PC) y cuantifica la posición de la proteína a lo largo del i -ésimo vector. Para simulaciones de proteínas, los primeros 10-20 PCs con mayores valores propios describen la mayor parte (80-90%) del movimiento de las fluctuaciones del cuadrado medio (RMSF). Así, se escoge un conjunto de vectores que puedan construir un conjunto de base para \mathbf{a} . Esto de la forma:

$$\mathbf{a} = \sum_{i=1}^d \alpha_i e_i \quad (25A)$$

α_i son las coordenadas de \mathbf{a} respecto al conjunto los primeros d vectores propios base $\{e_i\}$.

Ahora al maximizar R , se obtiene un modelo cuantitativo de $f(t)$ respecto a los PCs $p_i(t)$, que puede verse como:

$$m_f(t) = \langle f \rangle + \sum_{i=1}^d \beta_i [p_i(t) - \langle p_i \rangle] \quad (26A)$$

Ahora si se asume que $\mathbf{a} = \sum_{i=1}^d \alpha_i e_i$ fue optimizada tal que $p_a(t) = \sum_{i=1}^d \alpha_i p_i(t)$ esta máximamente correlacionado a $f(t)$ desde la medida de R . Se puede fijar α_i y $p_a(t)$ cuatificar el estado funcional de la proteína. En los ensambles de entrada p_a varia entre su minimo p_a^{min} y su máximo p_a^{max} . Ahora para definir un movimiento correlacionado máximamente del ponderado del ensamble (ewMCM) se selecciona un p_a fijo y arbitrario denotado como $p_a^* \in [p_a^{min}, p_a^{max}]$. Considerando también el desplazamiento colectivo (\mathbf{v}^*) más probable desde una estructura promedio $\langle X \rangle$ genera el estado funcional p_a^* , representado como:

$$P(\mathbf{v}^*) \rightarrow \max, \quad \mathbf{v}^* \cdot \mathbf{a} = p_a^* \quad (26A)$$

Esto también se restringe al subespacio expandido por los primeros d vectores propios $\{e_i\}$. Entonces el ewMCM puede escribirse como $\mathbf{v}^* = \sum_{i=1}^d p_i(t) e_i$ y la condición reescrita como:

$$P(p_1^*, \dots, p_d^*) \rightarrow \max, \quad \sum_{i=1}^d \alpha_i p_i^* = p_a^* \quad (27A)$$

$P(p_1^*, \dots, p_d^*)$ es la probabilidad del conjunto particular de PCs p_1^*, \dots, p_d^* , éste se puede aproximar a:

$$P(p_1^*, \dots, p_d^*) \approx \prod_{i=1}^d P_i(p_i) \approx N_p^{-1} \exp\left(-\frac{1}{2} \sum_{i=1}^d \frac{p_i^2}{\sigma_i^2}\right) \quad (28A)$$

Con esta aproximación la maximización de $P(p_1^*, \dots, p_d^*)$ usando la restricción $\sum_{i=1}^d \alpha_i p_i^* = p_a^*$ puede resolverse con multiplicadores de Lagrange, teniendo:

$$p_i^* = \frac{\alpha_i \sigma_i^2}{\sum_{j=1}^d (\alpha_j \sigma_j^2)} p_a^* \quad (29A)$$

Así, los componentes α_i de MCM son ponderados según la varianza σ_i^2 de p_i del ensamble dado. Justificando el término de ensamble ponderado (ewMCM). Las estructuras pueden representar en programas de visualización molecular desde $X = \langle X \rangle + \sum_{i=1}^d p_i^* e_i$.

Una ventaja de ewMCM es que puede ser más dependiente del mapa energético de una proteína dada, mientras que MCM no. MCM es un movimiento paralelo de la proyección respecto de \mathbf{a} lo hace mas restringido.

Anexo B

B.1 Interacciones de ligando-proteína según MOE

Las siguientes son las leyendas de las interacciones del diagrama en dos dimensiones realizado para las configuraciones receptor-ligando

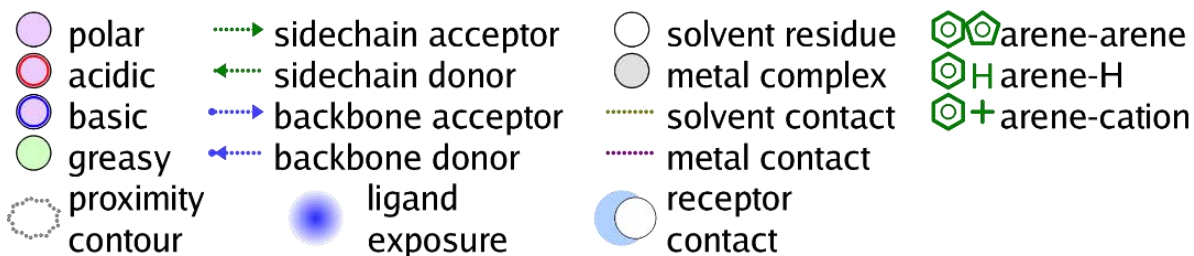


Figura B- 1. Tipos de interacciones que se computan en el cálculo de proteína-ligando del programa MOE.

B.2 Mutaciones reportadas en el receptor opioide Mu.

Tabla B- 1. Listado de mutaciones en los aminoácidos importantes en el receptor opioide Mu.

| Residuo | Numeración | Aminoácido natural | Mutación | TM | Efecto | Referencia |
|-------------|------------|--------------------|----------|-----|---|---------------------------------------|
| 114 | 2.50x50 | D | A | TM2 | Disminuye la afinidad en DAMGO, la morfina y etorfina. La naloxona no disminuye dramáticamente. Diprenorfina aumenta levemente. | (Chakrabarti <i>et al.</i> , 1997) |
| 114 | 2.50x50 | D | N | TM2 | Disminuye actividad efectiva para el fentanil y análogos. También la morfina y otros. | (Bot <i>et al.</i> , 1998) |
| 114 | 2.50x50 | D | N | TM2 | Restaura la afinidad de DAMGO cuando esta mutado N332D. | (Pil <i>et al.</i> , 2003) |
| 127* (rata) | 2.63x63 | N | K | TM2 | Involucrado en la selectividad de DAMGO hacia MOR. | (Minami <i>et al.</i> , 1996) |
| 147 | 3.32x32 | D | A | TM3 | Reduce dramáticamente la actividad efectiva para la mayoría de compuestos estudiados, no todos. | (Befort <i>et al.</i> , 1996) |
| 150 | 3.35x35 | N | A | TM3 | Produce incremento de 3 a 20 unidades en la afinidad para agonistas opioides morfina, DAMGO, fentanil, JOM-13, etc. Con ningún cambio en la afinidad de antagonistas como la naloxona, naltrexona, etc. | (Mansour <i>et al.</i> , 1997) |
| 196 | 4.54x54 | S | A | TM4 | Respuestas analgésicas usando La naloxona y nalorfina. | (Claude-Geppert <i>et al.</i> , 2005) |
| 196 | 4.54x54 | S | L | TM4 | Aumenta actividad agonista para DAMGO y nalorfina. La naloxona se convierte de antagonista a agonista parcial. Disminuye para diprenorfina. | (Claude-Geppert <i>et al.</i> , 2005) |
| 235* (rata) | 5.41x42 | C | S | TM4 | No está envuelto en puentes disulfuros con el ligando estudiado. | (Shahrestanifar <i>et al.</i> , 1996) |
| 297* (rata) | 6.52x52 | H | Q | TM6 | Decrece afinidad de la naloxona. Es preferido por ligandos peptídicos. La morfina no tiene preferencia muy notoria en la afinidad pero su actividad se ve disminuida. | (Spivak <i>et al.</i> , 1997) |
| 297* (rata) | 6.52x52 | H | N | TM6 | Decrece afinidad de la naloxona. Afinidad y actividad efectiva disminuida en ligandos peptídicos. La morfina decrece su afinidad y actividad. | Spivak (Spivak <i>et al.</i> , 1997) |

| | | | | | | |
|------------|---------|---|---|-----|---|---|
| 303*(rata) | 6.58x58 | K | E | TM6 | Está implicado en selectividad de MOR para los compuestos estudiados. | (Jones <i>et al.</i> , 1998) |
| 318 | 7.35x34 | W | Y | TM7 | Reduce actividad efectiva para la morfina y la morfina-6-glucurónido. | (Ulens <i>et al.</i> , 2001) |
| 319 | 7.36x35 | H | Y | TM7 | Mejora la actividad para la morfina y morfina-6-glucurónido en presencia de W318Y. Selectividad para DAMGO hacia MOR respecto KOR | (Ulens <i>et al.</i> , 2001) (Seki <i>et al.</i> , 1998) |
| 319 | 7.36x35 | H | A | TM7 | Decrece la afinidad para los ligandos estudiados, excepto bremazocina. | (H Xu <i>et al.</i> , 1999) |
| 321*(rata) | 7.38x37 | C | S | | No está envuelto en puentes disulfuros con el ligando estudiado. | (Shahrestanifar <i>et al.</i> , 1996) |
| 326 | 7.43x42 | Y | F | TM7 | Decrece la afinidad para la morfina, DAMGO y el fentanil. | (Pil <i>et al.</i> , 2003) |
| 327 | 7.44x43 | T | A | TM7 | La naloxona exhibe agonismo total cuando también esta S196L. | (Claude-Geppert <i>et al.</i> , 2005) |
| 329 | 7.46x46 | S | A | TM7 | Aumenta la actividad agonista en la morfina, fentanil y β -hidroxifentanil. Decrece en DAMGO. | (Pil <i>et al.</i> , 2003) |
| 330 | 7.47x47 | C | S | TM7 | La naloxona exhibe agonismo total cuando también esta S196L. | (Claude-Geppert <i>et al.</i> , 2005) |
| 332 | 7.49x49 | N | D | TM7 | Elimina la actividad de DAMGO | (Pil <i>et al.</i> , 2003) |

Todas las mutaciones son en el receptor de la secuencia *Mus musculus*. Cuando se indique (rata) se reporta resultados usando la secuencia de rata *Rattus norvegicus*.

Anexo C

C.1 Publicaciones

Capítulos de libros

Marmolejo AF, Medina-Franco JL, Giulianotti M, Martinez-Mayorga K. “Interaction Fingerprints and Their Applications to Identify Hot Spots”, *G Protein-Coupled Receptors in Drug Discovery: Methods and Protocols*, Marta Filizola (ed.), Springer Science+Business Media, New York, 2015, pp:313-324.

Artículos científicos

Marmolejo-Valencia AF, Martinez-Mayorga K. “Allosteric modulation of the mu opioid receptor by herkinorin, a potent not alkaloidal agonist”, *RSC Advances*, 2016, en revision.

C.2 Eventos científicos

12th German Conference on Chemoinformatics, noviembre 6–8, 2016. MARITIM Hotel am Schlossgarten, Fulda Alemania. Cartel *Allosteric Modulation of the mu Opioid Receptor by Herkinorin a Computational Study*.

Simposio *Frontiers in Computational Chemistry 2016*, agosto 24–26, 2016. Auditorio A, Facultad de Química, Ciudad Universitaria, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México, México. Cartel *Docking, Molecular Dynamics Simulations and alchemical Free Energy Studies of Herkinorin into the Mu Opioid Receptor*.

Simposio. Ciclo de conferencias y actividades académicas en la celebración de los 75 años del instituto de química, abril 5–8 ,2016. Torre de Ingeniería, Ciudad Universitaria, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México, México. Cartel *Functional selectivity at the mu opioid receptor revealed by molecular dynamics simulations and free energy calculations*.

C.3 Cursos impartidos

Taller. *Química: "Una ventanilla a la química contemporánea"*, julio 25-31, 2016. Centro de Investigación en Matemáticas, Guanajuato, México. *Taller de Ciencia para Jóvenes*.