

Similitudes y diferencias estructurales en receptor opioide de *Danio rerio*

Structural similarities and differences in the Danio rerio opioid receptor

Heber España^{1*}, Ana Lucía Valle¹¹Universidad Galileo, Guatemala

*Autor de correspondencia: heber.espana@galileo.edu

Resumen

Se han utilizado múltiples modelos de animales para examinar los sistemas neurológicos y la inhibición de los receptores opioides μ , revelando así su similitud funcional con los receptores μ en humanos. El pez cebra (*Danio rerio*) y el ratón (*Mus musculus*) son homólogos en relación con el sistema opioide, por lo tanto, este estudio trata con pruebas *in silico* realizadas en receptores opioides μ ; Humanos (*Homo sapiens*), ratón y pez cebra. Se realizó un modelado molecular y se determinó el porcentaje de identidad del receptor μ , utilizando el algoritmo de Needleman Wunsch, también se realizó acoplamiento molecular con diecisiete moléculas naturales con actividad agonista opioide. El objetivo del estudio se basó en descubrir el receptor opioide μ homólogo al ser humano e identificar el receptor que tiene más similitud de resultados acoplados con moléculas opioides. En conclusión, el porcentaje de identidad del receptor humano, en comparación con el ratón, resultó ser más homólogo respecto a la estructura proteica completa. Sin embargo, los resultados del acoplamiento molecular con moléculas de opioides en el receptor μ *Danio rerio* fueron más significativos y similares al humano que al ratón

Palabras clave: Docking, Algoritmo de Needleman Wunsch, Analgesia, *in silico*

Abstract

Multiple animal models have been used to examine neurological systems and inhibition of μ opioid receptors, thus revealing their functional similarity to μ receptors in humans. Zebrafish (*Danio rerio*) and mice (*Mus musculus*) are homologous in relation to the opioid system, therefore, this study deals with *in silico* tests carried out on μ opioid receptors; Humans (*Homo sapiens*), Mouse and Zebrafish. Molecular modeling was performed and the percent identity of the μ receptor was determined, using the Needleman Wunsch algorithm, molecular coupling was also performed with seventeen natural molecules with opioid agonist activity. The objective of the study was based on discovering the human opioid receptor μ homologous and identifying the receptor that has more similarity of results coupled with opioid molecules. In conclusion, the percentage of identity of the human receptor, compared to the mouse, turned out to be more homologous with respect to the complete protein structure. However, the results of molecular coupling with opioid molecules at the *Danio rerio* μ receptor were more significant and similar to that of humans than mice

Keywords: Docking, Needleman Wunsch, Analgesia, *in silico*



Introducción

El diseño de las moléculas derivadas de opioides para tratamientos de enfermedades crónicas con dolor grave, así como la aplicación de procedimientos no invasivos y reducción en el uso de animales de laboratorio, son especialmente importantes en estudios de analgesia, ya que estos requieren el uso de un estímulo doloroso y en algunos casos implica un grado de sufrimiento animal. Los opioides son fármacos utilizados para el alivio del dolor, pero a la vez estos producen efectos secundarios (Benyamin et al., 2008). El diseño de estas moléculas termina siendo muy importante para cubrir actividades terapéuticas con umbral de dolor grande incluyendo cuidados paliativos. Previamente a los estudios en animales sería necesario realizar diferentes acoplamiento moleculares para observar si existe una diferencia significativa en la respuesta receptor-ligando (Kaserer, Lantero, Schmidhammer, Spetea & Schuster, 2016)(Valle & Vargas, 2020). Es por ello por lo que existen novedosos métodos *in silico* que han sido de gran ayuda para reemplazar las primeras pruebas de un desarrollo de fármaco en animales (Travassos & Barros, 2003), debido a que la investigación sobre el uso de moléculas pequeñas como medicamentos, continúa siendo un impulsor clave en el desarrollo de bases de datos moleculares, software de diseño de medicamentos asistido por computadora y plataformas colaborativas. Las integraciones de estos métodos podrían aprovechar todo el potencial de los datos disponibles en el descubrimiento de fármacos y reducir recursos en el diseño de nuevos fármacos, así como evitar el uso de animales poco similares al humano obteniendo resultados poco reproducibles (Zloh & Kirton, 2019).

La gran complejidad del sistema biológico humano requiere de investigaciones y pruebas en animales que son similares a los humanos, para alcanzar resultados confiables y efectivos. Por lo tanto, el presente de estudio pretende evaluar el mejor modelo receptor para realizar pruebas de opioides al utilizar química computacional receptores *Homo sapiens*, *Mus musculus* y *Danio rerio* al comparar datos de identidad genética y semejanza en resultados de acoplamiento molecular con moléculas opioides naturales biotransformadas. Los metabolitos de las moléculas naturales con actividad opioide fueron obtenidos de la base de datos de *National Institutes of Health* (PubChem) (NIH).

Danio rerio se ha convertido en un modelo para estudios de biología y genética de vertebrados, desarrollo embrionario, enfermedades y detección de drogas., además, es un modelo animal útil para neurobiología, biología del desarrollo, investigación de fármacos, virología, microbiología y genética (Nowik, Podlasz,

Jakimiuk, Kasica, Siekiewicz & Kaleczyc, 2015). Estudios *in vitro* con ensayos S-GTPys de enlaces han demostrado que el receptor opioide *Danio rerio* presenta un perfil farmacológico similar al de los mamíferos que se asemeja al receptor homólogo mamífero, (Velasco, Law & Rodriguez, 2009). La evidencia de estudios en farmacología por métodos *in silico* e *in vitro* basan sus referencias que estudios terapéuticos y efectos secundarios que se realizan principalmente en *Mus musculus*. El ratón ha sido el modelo animal más utilizado para pruebas *in vitro*, en opioides (Borsodi et al., 2019). Por lo tanto, el presente de estudio pretende comparar con métodos *in silico* el mejor modelo receptor para realizar pruebas opioides al utilizar receptores *Homo sapiens*, *Mus musculus* y *Danio rerio* logrando comparar datos de identidad genética, homología y acoplamiento molecular utilizando moléculas opioides naturales biotransformadas. como conclusión, el modelo animal es más homólogo al humano para ser utilizado como candidato en estudios de fase I de opioides, es el pez cebra.

Materiales y métodos

Los receptores μ del ratón y el humano fueron obtenidos de *Protein Data Bank* (PDB, 2018). El receptor de *Mus musculus* es una estructura cristalizada de un receptor μ opioide activo. Es identificado como 5C1M (Huang et al., 2015). El opioide de *Homo sapiens* seleccionado utilizado fue 6DDF (Koehl et al., 2018).

Modelado 3D receptor pez cebra

La proteína receptora μ de pez cebra fue modelada a partir de una secuencia del receptor *Danio rerio* UniProtKB-B8JHS2 (Howe et al., 2013). El modelo fue realizado utilizando *Swissmodel* (Bertoni, Kiefer, Biasini, Bordoli & Schwede, 2017)(Waterhouse et al., 2018).

Algoritmo de Needleman Wunsch

Se utilizó UCSF Chimera (Pettersen, Goddard, Huang, Couch, Greenblatt, Meng & Ferrin, 2004). El alineamiento entre las moléculas de acuerdo con sus secuencias y dimensiones en sus estructuras fue comparado con los receptores μ - opioides; *Danio rerio*, *Homo sapiens* y *Mus musculus*. El porcentaje de identidad fue calculado con el algoritmo Needleman Wunsch (Needleman & Wunsch, 1970). Se comparó el porcentaje de identidad entre los receptores de *Danio rerio* vs *Homo sapiens*, *Danio rerio* vs *Mus musculus*, y *Homo sapiens* vs *Mus musculus*. El modelo generado por homología fue analizado mediante un ploteo de Ramachandrad, utilizando el software Rampage

(Allen & Taylor, 2004). Para identificar sitios activos, se utilizó los aminoácidos descritos por Cui (Cui & Liu, 2013). Y fueron seleccionados en UCSF Chimera (Pettersen et al., 2004). Software AutoDock Vina fue utilizado para acoplamiento molecular. (Trott & Olson, 2010).

El acoplamiento molecular fue efectuado a través de Chimera Vina Tools 1.14 (Pettersen et al., 2004) y el software Autodock vina (Trot t& Olson, 2010). Se eliminaron los residuos ajenos a los receptores, utilizando las cadenas de aminoácidos que conforman el receptor opioide. En la preparación también se eliminan solventes y moléculas ajenas al receptor. Luego efectuada la preparación del acoplamiento se realizó el acomplamiento y se identificó el sitio activo. Por último, metabolitos activos de opioides se acoplaron al sitio activo del receptor μ opioide del ratón, humano y del modelo por homología realizado para el pez cebra, utilizando el algoritmo Lamarckiano (Morris, Goodsell, Halliday, Huey, Hart, Blew & Olson, 1998) comparando sus afinidades energéticas.

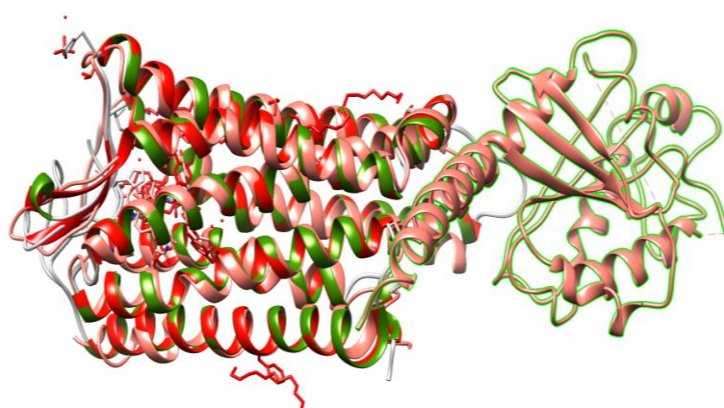


Figura 1. Alineamiento en tres dimensiones humano, pez cebra y ratón: *Homo sapiens* (rojo), *Mus musculus* (rosado) y *Danio rerio* (verde). Software UCSF Chimera 1.14 (Pettersen, Goddard, Huang, Couch, Greenblatt, Meng & Ferrin, 2004)

Resultados

Tabla 1 Identidad entre los receptores μ humano, ratón y pez cebra

Comparación	% De Identidad
<i>Homo sapiens</i> vs <i>Mus musculus</i>	96
<i>Homo Sapiens</i> vs <i>Danio rerio</i>	85.82
<i>Mus musculus</i> vs <i>Danio rerio</i>	86.39

Tabla 2 Análisis de calidad del modelo generado receptor opioide μ de *Danio rerio*

Receptor Mu <i>Danio rerio</i>	GQE (calidad global estimada)
Secuencia de identidad (<i>Mus musculus</i>)	86.44%
GMQE	0.73
QMEAN	-2.13

Estimadores de calidad global del modelo generado por homología (Biasini et al., 2014)

Tabla 3 Resultados de acoplamiento molecular en cada receptor

Metabolito	Pubchem CID	Kcal/mol		
		<i>Homo sapiens</i>	<i>Mus musculus</i>	<i>Danio rerio</i>
Dihidromorfina	5359421	-10.8	-9.6	-12.1
Norcodeína	9925873	-11.6	-9.9	-12.2
16-hidroxycapsaicina	71748835	-6	-6	-7.6
17-hidroxycapsaicina	21581804	-6.4	-5.8	-7.4
Dihidrocapsaicina	107982	-6.4	-5.7	-7.5
11-Hidroxitetrahidrocannabinol	644022	-8	-5.5	-8.6
11-Nor-9-Carboxi-Tc	107885	-8	-4.7	-8.9
Berberrubina	72704	-7.4	-5.6	-8.6
Talidendina	3084288	-7.7	-5.7	-8.5
Dimetilenberberina	363209	-7	-5.6	-8.4
Jatrorrizina	72323	-7.1	-5.5	-7.6
Normorfina	5462508	-7.9	-5.8	-7.9
Morfina 3-Glucoronido	5484731	-8.2	-6.2	-9.5
Meconina	68437	-5.2	-4.7	-5.7
4'-Hidroxiopapaverina	100248	-7.7	-5.3	-7.7
Dihidrosanguinarina	124069	-8.4	-6.8	-9.5

Discusión

La **tabla 1** muestra los porcentajes de identidad entre los tres receptores μ opioide homólogos, el mayor porcentaje fue entre el ratón y humano, por lo que las secuencias aminoacídicas entre ambos son las más parecidas. El modelo por homología generado a partir de una plantilla, obtuvo una calidad aceptable en términos de QMEAN y GMQE, **tabla 2**. Los modelos generados por homología

deben tener un porcentaje alto de similitud en cuanto a su secuencia con la que se utiliza de plantilla, lo cual fue realizado con 86.44%. En tres dimensiones la comparación entre los receptores 6DDF.pdb, 5C1M.pdb y el modelo generado por homología para pez cebra, **figura 1**, muestra que las estructuras se encuentran conservadas.

Los aminoácidos de los receptores *Homo sapiens* que mayormente interactúan con las moléculas opioides son Asp 147, Tyr 148, Met 151, Trp 293, Ile 296, His 297, val 300, Ile 322, Tyr 326 (Cui & Liu, 2013). Esta secuencia de aminoácidos se encontró en los tres receptores analizados, y difieren en la numeración de cadena.

El receptor de *Homo sapiens* y *Mus musculus* poseen secuencias de aminoácidos en el mismo orden de la cadena, en cambio, el pez cebra contiene los mismos aminoácidos en la misma secuencia, pero en diferente localización de cadena, debido a que el receptor del pez cebra es más pequeño que el receptor *Homo sapiens* y *Mus musculus*. Aunque el receptor del pez cebra posee los sitios activos en diferente localización de cadena, éste tiene todos los sitios activos necesarios para la unión de moléculas activas que el receptor *Homo sapiens*. Esta es una de las razones por la que el porcentaje de identidad con el pez cebra es menor. Los aminoácidos que poseen sitio activo en el pez cebra son; Asp 139, Tyr 140, Met 143, Trp 288, Ile 291, His 292, Val 295, Ile 317 y Try 321. Por lo tanto, los aminoácidos están en la misma secuencia, pero en posición diferente que los receptores humano y ratón. La proteína del humano es de mayor tamaño que las del ratón y el pez

Para la comprobación del sitio activo se realizaron tres acoplamiento en diferentes localizaciones con moléculas opioides activas. Observándose una mejor afinidad con la dihidromorfina, metabolito activo de la morfina, **tabla 3**. Se obtuvo interacción entre aminoácidos y moléculas opioides en Asp 147, Tyr 148, Met 151, Trp 293, Ile 296, His 297, val 300, Ile 322, Tyr 326. En los acoplamiento moleculares no fueron considerados los residuos no estándares y cadenas B, debido a que ninguna de estas cadenas es parte del sitio activo.

Existe similitud entre la mayoría de metabolitos donde se posee un elemento nitrogenado, el sustituyente unido al nitrógeno influye directamente en la actividad del fármaco opioide. Los principios activos logran activar los receptores de la proteína G mientras que los antagonistas contienen grupos ciclogénados unidos al átomo de nitrógeno. La Mecoína es el metabolito que presentó menor afinidad hacia el receptor debido a que no posee un grupo nitrogenado. 17 hidroxicafeína y dihidrocapsaicina presentaron una menor afinidad que los demás metabolitos, esto debido a que los grupos fenólicos

en posiciones orto y para disminuyen la afinidad al receptor (Portoghese, 1965).

Los metabolitos activos con actividad opioide presentaron afinidad al receptor μ opioide, en los tres tipos de receptores analizados. El 11-hydroxy-delta-9-tetrahydrocannabinol, 11-nor-9-carboxi-delta-9-tetrahydrocannabinol son metabolitos del principio activo tetrahydrocannabinol que intervienen con el sistema endocanabinoide, que está relacionado con los receptores CB1R, CB2R y opioide, que es el encargado de modular sinápticamente neurotransmisiones relacionadas con la inflamación y dolor neuropático (Demin et al., 2018). Según los resultados de acoplamiento se puede esperar que la mayoría pueda desencadenar una actividad opioide debido a la buena afinidad mostrada hacia el receptor.

Los resultados de acoplamiento de los metabolitos Dihidromorfina, 11-Nor-9-Carboxi-Tc, 11-Hidroxitetrahydrocannabinol, berberrubina, Talidendina, dimetilenberberina, dihidromorfina, normorfina,, Mecoina, 4-hidroxipapavirina, dihidrosanguinarina presentaron más similitud de afinidad entre el pez cebra y el receptor humano. Los metabolitos Norcodeína, 16-hidroxicafeína, 17-hidroxicafeína y dihidrocapsaicina, muestran resultados similares entre ratón y el humano. Por lo tanto, existe evidencia de una mayor similitud de los resultados de afinidad al receptor del humano con el pez cebra, a pesar de que el receptor de ratón tiene una mayor identidad con el receptor humano.

Conclusiones

La estructura tridimensional de los receptores μ homólogos de pez cebra, ratón y humano, se encuentran conservados en los aminoácidos que interactúan con los metabolitos activos de opioides, siendo el pez cebra el que posee mayor similitud al humano en tres dimensiones, aunque el porcentaje de identidad es mayor en ratón y humano. El pez cebra posee evidencia de una mejor interacción con opioides en su receptor μ , lo que confirmaría su elección como animal modelo

Referencias

- Allen, F. H., & Taylor, R. (2004). *Research applications of the Cambridge structural database (CSD)*. *Chemical Society Reviews*, 33(8), 463-475.
- Benyamin, R., Trescot, A. M., Datta, S., Buenaventura, R., Adlaka, R., Sehgal, N., ... & Vallejo, R. (2008). Opioid complications and side effects. *Pain physician*, 11(2 Suppl), S105.
- Bertoni, M., Kiefer, F., Biasini, M., Bordoli, L., & Schwede, T. (2017). Modeling protein quaternary structure of homo-and hetero-oligomers beyond binary interactions by homology. *Scientific reports*, 7(1), 1-15.
- Biasini, M., Bienert, S., Waterhouse, A., Arnold, K., Studer, G., Schmidt, T., ... & Schwede, T. (2014). SWISS-MODEL: modelling protein tertiary and quaternary structure using evolutionary information. *Nucleic acids research*, 42(W1), W252-W258.

- Borsodi, A., Bruchas, M., Caló, G., Chavkin, C., Christie, M. J., Civelli, O., ... & Höllt, V. (2019). Opioid receptors (version 2019.4) in the IUPHAR/BPS Guide to Pharmacology Database. *IUPHAR/BPS Guide to Pharmacology CITE*, 2019(4).
- Cui, X., Yeliseev, A., & Liu, R. (2013). Ligand interaction, binding site and G protein activation of the mu opioid receptor. *European journal of pharmacology*, 702(1-3), 309-315.
- Demin, K. A., Meshalkina, D. A., Kysil, E. V., Antonova, K. A., Volgin, A. D., Yakovlev, O. A., ... & Barcellos, L. J. (2018). Zebrafish models relevant to studying central opioid and endocannabinoid systems. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 86, 301-312.
- Huang, W., Manglik, A., Venkatakrishnan, A. J., Laeremans, T., Feinberg, E. N., Sanborn, A. L., ... Kobilka, B. K. (2015). Structural insights into μ -opioid receptor activation. *Nature*, 524(7565), 315-321.
- Howe, K., Clark, M. D., Torroja, C. F., Tarrance, J., Berthelot, C., Muffato, M., ... & McLaren, S. (2013). The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome. *Nature*, 496(7446), 498-503.
- Kaserer, T., Lantero, A., Schmidhammer, H., Spetea, M., & Schuster, D. (2016). μ Opioid receptor: novel antagonists and structural modeling. *Scientific reports*, 6(1), 1-15.
- Koehl, A., Hu, H., Maeda, S., Zhang, Y., Qu, Q., Paggi, J. M., ... & Schertler, G. F. (2018). Structure of the μ -opioid receptor-G i protein complex. *Nature*, 558(7711), 547-552.
- Morris, G. M., Goodsell, D. S., Halliday, R. S., Huey, R., Hart, W. E., Belew, R. K., & Olson, A. J. (1998). Automated docking using a Lamarckian genetic algorithm and an empirical binding free energy function. *Journal of computational chemistry*, 19(14), 1639-1662.
- Nowik, N., Podlasz, P., Jakimiuk, A., Kasica, N., Sienkiewicz, W., & Kaleczyc, J. (2015). Zebrafish: an animal model for research in veterinary medicine. *Polish journal of veterinary sciences*, 18(3), 663-674.
- Needleman, S. B., & Wunsch, C. D. (1970). A general method applicable to the search for similarities in the amino acid sequence of two proteins. *Journal of molecular biology*, 48(3), 443-453.
- Pettersen, E. F., Goddard, T. D., Huang, C. C., Couch, G. S., Greenblatt, D. M., Meng, E. C., & Ferrin, T. E. (2004). UCSF Chimera—a visualization system for exploratory research and analysis. *Journal of computational chemistry*, 25(13), 1605-1612.
- Portoghese, P. S. (1965). A new concept on the mode of interaction of narcotic analgesics with receptors. *Journal of medicinal chemistry*, 8(5), 609-616.
- Travassos, G. H., & Barros, M. O. (2003, September). Contributions of in vitro and in silico experiments for the future of empirical studies in software engineering. In *2nd Workshop on Empirical Software Engineering the Future of Empirical Studies in Software Engineering* (pp. 117-130).
- Trott, O., & Olson, A. J. (2010). AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. *Journal of computational chemistry*, 31(2), 455-461.
- Valle, A. L., & Vargas, R. (2019). Ciclooxygenasa similitudes y diferencias estructurales en animales modelo. *Revista Fesahancccal*, 5(1), 30-36.
- Velasco, E. M. F., Law, P. Y., & Rodriguez, R. E. (2009). Mu opioid receptor from the zebrafish exhibits functional characteristics as those of mammalian mu opioid receptor. *Zebrafish*, 6(3), 259-268.
- Waterhouse, A., Bertoni, M., Bienert, S., Studer, G., Tauriello, G., Gumienny, R., ... & Lepore, R. (2018). SWISS-MODEL: homology modelling of protein structures and complexes. *Nucleic acids research*, 46(W1), W296-W303.
- Zloh, M., & Kirton, S. B. (2018). The benefits of in silico modeling to identify possible small-molecule drugs and their off-target interactions. *Future medicinal chemistry*, 10(4), 423-432.