

Universidade de Brasília

Instituto de Ciências Biológicas

Programa de Pós-Graduação em Biologia Molecular

Laboratório de Biologia Teórica e Computacional

Condução de íons pelo canal neuronal Kv1.2 na presença do anestésico geral sevoflurano

Leonardo Cirqueira Pimentel

Orientador: Prof. Dr. Werner Treptow

**Dissertação apresentada como requisito
parcial para conclusão do Mestrado em
Biologia Molecular**

Brasília

2018

Agradecimentos

Primeiramente, agradeço aos meus pais, Ana e Laécio, e ao meu irmão Lucas. Obrigado pela educação, apoio, paciência e respeito. É imensurável o orgulho que sinto por fazer parte dessa família. Desde pequeno vocês estimularam a minha curiosidade e a vontade de tentar entender e explicar o mundo, e este trabalho é consequência disso. A conquista não será só minha, ela pertence a vocês também!

Também agradeço muito à minha namorada Mariana. Pelo seu apoio, compreensão, incentivo e por ser tão companheira e paciente, principalmente na reta final do mestrado. Você é uma pessoa incrível, sua força de vontade e alegria me contagiavam até nos dias mais apertados. Estar contigo sempre me fez querer dar o meu melhor. Muito obrigado meu amor!

Agradecer bastante ao meu orientador Werner, pelos ensinamentos e apoio, além dos momentos de descontração e amizade. Também por conceder a oportunidade de trabalhar com algo que ao mesmo tempo é tão desafiador e satisfatório. Conviver com esse exemplo de profissional é extremamente gratificante e enaltecido para mim.

Aos companheiros do LBTC: Alessandra, Caio, Camila, Fiorote, Letícia, Miguel, Mônica, Natália e Vinícius, pelos momentos de descontração, discussões e ajuda. Vocês formam um ótimo exemplo de que um ambiente de trabalho harmonioso aumenta o gosto pelo que fazemos. Sou muito grato por fazer parte desse time. Devo agradecer principalmente ao Caio, que me ajudou bastante no começo, e à Letícia pela paciência desde a iniciação científica e diversas explicações.

Aos amigos da época de escola e da graduação que torceram por mim e respeitaram minha situação. O convívio com esses ótimos amigos tem grande influência no meu crescimento pessoal.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Molecular, CAPES, FAPDF e CNPq pelo apoio financeiro, que é indispensável pela realização de qualquer atividade.

Por último, quero agradecer à Universidade de Brasília, lugar que tenho muito orgulho de fazer parte e possuo como segundo lar.

Resumo

O uso de anestésicos gerais na medicina é datado em mais de 100 anos. Apesar da evolução da anestesiologia e do uso consolidado dessa classe de fármacos, o mecanismo molecular da anestesia geral ainda é desconhecido. Diversos estudos vêm mostrando que os canais iônicos são os principais alvos dos anestésicos, com um grande número de interações entre ligantes e receptores já caracterizados. Porém, está sendo mostrado que a interação é bastante complexa: existe a presença de múltiplos sítios de ligação, que sofrem influência tanto da concentração de anestésicos quanto da conformação do canal.

O principal objetivo deste trabalho foi estudar a interação do anestésico geral sevoflurano com o canal iônico de potássio dependente de voltagem de mamíferos Kv1.2. Esse par é de muito interesse da medicina atual, pois o sevoflurano é um anestésico bastante utilizado e o Kv1.2 é expresso em neurônios do sistema nervoso central e em células cardíacas, com papel chave em diversos distúrbios.

Experimentos de eletrofisiologia mostram que o sevoflurano leva à uma ativação mais precoce dos canais Kv1.2 e causa um aumento na corrente máxima. Muitos trabalhos vêm tentando clarificar quais são os sítios de ligação do Kv1.2, e estudos envolvendo ferramentas computacionais vêm sugerindo uma ligação do sevoflurano ao poro de condução da proteína. Esse sítio precisa ter sua existência validada, afinal a presença do anestésico nesse local pode atrapalhar a função do Kv1.2.

Para investigar se a ligação é possível, em um primeiro estudo neste trabalho, foram caracterizadas diversos parâmetros físico-químicos de um segmento de membrana, e na sequência as propriedades da migração do sevoflurano da água para a bicamada lipídica. A energia livre de partição mostrou que o anestésico tem maior afinidade pela região anfifílica do interior da membrana, tornando possível o acesso do sevoflurano aos diversos sítios transmembrânicos sugeridos e reduzindo a probabilidade de acesso aos sítios mais hidratados.

Descrições termodinâmicas juntamente com ferramentas computacionais de modelagem molecular permitiram o desenvolvimento de um experimento de competição em condições fisiológicas, que indicaram que a ligação do sevoflurano sob fluxo iônico é pouco provável. Além disso, simulações com voltagem mostraram que mesmo quando ligado ao poro central, o sevoflurano não atrapalha a condução iônica. Esses resultados são de grande importância ao mostrar que a ligação do sevoflurano ao sítio do poro central é uma ligação de pouca probabilidade, e que caso ocorra, o funcionamento do canal não é alterado.

Abstract

The use of general anesthetics in medicine is dated to more than a hundred years. Despite the anesthesiology evolution and the well-established usage of this drug class, the molecular mechanism of general anesthesia is still unknown. Several studies have been showing that the ion channels are the main targets of anesthetics, with a huge and still growing number of characterized receptor-ligand interactions. However, these interactions are complex: there are multiple binding sites, which are influenced by the anesthetic concentration and the channel conformation.

This work main goal was to study the interaction between sevoflurane and the mammal voltage dependant potassium channel Kv1.2. Nowadays medicine is very interested in this interaction pair because sevoflurane is widely used and Kv1.2 is expressed in central nervous system and in heart cells, with a key role in neuronal and cardiac disturbance.

Electrophysiology experiments show that sevoflurane induces an easier channel opening and an increase in Kv1.2 maximum currents. Some studies are trying to clarify what are the binding sites, and a site located in the main pore of the channel is being suggested. This site has to be validated, because the presence of sevoflurane at the main pore of the channel can alter Kv1.2 functioning.

To check if binding is possible, in the first part of this work, there was a physico-chemical characterization of a membrane patch, and later a sevoflurane water-membrane migration free-energy description. The partition free-energy variation shows that the anesthetic has more affinity to the inner membrane amphiphilic region, making it possible for sevoflurane to access several suggested transmembrane sites and reducing binding probabilities to hydrated sites.

Thermodynamic descriptions joined with computational tools of molecular modeling allowed to develop a competition experiment under physiological conditions, which showed that sevoflurane binding to the central cavity is less probable. Furthermore, simulations in the presence of voltage showed that sevoflurane bound at the central cavity did not hinder ionic conduction across the channel. These results are very important, because they show that sevoflurane binding to the central pore is a low probability event, and when it occurs, the channel functioning is not altered.

Índice

1 . Introdução.....	1
1.1 . Potenciais de repouso e potencial de ação.....	1
1.2 . Canais iônicos.....	5
1.3 . Anestesia.....	8
1.3.1 . Anestésicos gerais.....	8
1.3.2 . Sevoflurano.....	10
1.4 . Sevoflurano e Kv1.2.....	11
2 . Objetivos.....	17
2.1 . Objetivo geral.....	17
2.2 . Objetivos específicos.....	17
3 . Teoria e métodos.....	18
3.1 . Simulações de dinâmica molecular.....	18
3.1.1 . Campos de força.....	19
3.1.2 . Condições periódicas de contorno.....	20
3.1.3 . Tratamento de interações de longa distância.....	21
3.1.4 . Integração das equações de movimento.....	22
3.2 . Simulações com diferença de potencial constante.....	23
3.3 . Distância elétrica e excesso de energia.....	25
3.4 . <i>Docking</i> molecular.....	25
3.5 . Cálculos de energia livre por FEP.....	26
3.6 . Constantes de equilíbrio FEP.....	28
3.7 . Parâmetros de ordem do lipídio.....	28
3.8 . Cálculo de energia de partição.....	29
3.9 . Protocolo de criação do sistema reduzido de membrana.....	29
3.10 . Simulações de equilíbrio das conformações do canal Kv1.2.....	30
3.11 . <i>Docking</i> Kv1.2.....	31
3.12 . Protocolo de <i>free energy perturbation</i> (FEP).....	31
3.13 . Protocolo de simulações de condução com sevoflurano.....	32
4 . Resultados e discussão.....	33
4.1 . Sistema de membrana reduzido.....	33

4.2 . Descoberta e validação do sítio do poro central.....	36
4.3 . Análise termodinâmica da competição com K^+	40
4.4 . Dinâmica da interação com voltagem.....	46
5 . Conclusão.....	49
6 . Referências bibliográficas.....	51

Lista de figuras

Figura 1: Ilustração de um neurônio.....	3
Figura 2: Esquema de potencial de ação.....	4
Figura 3: (A) Monômero do Kv1.2 (B) Canal Kv1.2 completo.....	6
Figura 4: Estruturas moleculares de anestésicos inalatórios (A) e intravenosos (B).....	8
Figura 5: Molécula de sevoflurano.....	10
Figura 6: Curvas de corrente voltagem-dependentes do Kv1.2.....	11
Figura 7: Relação condutância-voltagem dos mutantes do Kv1.2.....	12
Figura 8: Equilíbrio conformacional do canal Kv1.2 na presença de sevoflurano.....	13
Figura 9: Projeções tridimensionais dos sítios de ligação.....	14
Figura 10: Moléculas de sevoflurano ocupando a cavidade central.....	15
Figura 11: Esquema de condições periódicas de contorno.....	21
Figura 12: Arquitetura de sistema com diferença de potencial elétrico.....	23
Figura 13: Visão dos sistemas lipídicos na fase inicial (A) e na fase final (B).....	33
Figura 14: Densidade dos grupos da membrana de POPC.....	34
Figura 15: Parâmetro de ordem ($-S_{cd}$) por carbono.....	35
Figura 16: Resultados da simulação de ABF.....	36
Figura 17: Soluções sugeridas pelo <i>docking</i> para as conformações fechada (A) e aberta (B).....	37
Figura 18: Sítios de interação sugeridos pelo <i>docking</i>	38
Figura 19: Posição do carbono-2 do sevoflurano nas trajetórias de FEP.....	40
Figura 20: Esquema de cálculo de energia para a ligação do íon no sítio central.....	41
Figura 21: Ciclo de três estados para a ligação do K^+ e sevoflurano.....	41
Figura 22: Região utilizada para os cálculos de distância elétrica.....	42
Figura 23: Perfil de distância elétrica do poro do canal Kv1.2	43

Figura 24: Soluções sugeridas pelo <i>docking</i> do canal Kv1.2 com K ⁺	44
Figura 25: Posição do carbono-2 do sevoflurano nas trajetórias de FEP.....	45
Figura 26: Ciclo termodinâmico dos quatro estados possíveis.....	46
Figura 27: Perfil eletrostático médio $\phi(z)$	47
Figura 28: Trajetória de íons K ⁺ difundindo através do poro de condução do Kv1.2.....	47
Figura 29: Coordenadas em z ao longo tempo do sevoflurano e dos íons K ⁺	48
Figura 30: Trajetória do sevoflurano saindo do sítio da cavidade central.....	48

Lista de tabelas

Tabela 1: Concentrações iônicas e potencial de repouso associados.....	2
Tabela 2: Dados do sítio da cavidade central obtidos do <i>docking</i> do sevoflurano no Kv1.2	39
Tabela 3: Dados dos cálculos de FEP para o sítio da cavidade central.....	40
Tabela 4: Variações de energia obtidas.....	41
Tabela 5: Propriedades obtidas no FEP do sevoflurano na cavidade central com K ⁺	45

Lista de abreviações

ABF – *adaptative biasing force*

CC – cavidade central

DM – dinâmica molecular

FEP – *free energy perturbation*

MSF – *mean square fluctuation*

POPC – 1-palmitoil-2-oleoil-sn-glicero-3-fosfatidilcolina

SF – filtro de seletividade

SNC – sistema nervoso central

SOS – *simple overlap sampling*

VSD – domínio sensor de voltagem

$V_{1/2}$ - voltagem necessária para ativar metade da população de canais

ΔV - diferença de potencial elétrico

δ_c - distância elétrica

1 . Introdução

1.1 . Potenciais de repouso e potencial de ação

Uma das propriedades fundamentais das células é a capacidade de transmitir sinais através de propriedades químicas e físicas. Esses sinais transmitidos inter ou intracelularmente desencadeiam respostas às células receptoras, que podem ativar, superativar ou inibir certos processos e maquinarias celulares após a detecção desse estímulo. Os sinais podem ser químicos, como a interação de um hormônio com receptor, ou físicos, como a propagação de potenciais elétricos¹.

A membrana celular eucariótica é composta principalmente por uma bicamada lipídica, possuindo diversas funções, como dar forma à célula, sinalizar o estado celular e ancorar proteínas. Uma característica físico-química marcante da membrana celular é sua lipofilicidade, que impõe uma alta barreira energética aos compostos polares para ultrapassá-la, como água e íons, impedindo qualquer travessia espontânea desses compostos por difusão simples. Isso faz com que a membrana celular tenha papel chave na compartimentalização da célula, separando com bastante eficiência dois ambientes. Cada compartimento da célula possui uma determinada concentração iônica. Por exemplo: em condições normais a concentração do íon potássio (K^+) é maior dentro do que fora da célula. O transporte do íon de um compartimento A para o compartimento B, possui um custo energético relacionado com as diferenças de concentração, chamado de diferença de potencial químico ($\Delta\bar{G}_{A\rightarrow B}$), explicitado na expressão

$$\Delta\bar{G}_{A\rightarrow B} = RT \ln \frac{[X_B]}{[X_A]}$$

em que R é a constante dos gases (8,314 JK⁻¹mol⁻¹), T é a temperatura do sistema em Kelvin, $[X_B]$ e $[X_A]$ são as concentrações da espécie iônica X nos compartimentos B e A, respectivamente.

Como os íons também possuem carga, seu transporte na presença de uma diferença de potencial elétrico ou voltagem, gera uma variação energética no sistema, denominado como trabalho elétrico. O trabalho elétrico $W_{A\rightarrow B}$ é diretamente proporcional à carga do íon q_x e a diferença de potencial elétrico $\Delta V = V_B - V_A$ entre os ambientes A e B, como mostrado na expressão

$$W_{A\rightarrow B} = zF(V_B - V_A)$$

onde z é a valência do íon, F é a constante de Faraday (96,486 C/mol) e $V_B - V_A$ a diferença de voltagem entre os compartimentos B e A.

Assim, o transporte de um íon é influenciado por essas duas contribuições juntas, resultando no potencial eletroquímico $\Delta\bar{G}^{eq}$. O valor resultante desse potencial é que determina a espontaneidade do transporte iônico entre compartimentos, como mostrado abaixo:

$$\Delta\bar{G}_{A\rightarrow B}^{eq} = \Delta\bar{G}_{A\rightarrow B} + W_{A\rightarrow B} = RT \ln \frac{[X_B]}{[X_A]} + zF(V_B - V_A)$$

Quando $\Delta\bar{G}_{A\rightarrow B}^{eq} < 0$, o transporte de A para B é favorável. O contrário ocorre quando $\Delta\bar{G}_{A\rightarrow B}^{eq} > 0$. No caso de $\Delta\bar{G}_{A\rightarrow B}^{eq} = 0$, os compartimentos A e B estão em equilíbrio em relação à espécie iônica X.

É importante notar que o equilíbrio em uma componente não assegura o equilíbrio em outra: um ambiente pode não ter diferença entre concentrações, porém pode haver um campo elétrico, ou ainda um ambiente sem diferença de potencial elétrico pode ter diferença entre concentrações. Assim, é possível determinar um potencial de repouso de membrana V_{eq} onde o potencial químico é contrabalanceado pelo trabalho elétrico, deixando o íon em equilíbrio. Esse potencial V_{eq} , denominado como potencial de equilíbrio do íon, pode ser encontrado pela equação de Nernst:

$$V_{eq}^{ion} = \frac{RT}{zF} \ln \frac{[X_B]}{[X_A]}$$

A membrana celular, por impedir a passagem de espécies iônicas com o ambiente extracelular, causa uma diferença de voltagem que é proporcional à diferença das cargas de dentro pelas cargas de fora da célula. Esse saldo, chamado de potencial de repouso, varia entre -60mV e -70mV, já que em geral, o interior celular possui muitas moléculas orgânicas negativamente carregadas (proteínas, DNA e RNA).

Para cumprir certas funções, as células precisam manter gradientes químicos para cada espécie iônica. Algumas soluções iônicas estão mais concentradas intracelularmente, enquanto outras são mais concentradas no meio extracelular. Por exemplo, em células musculares a concentração dentro da célula de K^+ é maior que a extracelular, enquanto a de Na^+ é menor. Assim, cada íon possui seu respectivo potencial de equilíbrio, como ilustrado na tabela 1, que traz os potenciais de um axônio gigante de lula.

Tabela 1: Concentrações iônicas e potencial de repouso associados num axônio gigante de lula. Adaptada de Kandel, Principles of Neural Science (2013., p. 129).

Íon	Concentração extracelular (mM)	Concentração intracelular (mM)	Potencial de equilíbrio (mV)
Na^+	440	50	55
K^+	20	400	-75
Cl^-	560	52	-60

É importante notar que poucos íons possuem seu potencial de equilíbrio na faixa do potencial de repouso da célula. Dessa maneira, os íons tendem a mudar de compartimento até atingir seu respectivo potencial de repouso. Porém, para atravessar a membrana é necessário superar uma barreira de energia livre muito alta, que nas condições normais de uma célula os íons não possuem. Existem proteínas, chamadas de canais iônicos, que são ancoradas na membrana e oferecem um ambiente de permeação para a travessia dos íons. Esses canais permitem ao íon mudar de compartimento, além de proibirem que outras espécies iônicas, por mais que tenham a mesma valência, passem por esse caminho de permeação.

Os canais iônicos selecionam diversos tipos de íons, como K^+ , Na^+ e Ca^{2+} , e podem ser sensíveis a diversos estímulos físicos ou químicos, desencadeando uma resposta específica, como ativação ou inibição dos canais iônicos. Cada tipo de célula possui uma população específica de canais iônicos, além de serem distribuídos em regiões determinadas na célula.

Os neurônios (figura 1) são células presentes no sistema nervoso, onde são os principais responsáveis pela comunicação precisa e rápida com outras células do corpo. Possuem uma morfologia assimétrica, onde numa extremidade estão os dendritos, local de recepção de sinais, e na outra extremidade estão presentes os axônios, responsáveis pela condução e transmissão do sinal nervoso para outra célula. Essa assimetria garante a unidirecionalidade da condução.

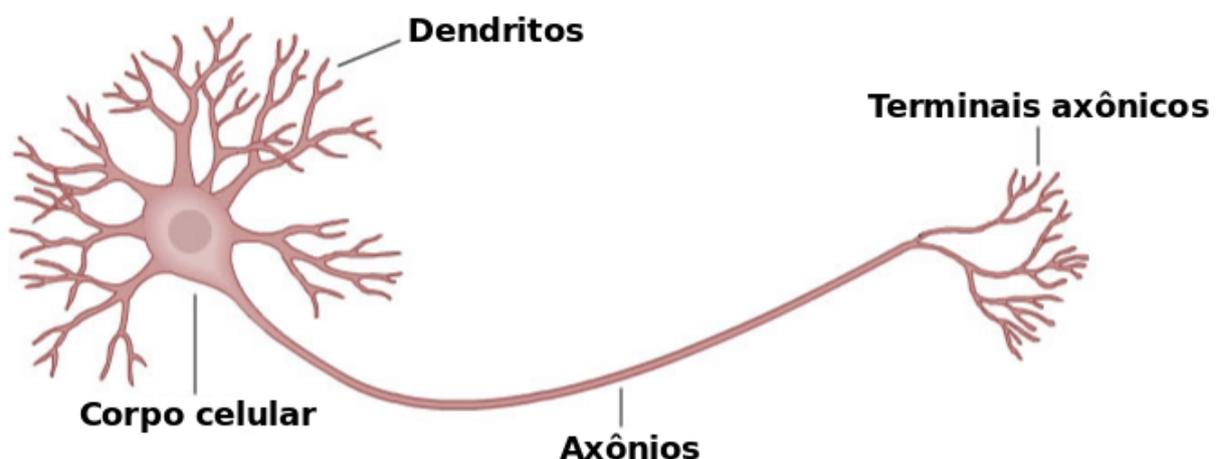


Figura 1: Ilustração de um neurônio. Os sinais são recebidos pelos dendritos, onde passam pelo corpo celular e são conduzidos pelos axônios, até seguirem para a próxima célula. Adaptado de https://online.science.psu.edu/bisc004_activewd001/node/1907. Acesso em 06/03/2018.

A criação e transdução desse sinal se deve pelo fato dos neurônios serem células excitáveis: os canais iônicos presentes em sua membrana permitem o fluxo de íons inorgânicos através da membrana, criando uma corrente elétrica que altera o potencial da membrana. Essa alteração induz

sucessivas correntes iônicas, denominadas de potenciais de ação, que são transmitidas ao longo de todo axônio de uma forma característica.

O potencial de ação é um sinal elétrico transmitido pelas células neuronais, composto por correntes elétricas que se propagam ao longo do neurônio, como demonstrado na figura 2. Inicialmente, o potencial de ação é gerado após o potencial de membrana neuronal atingir um limiar, cerca de -50mV , onde os canais iônicos de sódio sensíveis a voltagem (Na_v) começam a ser ativados e permitem o influxo de sódio. Nessa fase, chamada de despolarização, o influxo de Na^+ segue até o potencial do neurônio atingir o valor do potencial de repouso do sódio ($V_{eq}^{\text{Na}^+} = +55\text{mV}$, no caso do axônio gigante de lula). Porém, a medida que o potencial da célula atinge os valores máximos, os canais Na_v são gradativamente inativados, e os canais de potássio sensíveis a voltagem (K_v) são ativados de maneira tardia, permitindo os íons K^+ saírem da célula, e por consequência diminuírem o potencial de membrana ($V_{eq}^{\text{K}^+} = -75\text{mV}$, no caso do axônio gigante de lula). Essa fase é chamada de repolarização. Como os canais K_v são de inativação lenta e o potencial de Nernst para o K^+ é menor que o potencial de repouso, ocorre a hiperpolarização, um efluxo excessivo de K^+ , que deixa a célula com potencial de membrana menor do que no início do potencial de ação até o fechamento completo dos canais de potássio.

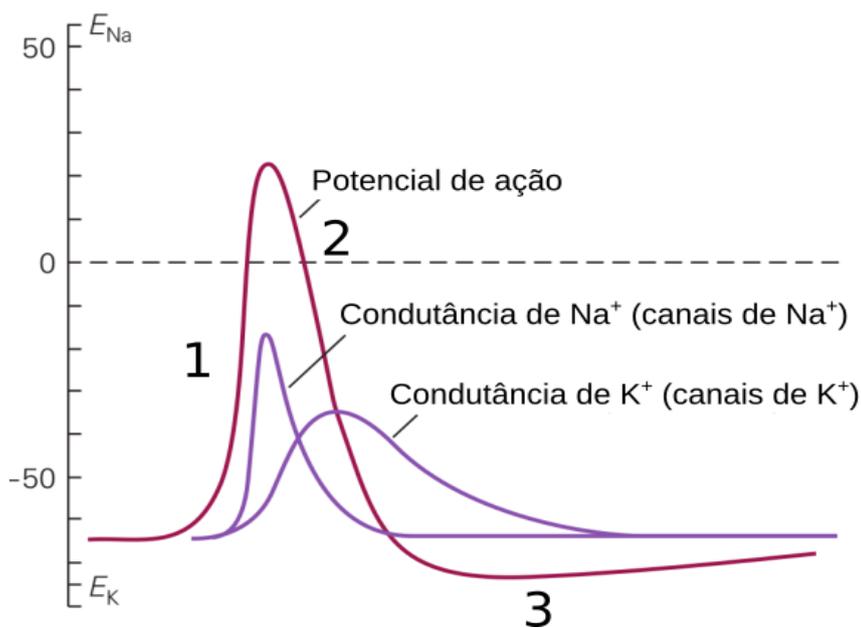


Figura 2: Esquema de potencial de ação. Na etapa 1, os canais de sódio são abertos após o potencial de membrana atingir o limiar. Na fase 2, os canais de Na^+ são inativados pela voltagem e os canais de K^+ começam a se ativar, restaurando o potencial da célula. Na fase 3, ocorre a repolarização, uma diminuição excessiva da voltagem devido à inativação lenta dos canais K_v . E_{Na} e E_{K} são os potenciais de repouso do sódio e potássio no axônio gigante de lula, respectivamente $+55\text{mV}$ e -75mV . Figura adaptada de Kandel, Principles of Neural Science (2013, p. 158).

O potencial de ação é um sinal biológico de características peculiares: é transmitido em longas distâncias de maneira rápida e sem decremento no sinal; possui característica de “tudo ou nada”, ou seja, quando disparado, sua forma é sempre igual; e possui um período refratário, onde a intensidade da hiperpolarização influencia a velocidade de disparo do próximo potencial.

1.2 . Canais iônicos

Os canais iônicos são proteínas que possuem a capacidade de permitir a travessia de íons através da membrana. No geral, possuem um poro de condução transmembrânico, responsável por fornecer o caminho de condução e selecionar a espécie iônica. Mudanças conformacionais nesse poro de condução controlam se o canal deverá estar aberto ou fechado, e por consequência se a passagem do íon está permitida. Esse mecanismo de controle a nível do poro é chamado de *gating*, que pode ser diretamente influenciado por outros domínios do canal iônico sensíveis às mudanças do ambiente celular, como mudanças de pH², voltagem³⁻⁵, tensão de membrana^{6,7}, temperatura⁸ e presença de moléculas orgânicas⁹, por exemplo.

Dentre as diversas classificações de canais iônicos, existe a superfamília dos canais iônicos sensíveis a voltagem. Os membros possuem a capacidade de serem ativados ou inativados de acordo com o potencial elétrico da célula. Os canais dessa família são classificados de acordo com o íon selecionado: Ca_v (seletivos a cálcio), Na_v (seletivos a sódio), K_v (seletivos a potássio) e HCN (seletivos a cátions). E ainda possuem um arranjo tetramérico (quatro subunidades associadas) ou pseudotetramérico (uma subunidade que possui quatro repetições).

O canal iônico de potássio sensível a voltagem Kv1.2 é um canal iônico presente em mamíferos, expresso principalmente no cérebro¹⁰ e coração¹¹. O canal Kv1.2 é ativado majoritariamente na repolarização do potencial de ação, tendo influência na recuperação do potencial de repouso e na hiperpolarização. Além disso, estudos vem comprovando a importância do canal em diversos distúrbios, tais como: arritmia¹², epilepsia¹³ e distúrbios de dor¹⁴. A importância do Kv1.2 para todo o organismo é evidenciada por modelos *in vivo*: ratos com nocaute do gene do Kv1.2 morreram antes de completar a maturação sexual¹⁵.

Valores de corrente iônica podem ser medidos em altíssima precisão espacial pelo experimento de *patch clamp*, onde uma pipeta de registro é aderida à célula, manter ΔV num valor desejável, e na sequência aferir a corrente iônica que passa pelo canal. Devida à alta precisão da técnica, as correntes registradas costumam ser equivalentes às correntes de um único canal iônico. Uma peculiaridade revelada pelo *patch clamp* é a presença de pequenas correntes, menores que as de condução iônica, quando a membrana encontrava-se despolarizada¹⁶. Essas correntes são

resultado da reorientação de aminoácidos carregados do Kv1.2 quando submetidos a um campo elétrico, e são denominadas de *gating currents*. É possível saber a quantidade total de cargas que se movimentaram através da integração das *gating currents* pelo tempo. As cargas são denominadas como *gating charges* (ΔQ) e oferecem informações importantes acerca do mecanismo de ativação da proteína: para passar do estado fechado para o aberto, cerca de 14 cargas elementares do Kv1.2 devem se movimentar^{17,18} ($\Delta Q = 14e$).

Os detalhes estruturais do Kv1.2 foram revelados após a resolução de sua estrutura cristalográfica¹⁹. É uma proteína tetramérica, e assim como na topologia geral dos canais sensíveis a voltagem, cada subunidade possui seis hélices S1-S6, onde S5 e S6 formam o domínio do poro e S1-S4, o domínio sensor de voltagem (VSD). Quando aberto, o lúmen do poro provê um caminho hidrofílico para a travessia dos íons, permitindo a difusão sem maiores custos energéticos. O estado fechado é caracterizado quando o canal encontra-se constricto e impede a passagem dos íons por fixar uma barreira energética muito grande²⁰. Vale ressaltar que as hélices S1-S3 permanecem estáveis, oferecendo o ambiente hidrofílico para a estabilização das ligações iônicas do interior do VSD.

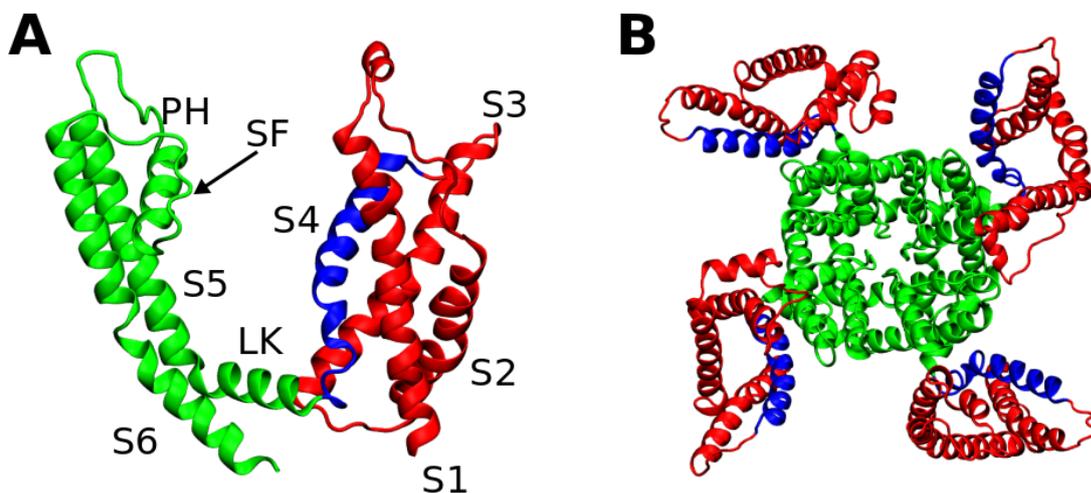


Figura 3: (A) Monômero do Kv1.2 . O domínio do poro está representado em verde, com as hélices S5, S6 e *linker*(LK), filtro de seletividade (SF) e hélice do poro (PH). Em vermelho está o domínio sensor de voltagem, com as hélices S1-S4, onde a S4 está destacada em azul. (B) Vista do lado extracelular da tetramerização de A, o canal Kv1.2 completo.

A medida em que o íon segue o caminho de condução, ele encontra o filtro de seletividade (SF), que é responsável por permitir a passagem apenas do íon desejado (no caso do Kv1.2, íons K^+). O filtro de seletividade de canais de potássio é composto pela sequência altamente conservada TVGYG²¹, onde os átomos de oxigênio da cadeia principal desses aminoácidos simulam a camada de solvatação do K^+ , permitindo a passagem somente desse íon e de moléculas de água. Vale

ressaltar que o SF do Kv1.2 não seleciona outros cátions monovalentes, como o Na⁺, que apesar de possuírem a mesma carga, a diferença nos raios atômicos parece ser decisiva na seleção do íon.

O domínio sensor de voltagem é composto pela associação das hélices S1-S4, e possui diversos resíduos carregados, destacando-se quatro argininas na hélice S4 (R₁ - R₄) e resíduos negativamente carregados de S1-S3. Mutações pontuais em resíduos carregados mostram a importância das argininas R₁ - R₄ no mecanismo de sensibilidade à voltagem²², além da redução de ΔQ após as mutações, mostrando que movimentações da hélice S4 estão envolvidas no mecanismo de ativação por voltagem.

Após a disponibilização da estrutura cristalográfica do Kv1.2¹⁹ foi possível entender a nível atômico-molecular a organização do VSD. O arranjo das hélices S1-S4 possui forma de ampulheta, onde os resíduos carregados dessas hélices (incluindo R₁ - R₄) e os aminoácidos negativamente carregados estão voltados para o centro, formando um ambiente hidrofílico, que permite a permeação de moléculas de água para dentro do VSD. Porém, o aminoácido F²³³, realiza uma constrição hidrofóbica no centro do VSD, impedindo que aconteça uma travessia de água ou íons entre as soluções intracelular e extracelular, mantendo inalterado o potencial eletroquímico da membrana.

Como foi demonstrado que a estrutura cristalográfica do Kv1.2 estava na conformação aberta⁴, diversos esforços surgiram para encontrar uma caracterização do estado fechado e o mecanismo de desativação do Kv1.2. Um modelo bastante aceito determina que a inativação do VSD se dá pelo movimento para baixo da S4, com as argininas R₁ - R₄ movimentando-se para baixo do resíduo F²³³, que agia como uma espécie de sítio catalítico da movimentação da S4²³. Essas observações de deslocamento de cargas da proteína são semelhantes às medidas de ΔQ obtidas experimentalmente e são coerentes com estudos demonstrando o papel chave da F²³³ no mecanismo de funcionamento do VSD²⁴. Além disso, esse modelo é bastante compatível com a hipótese *transporter*²⁵, já que valores de corrente são consequências de pequenos movimentos de cargas num campo elétrico altamente focalizado. O mecanismo de ativação foi descoberto após uma longa simulação com aplicação de ΔV e consiste na movimentação da S4 para cima, com as argininas R₁ - R₄ atravessando a região delimitada por F²³³²⁶. Vale ressaltar que as hélices S1-S3 permanecem estáveis, oferecendo o ambiente hidrofílico para a estabilização das ligações iônicas do interior do VSD.

Para o funcionamento correto do canal, as mudanças causadas pela voltagem no VSD precisam ser acopladas às mudanças no poro de condução. Essa conexão é realizada pela hélice *linker*, situada entre S4 e S5. A importância do *linker* já foi mostrada em trabalhos envolvendo mutações sítio-dirigidas. Após a descoberta dos detalhes estruturais do mecanismo de ativação do

Kv1.2, ficou evidente a importância dessa hélice: a ascensão da S4 tensiona o *linker*, que perturba a conformação fechada do poro e permite a entrada de água em seu interior, tornando o canal condutivo.

1.3 . Anestesia

1.3.1 . Anestésicos gerais

Os anestésicos gerais são fármacos utilizados há mais de 150 anos na medicina, os quais possibilitaram a realização de diversos procedimentos médicos considerados muito difíceis até

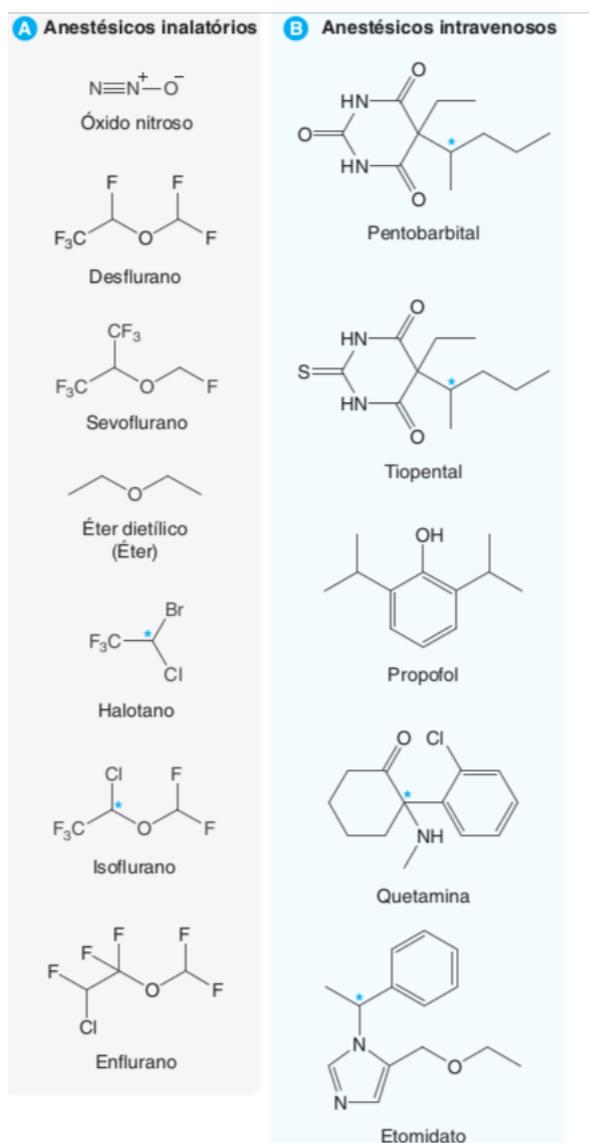


Figura 4: Estruturas moleculares de anestésicos inalatórios (A) e intravenosos (B). O asterisco azul marca os carbonos quirais da estrutura, caso existam. Retirado de Golan, Princípios de farmacologia: a base fisiopatológica da farmacoterapia (2009, p. 233).

então. O estado de anestesia geral é caracterizado pela perda da percepção de todas as sensações, da consciência, de memória e de movimentos, entretanto, apesar de todos os sintomas causados, esse estado consegue ser revertido em poucos minutos. A classificação dos anestésicos gerais se dá em relação à via de administração, podendo ser anestésicos inalatórios ou anestésicos intravenosos. Os inalatórios possuem maior potência, sendo comumente usados para manter a anestesia enquanto os intravenosos são utilizados para a indução rápida. A classe dos anestésicos gerais é composta por um grande conjunto de pequenas moléculas, como sevoflurano, óxido nitroso, tiopental, propofol e quetamina, como mostrado na figura 4.

Não existe entre os anestésicos gerais um farmacóforo nem características estruturais em comum. Porém, há uma propriedade físico-química comum a todos eles, que é um fator determinante para a ação do anestésico geral, a lipofilicidade. Por exemplo, para anestésicos inalatórios, a anestesiologia utiliza-se de um predictor baseado na solubilidade do anestésico

em solventes apolares, a regra de Meyer-Overton. Essa regra estabelece uma relação direta entre a dose efetiva do anestésico e a quantidade de volume de gás solubilizado em solvente apolar. Quanto maior o fator de solubilidade apolar, maior a potência do anestésico para induzir a anestesia geral.

Em contraste à ampla descrição farmacológica, dos avanços da anestesiologia, e uso frequente na medicina, os mecanismos de funcionamento dos anestésicos gerais ainda são desconhecidos. Atualmente, diversos estudos mostram que a presença dos anestésicos modula os canais iônicos de diversos tipos localizados no cérebro, como receptores de neurotransmissores²⁷, canais sensíveis a voltagem^{28,29} e canais constitutivamente abertos³⁰. Alguns exemplos são os receptores de glicina, seletivos ao íon cloreto, os canais sensíveis a voltagem de sódio e potássio e os canais de potássio K2P. Esse amplo espectro de interação vem sendo constantemente complementado por estudos de eletrofisiologia envolvendo sistemas reduzidos (canal iônico e anestésico), que mostram efeitos de ativação a inibição, dependendo do par anestésico-receptor. Visto a grande quantidade de anestésicos, canais iônicos cerebrais que interagem e o efeito causado em cada canal, além da heterogeneidade das células no cérebro, o estudo da anestesia mostra-se cada vez mais complexo, principalmente para a compreensão a nível de tecidos e sistemas. Dessa maneira, estudos *in vivo* com modelos animais vêm demonstrando o papel chave dos canais iônicos no surgimento e manutenção do estado de anestesia geral: ratos com nocaute no gene do canal K2P TREK-1 tornaram-se resistentes à ação dos anestésicos gerais halotano e isoflurano³¹; Em outro estudo envolvendo ratos, o estado de anestesia dos roedores foi revertido após a infusão de anticorpos específicos ao canal iônico Kv1.2³².

A caracterização macroscópica das interações é apenas um primeiro passo para um melhor esclarecimento da farmacodinâmica dos anestésicos gerais. O caminho dos anestésicos é bem definido: os anestésicos se difundem passivamente do sangue para a membrana celular (característica condizente com a regra de Meyer-Overton), seu principal reservatório. Porém, ainda é necessário entender como essas moléculas causam as mudanças registradas em experimentos de eletrofisiologia. Atualmente, existem duas grandes hipóteses que tentam explicar os efeitos causados pelos anestésicos. Uma delas é a hipótese do efeito indireto, que afirma que os anestésicos, após a partição na membrana celular, causam perturbações nas propriedades físico-químicas na membrana, que acabam alterando o funcionamento de proteínas do neurônio de maneira inespecífica. Apesar da presença dos anestésicos alterar propriedades da membrana, como o volume³³⁻³⁵, o parâmetro de ordem e o perfil de pressão lateral (resultados não publicados), essa hipótese possui diversas falhas específicas. Muitas dessas mudanças não são significativas em concentrações utilizadas nos procedimentos médicos (concentrações fisiológicas), além de que elas conseguiriam ser alcançadas apenas por aumento da temperatura²⁰. A inespecificidade preconizada

nessa hipótese também não faz sentido com o fato de alguns canais iônicos serem sensíveis à alguns anestésicos e serem insensíveis a outros³⁶. A diversidade estrutural entre as moléculas também não consegue ser bem descrita à luz da hipótese do efeito indireto: álcoois de cadeias longas, que de acordo com a regra de Meyer-Overton possuiriam mais efeito anestésico, não possuem atividade anestésica³⁷, pequenas substituições de grupos químicos em anestésicos causam sua perda de efeito³⁸, e existem diferenças de potência entre enantiômeros, por mais que possuam a mesma solubilidade em solventes apolares³⁹.

Outra hipótese é que a ação dos anestésicos ocorre pela interação direta com sítios proteicos. A crescente caracterização dos alvos moleculares de anestésicos fornece muitas informações para testar essa hipótese. Já foi mostrado que numa mesma subfamília de canais iônicos a sensibilidade a anestésicos não ocorre em todos os membros³⁰, foram descobertos truncamentos³⁰ e mutações pontuais⁴⁰ que alteram a sensibilidade aos anestésicos. Estudos utilizando ferramentas computacionais apontam a presença de sítios de interação de anestésicos em canais iônicos de eucariotos^{29,40,41} e até de procariotos^{42,43}. Experimentos envolvendo cristalografia de raio-X⁴⁴ e ligação irreversível de anestésicos modificados^{45,46} mostram que os anestésicos permanecem em múltiplos sítios da proteína. Apesar das diversas evidências, a interação direta de anestésicos em canais iônicos mostra-se altamente complexa, diferindo completamente dos casos simples de um substrato e um sítio de ligação, já que a presença de diversos sítios com suas respectivas afinidades, a competição com a membrana, o tipo de anestésico, a concentração do anestésico e até a conformação do canal influenciarão no entendimento deste mecanismo.

1.3.2 . Sevoflurano

O sevoflurano é um haloéter utilizado como anestésico geral inalatório (figura 5). É um anestésico produzido sinteticamente, e é amplamente utilizado nos procedimentos médicos, principalmente na pediatria. É considerado um anestésico de ação rápida e potente. Experimentos *in vitro* mostram que o sevoflurano interage com canais iônicos, tanto eucarióticos quanto procarióticos, exibindo diversos tipos de modulação, como inibição de canais de sódio sensíveis a voltagem⁴⁷ e ativação de canais de potássio^{29,40}.

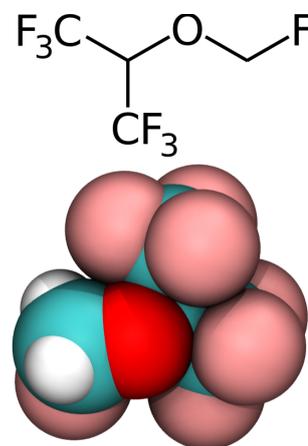


Figura 5: Molécula de sevoflurano.
Rosa - flúor;
Vermelho – oxigênio
Ciano – carbono;
Branco - hidrogênio.

1.4 . Sevoflurano e Kv1.2

Um dos modelos utilizados atualmente para a compreensão do mecanismo dos anestésicos é a interação do sevoflurano com o canal Kv1.2. Como dito anteriormente, esse canal iônico sensível a voltagem é expresso em tecidos do sistema cardiovascular e sistema nervoso central (SNC), além de ser alvo de diversos anestésicos. Encontrar a explicação da interação molecular entre o Kv1.2 e o sevoflurano é de grande interesse da farmacologia atual. Experimentos de eletrofisiologia mostram que 1mM de sevoflurano causa uma potenciação no canal Kv1.2, composta tanto pela ativação do canal, já que a voltagem necessária para ativar metade da população de canais ($V_{1/2}$) é alterada em -4mV, quanto um aumento na condutância máxima do canal, onde houve um incremento de 13%⁴⁰.

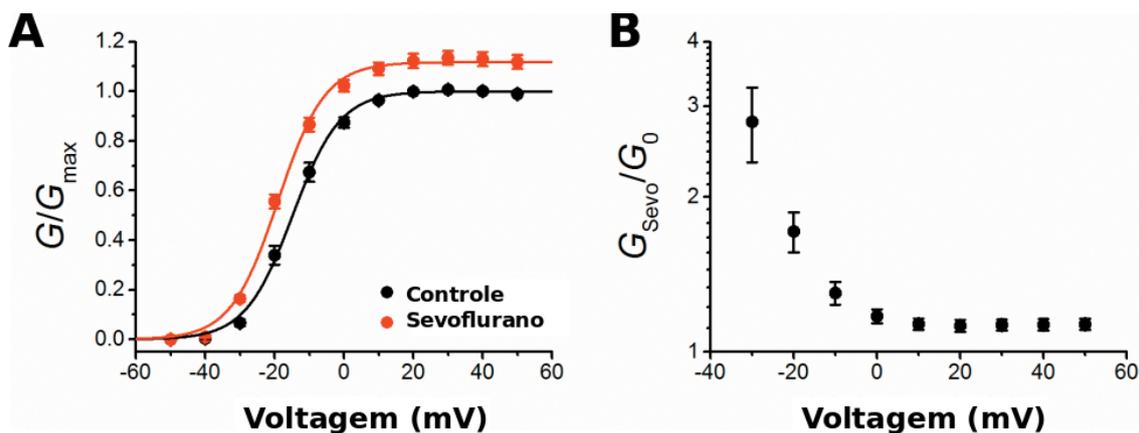


Figura 6: (A) Curvas de corrente voltagem-dependentes do Kv1.2 sem sevoflurano (preto) e com 1mM de sevoflurano (vermelho) normalizadas pela corrente máxima do canal sem a presença do anestésico. (B) Razão entre a corrente do Kv1.2 com sevoflurano (G_{sevo}) e sem sevoflurano (G_0) em função da voltagem. Adaptada de Liang et.al⁴⁰.

Numa busca por aminoácidos chave para a ligação do sevoflurano ou do mecanismo de ativação, diversas substituições foram realizadas no Kv1.2⁴⁰. Cinco substituições da sequência do *linker* do Kv1.2 para a sequência do *linker* do canal Kv de drosófila K-Shaw2 (mutante Kv1.2-FRAKT) levaram a um estado mais sensível ao sevoflurano, com uma alteração de $V_{1/2}$ em cerca de -15mV e corrente máxima 200% maior em comparação à solução controle (figura 7). Uma mutação pontual presente no *linker*, G329T, também gera um comportamento semelhante ao Kv1.2-FRAKT. Essas mutações evidenciam a importância da hélice *linker* no mecanismo de ativação do Kv1.2 por sevoflurano, tanto como um possível sítio de ligação do anestésico como por ser a região que acopla mudanças no VSD e poro de condução.

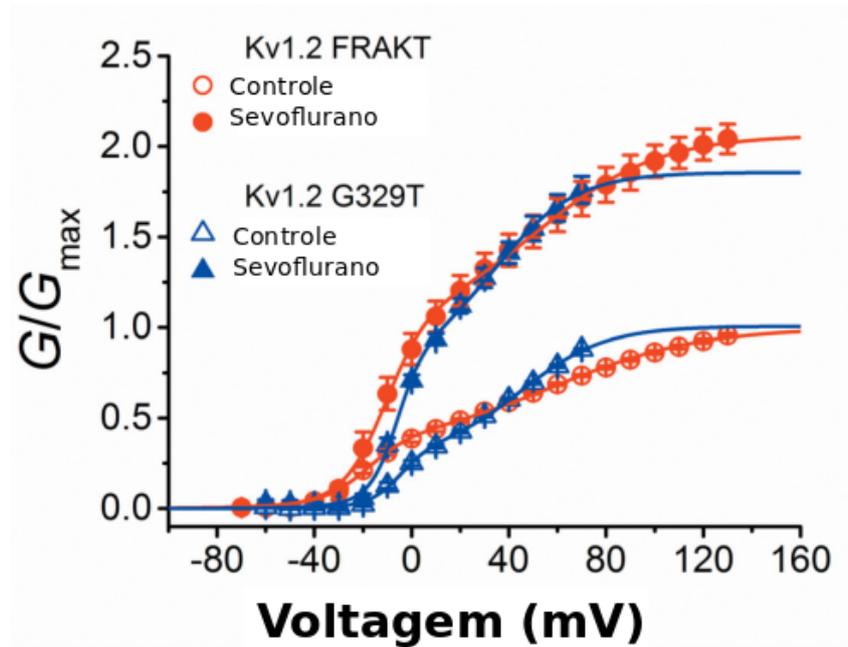


Figura 7: Relação condutância-voltagem dos mutantes do Kv1.2 a 1mM de sevoflurano (símbolos preenchidos) e sem sevoflurano (símbolos vazios). Adaptada de Liang et. al⁴⁰.

Diversos modelos tem como objetivo explicar a ativação do Kv1.2 pelo sevoflurano. Um dos modelos propostos é um modelo minimalista de ligação conformação-dependente do sevoflurano. Primeiramente, é estabelecido que na ausência de anestésicos, existe um equilíbrio dirigido por ΔV entre a conformação aberta e fechada. À medida que ΔV aumenta, a população do canal Kv1.2 aberto torna-se mais abundante. Esse modelo preconiza que a presença do anestésico faz com que o equilíbrio entre os estados aberto e fechado seja perturbado, favorecendo o estado aberto (figura 8).

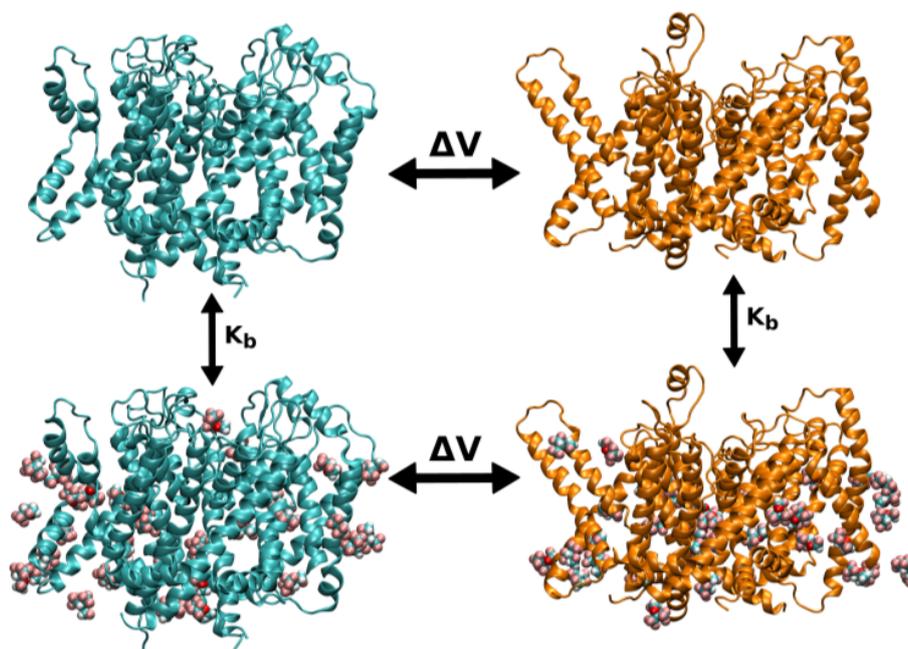


Figura 8: Equilíbrio conformacional do canal Kv1.2 na presença de sevoflurano. Em ciano está representado o canal fechado e em laranja o canal aberto.

Porém, a descrição desse equilíbrio entre estados não é trivial. Estudos dão suporte à ideia de que os anestésicos gerais se ligam diretamente às proteínas⁴⁴, em baixas concentrações^{42,45,48} e em múltiplos sítios^{40,41,46,48,49}. Em face à essa complexidade, foi sugerido um ciclo de múltiplos estados, que leva em conta os estados de ocupação das conformações aberta e fechada, onde a probabilidade de ocorrência da conformação é dependente da constante de ligação generalizada para esse estado.

Trabalhos anteriores já mostram a relação entre energia livre de ligação e constante de ligação⁵⁰. Recentemente, foi desenvolvido um ferramental teórico para a obtenção da constante de ligação a partir de múltiplas energias, adequando-se à situação de múltiplos sítios da interação do Kv1.2 e sevoflurano⁴⁸. Munido das constantes, é possível realizar projeções, para qualquer concentração, de diversas propriedades da interação, como probabilidades de estados, validação do sítio e até projeções de densidade. Foi realizada uma extensa caracterização e validação de diversos sítios sugeridos pela ferramenta de *docking* do sevoflurano no Kv1.2, e após o cálculo das constantes de ligação dos sítios, foi possível realizar projeções tridimensionais para diversas concentrações (figura 9), tanto para a conformação aberta quanto para a fechada (realizado por colaboradores – dados em fase de publicação).

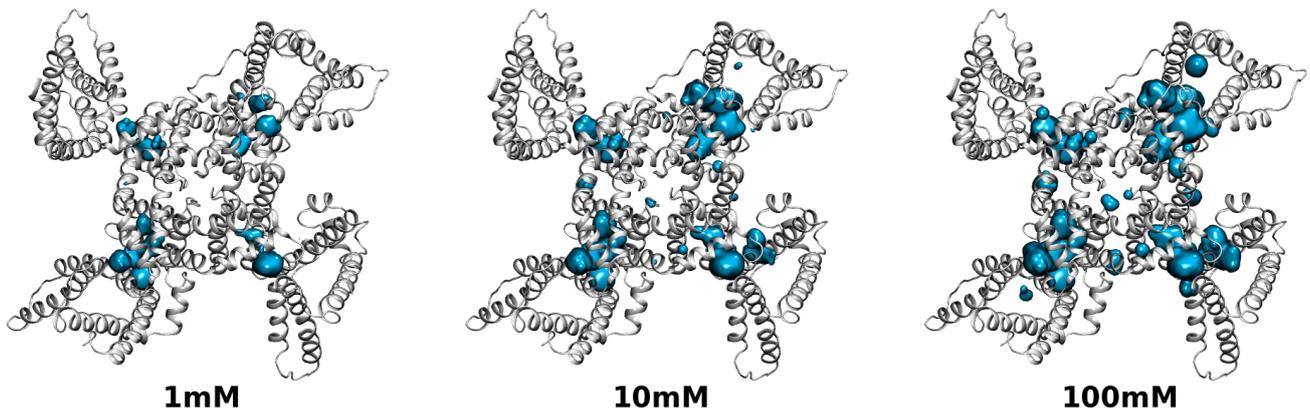


Figura 9: Vista intracelular do canal Kv1.2 com as projeções tridimensionais dos sítios de ligação de sevoflurano para diversas concentrações. Cedido por Letícia Stock (dados em fase de publicação).

As regiões de alta densidade são os sítios de ligação, que em condições diluídas estão concentrados apenas na região transmembrânica, mas com o aumento da concentração, outros sítios começam a ser ocupados. Dentre os diversos sítios, um sítio merece atenção especial: o sítio localizado no poro de condução da proteína, que possui densidades consideráveis a partir de concentração de 10mM. Esse sítio é corriqueiramente sugerido em estudos de interação de uma série de anestésicos gerais em diversos canais iônicos, como no *docking* realizado neste trabalho e por estudos envolvendo canais de sódio⁵¹. Porém, o *docking* não considera as moléculas de água e íons presentes no sistema, o que leva ao surgimento de falsos positivos. Simulações de *flooding*, que são simulações de dinâmica molecular (DM) do canal iônico com moléculas de anestésico, do sevoflurano e isoflurano a 150mM cada, mostraram que a cavidade central (CC) da proteína aberta estava ocupada por 8 ligantes em média (figura 10). Nessa simulação foi utilizada uma concentração maior que a fisiológica para acelerar a amostragem de migração dos anestésicos para os sítios. Entretanto, essa condição de alta concentração causa alguns artefatos nos resultados sugeridos, por causa da agregação de moléculas ou de escalas de tempo insuficientes.

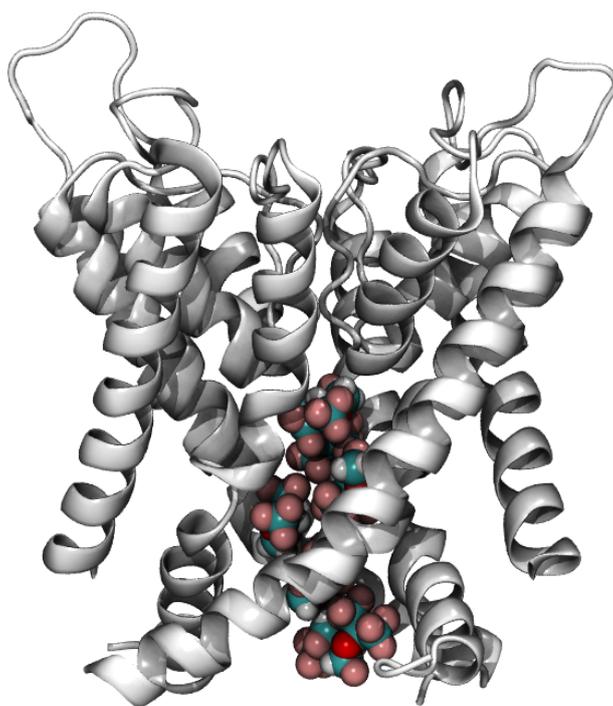


Figura 10: Moléculas de sevoflurano ocupando a cavidade central do canal Kv1.2 aberto na simulação de *flooding*. O domínio sensor de voltagem foi ocultado para melhor visualização.

Um sítio de ligação de uma molécula ativadora no caminho de condução iônica levanta diversas dúvidas: a primeira é que a sugestão do sítio se deu como consequência de limitações ou artefatos nas ferramentas de predição, tornando-se um falso positivo. Caso o sítio realmente exista, a presença do anestésico nesse local pode levar à adição de um nível de complexidade no mecanismo da anestesia: um impedimento estérico no fluxo de íons inibiria a proteína, mesma ela estando na conformação aberta – comportamento totalmente incoerente com o observado em experimentos de eletrofisiologia. Ainda, é preciso avaliar outros aspectos dessa ligação, como a competição com outras moléculas e o equilíbrio conformacional para conferir se é favorável a permanência do anestésico na CC. Apesar de uma concentração de 150mM sugerir uma superlotação de anestésicos no poro central, a dinâmica desse sítio deve ser avaliada em condições diluídas, que são as condições fisiológicas, onde é conhecido que a nível molecular, o sevoflurano ativa o canal Kv1.2 e de alguma maneira, essas mudanças são refletidas macroscopicamente no estado de anestesia geral.

Em face à quantidade de informação disponível, como caracterizações macroscópicas, estruturas cristalográficas e os pontos ainda desconhecidos nessa complexa interação, este estudo

tem como objetivo avaliar em diversos aspectos se a ligação do sevoflurano no poro central da proteína, sugerida pelos experimentos descritos acima, é uma sugestão válida e possui concordância com os dados já conhecidos na literatura, de experimentos de eletrofisiologia, modelos *in vivo* e estudos de farmacologia. Serão utilizadas ferramentas computacionais de modelagem de sistemas moleculares e cálculos de energia, com um embasamento teórico considerado como o estado da arte da biofísica atual. As conclusões geradas neste estudo servirão de contribuição para compreender uma das diversas facetas do problema da anestesia geral: a dinâmica de interação de anestésicos gerais no poro de condução de canais iônicos.

2 . Objetivos

2.1 . Objetivo geral

Este estudo visa investigar os mecanismos de modulação dos anestésicos gerais em canais de potássio dependentes de voltagem através de modelagem e simulação computacional.

2.2 . Objetivos específicos

Busca de candidatos a sítios de ligação de anestésicos gerais no poro de condução do canal Kv1.2;

Conferir a viabilidade dos sítios através de cálculos de energia livre de ligação;

Descrever termodinamicamente a influência da ligação do sevoflurano no poro central no equilíbrio entre os estados aberto e fechado;

Descrever termodinamicamente a competição entre sevoflurano e potássio pelo poro de condução;

Desenvolver pacote acessório às ferramentas de dinâmica molecular para simulações com ΔV constante;

Investigar eventos de condução de íons na presença de anestésicos no poro central.

3 . Teoria e métodos

O estudo de estruturas macromoleculares é um ponto chave no entendimento da função biológica, que é baseada primordialmente em interações moleculares. Aproveitando-se das diversas estruturas cristalográficas disponíveis e a robusta caracterização de estados do canal iônico de potássio Kv1.2, dos estudos realizados de parametrização de anestésicos gerais, e da infraestrutura computacional disponibilizada, este trabalho utiliza-se de técnicas computacionais para estudar diversos aspectos da interação entre o Kv1.2 e o sevoflurano, como simulações de dinâmica molecular, busca de sítios por *docking* molecular e cálculos de energia livre. Todos os experimentos são guiados por experimentos de eletrofisiologia e estudos de farmacologia.

O estudo por técnicas computacionais permite a obtenção de propriedades em condições consideradas impraticáveis em experimentos de bancada, como temperaturas próximas de 0K, altas pressões ou diferenças de potencial. Além disso, as simulações computacionais permitem o controle total dos parâmetros experimentais e seu ajuste, caso necessário.

A escolha de técnicas computacionais como dinâmica molecular, *docking* e cálculos de energia livre se deu pela resolução espacial (escala de 10^{-10} m) e temporal (escalas de 10^{-9} s) exigidos para o estudo da interação entre um receptor e ligante.

3.1 . Simulações de dinâmica molecular

A dinâmica molecular é uma técnica computacional que gera trajetórias atômicas ao longo do tempo, para um determinado sistema com um número finito de átomos. Essa trajetória é regida por interações intramoleculares e intermoleculares, onde cada etapa, chamada de passo de integração, consiste em, para cada átomo, calcular os potenciais das interações e aplicar a força resultante por uma pequena fração de tempo. Após aplicadas as forças, é iniciado um novo passo de integração e ocorrem novos cálculos.

Um dos principais objetivos de realizar a dinâmica molecular é a obtenção de propriedades médias do sistema. Uma maneira de obter a média é a comparação entre diversos microestados possíveis. Porém, seria necessária uma grande quantidade de simulações em paralelo partindo de diversos pontos iniciais, algo altamente custoso computacionalmente e impraticável. Para solucionar esse impasse, as simulações são consideradas sistemas ergódicos, que são sistemas onde a média temporal de suas propriedades corresponde à média entre os diversos estados possíveis. Dessa maneira, para uma trajetória suficientemente longa

$$\lim_{t \rightarrow \infty} \bar{P}(t) = \langle P \rangle$$

a média da propriedade P no tempo $\bar{P}(t)$ tende a ser a média da propriedade entre diversos os estados possíveis $\langle P \rangle$.

3.1.1 . Campos de força

O cálculo dos potenciais é etapa indispensável para a realização da dinâmica molecular. É utilizada uma função de energia potencial $U(\vec{r})$, que é função da posição das coordenadas do sistema \vec{r} . Uma função apropriada leva a um tratamento acurado das interações com o máximo de eficiência computacional. Existem diversos campos de força disponíveis, inclusive desenhados especialmente para biomoléculas, como CHARMM⁵², AMBER⁵³ e GROMOS⁵⁴. Para as simulações de dinâmica molecular neste trabalho foi escolhido o campo de força CHARMM, por ser o campo de força utilizado nas trajetórias cedidas, além de ser o tipo do campo de força disponibilizado de pequenos ligantes^{55,56}.

Nos campos de força, a energia potencial geralmente é a soma de diversos termos relativos às interações entre átomos: ligação, ângulo, diedro, interações eletrostáticas e interações de van der Waals. Essas interações são separadas em dois grupos, ligadas e não-ligadas.

No CHARMM, as interações ligadas são calculadas apenas entre átomos da mesma molécula. Vale ressaltar que em simulações de dinâmica molecular não existe quebra de ligações covalentes. Individualmente, as interações ligadas são:

Energia de ligação:

$$U_{lig} = \sum k_b(r - r_0)^2$$

Potencial harmônico relacionado ao comprimento da ligação covalente r , k_b é a constante de força da ligação e r_0 é a distância de equilíbrio.

Energia de ângulo:

$$U_{angulo} = \sum k_\theta(\theta - \theta_0)^2$$

Potencial associado ao ângulo entre três átomos ligados. O termo θ é o ângulo entre os átomos, θ_0 é o ângulo de equilíbrio e k_θ é a constante de força.

Energia de diedro:

$$U_{diedro} = \sum k_d[1 + \cos(n\phi - \delta)]$$

Potencial relacionado à torção entre quatro átomos ligados, que formam dois planos com ângulo ϕ . Os parâmetros k_d, n e δ são a constante de força diedral, a multiplicidade e o ângulo de equilíbrio, respectivamente.

Impróprio:

$$U_{imp} = \sum k_i(\omega - \omega_0)^2$$

Artifício utilizado pelo CHARMM para manter átomos num mesmo plano. Consiste num potencial harmônico relacionado com os ângulos ω e ω_0 , respectivamente o ângulo entre os planos e o ângulo de equilíbrio, e a constante de força k_i .

Os termos não ligados são termos dependentes apenas da distância entre os átomos, não importando de qual molécula elas pertencem. São potenciais não ligados:

Energia eletrostática:

$$U_{Coulomb} = \sum \frac{q_i q_j}{\epsilon r_{ij}}$$

Potencial referente à Lei de Coulomb. É relacionado às cargas elétricas do par de átomos q_i e q_j , da constante dielétrica do meio ϵ e da distância entre as partículas r_{ij} .

Energia de van der Waals:

$$U_{vdW} = \sum \epsilon \left[\left(\frac{r_0}{r} \right)^{12} - 2 \left(\frac{r_0}{r} \right)^6 \right]$$

Potencial referente às interações de van der Waals, na forma do potencial de Lennard-Jones 12-6, onde r_0 é a distância de equilíbrio do par de átomos e ϵ é o valor mínimo de energia. Essa interação possui diversos regimes, dependentes unicamente pela distância entre os átomos r , onde no caso da aproximação ($r < r_0$) o termo é repulsivo. No caso de $r = r_0$, o potencial atinge seu menor valor possível, e em distâncias maiores que a de equilíbrio ($r > r_0$) o termo ainda é atrativo, porém tendendo a zero à medida que a distância aumenta.

Os parâmetros contidos no campo de força são obtidos por meio de cálculos *ab initio* da estrutura de cada molécula, além de serem validados por comparação de propriedades com medidas obtidas experimentalmente.

3.1.2 . Condições periódicas de contorno

Um sistema inicial de dinâmica molecular possui um número finito de moléculas dispostas num volume. Assim, existem átomos que estarão no limite do sistema, que ao longo da simulação interagirão com o vácuo. Essa falta de interações possibilita a difusão para a fase de vapor dos átomos da borda, além de poder causar tensão superficial. Salvas as situações em que realmente se deseja ver essas propriedades, esse efeito de borda é um artefato altamente indesejado. Na intenção de solucionar esse problema, são aplicadas as condições periódicas de contorno (*periodic boundary conditions* – PBC). Nessa técnica, o sistema é replicado em todos os eixos, de tal maneira que os limites da célula original se comunicam com os limites opostos da réplica. Assim, quando um átomo atravessa alguma fronteira da caixa, a réplica desse átomo aparece na fronteira oposta da caixa original. A figura 11 esquematiza um sistema com suas condições periódicas de contorno.

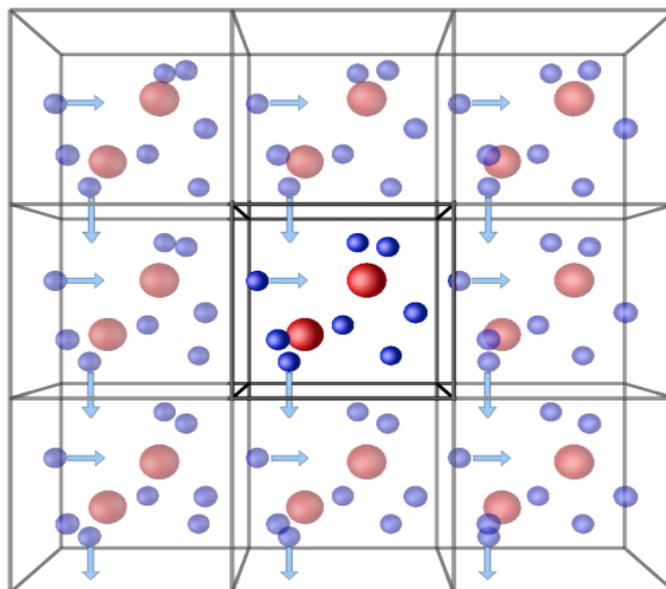


Figura 11: Esquema de condições periódicas de contorno. Ao centro, o sistema original rodeado de suas respectivas réplicas nos eixos x e y . Note que a travessia de um átomo na extremidade é acompanhada pela aparição de sua réplica na extremidade oposta. Retirado de <http://isaacs.sourceforge.net/phys/psc.html> . Acesso em 06/03/2018 .

Esse caráter infinito do sistema gerado pela implementação do PBC aumenta o número de interações que devem ser calculadas. Porém, muitas dessas interações são entre átomos distantes e até entre réplicas. Para evitar esses problemas, é estabelecido que as interações a serem calculadas devem ser apenas entre os átomos da réplica mais próxima possível e até a uma certa distância R_c definida – contribuições intermoleculares além dessa distância não são calculadas – que para evitar cálculos de interações de longa distância entre os átomos repetidos, essa distância de corte (*cutoff*) deve ser menor que metade do tamanho L da caixa ($R_c < L/2$).

3.1.3 . Tratamento de interações de longa distância

O cálculo das energias potenciais de interações não-ligadas apresenta-se como uma das etapas de maior demanda computacional num passo de integração. A quantidade de cálculos a ser realizada cresce numa ordem de N^2 . Como as condições periódicas de contorno exigem um raio de corte de no máximo $L/2$, e apenas são calculadas as interações entre os átomos da caixa original ou da réplica vizinha, esse número de interações a serem calculadas é menor. Porém, o potencial de Lennard-Jones já apresenta valores negligenciáveis mesmo em distâncias menores que o *cutoff* sugerido (11 a 15Å), abrindo a possibilidade de aumentar a velocidade dos cálculos por simplesmente ignorar as interações de van der Waals que possuem uma distância maior que a do *cutoff* (para $r > R_c; U_{vdW}(r) = 0$). Apesar disso, truncar as interações a partir de uma certa distância pode causar problemas relativos à conservação de energia do sistema, já que ocorre uma

descontinuidade do potencial em R_c . Assim, essa mudança abrupta do potencial pode ser suavizada por uma *switching function*, como mostrada abaixo:

$$U_{vdWtrunc}(r) = \begin{cases} U(r) - U(R_c) & , r \leq R_c \\ 0 & , r > R_c \end{cases}$$

O termo do potencial eletrostático decai na ordem de r^{-1} , mais lento que as interações de van der Waals que decaem em r^{-6} . Logo, adotar um esquema de *cutoff* semelhante ao dos cálculos para o potencial de van der Waals compromete seriamente o cálculo do potencial eletrostático. Uma solução que visa economia de recursos computacionais e precisão nos resultados é a decomposição do potencial eletrostático em dois termos: um de curto alcance e outro de longo alcance. As interações de curto alcance são as interações com distância menor que o raio de *cutoff*, com seu potencial calculado pela equação de Coulomb. O termo de longo alcance pode ser descrito de diversas maneiras. Será utilizada a descrição utilizada no método PME (*Particle Mesh Ewald*), que considera a influência da carga dos átomos distantes num potencial implícito, dependente da densidade de carga $\rho(\mathbf{k})$.

$$U_{elet} = \sum \frac{q_i q_j}{\epsilon r_{ij}} + \phi_{longo}(\rho(\mathbf{k}))$$

3.1.4 . Integração das equações de movimento

Uma trajetória consiste basicamente em definir qual será o espaço percorrido por um átomo em determinados instantes de tempo. Integrar as equações de movimento é uma maneira de resolver a seguinte discretização espacial:

$$\vec{r}_i(t_0) \rightarrow \vec{r}_i(t_0 + \delta t) \rightarrow \vec{r}_i(t_0 + 2\delta t) \rightarrow \dots \rightarrow \vec{r}_i(t_0 + n\delta t)$$

Essa integração pode ser resolvida por diversos algoritmos, como o de Verlet⁵⁷, de Beeman⁵⁸ e o *leap-frog*⁵⁹. O método escolhido visa otimizar diversos parâmetros, como economia de recursos computacionais, acurácia, reversibilidade e conservação de energia. A partir da energia potencial $U(\vec{r})$ calculada é possível obter a força \vec{F} correspondente da interação entre i e j :

$$\vec{F} = -\frac{dU(\vec{r})}{dr}\vec{n}, \quad \vec{n} = \vec{r}/r$$

onde \vec{n} é o vetor unitário da distância entre o par de átomos. A aceleração \vec{a} pode ser calculada utilizando-se das leis de Newton

$$\vec{a} = \frac{d^2\vec{r}}{dt^2} = \frac{\vec{F}}{m}$$

onde \vec{r} é a posição do átomo, \vec{F} é a força calculada e m é a massa do átomo. O algoritmo de Verlet utiliza esses parâmetros obtidos pelos cálculos de energia, além de obter \vec{r} do sistema. A obtenção

da posição no próximo instante é fruto de uma expansão de Taylor para r centrado em $+\Delta t$ e $-\Delta t$ e a subsequente soma dessas expansões, resultando no termo final do integrador

$$\vec{r}(t + \delta t) = 2\vec{r}(t) - \vec{r}(t - \delta t) + \frac{\vec{F}(t)}{m}\delta t^2 + O(\delta t^4)$$

onde $\vec{r}(t + \delta t)$ é a posição a ser descoberta, do próximo instante, $\vec{r}(t)$, $\vec{r}(t - \delta t)$, \vec{F} e m são os parâmetros necessários para o cálculo: a posição atual, a posição no instante anterior, a força e a massa, respectivamente. O erro associado é na ordem de $O(\delta t^4)$. A velocidade não é necessária para a integração das forças, mas indispensável para o cálculo da energia cinética, sendo determinada por

$$\vec{v}(t + \delta t) = \frac{\vec{r}(t + \delta t) - \vec{r}(t - \delta t)}{2\delta t} + O(\delta t^2)$$

com o erro associado de $O(\delta t^2)$.

Um passo de integração δt pequeno leva a simulações mais precisas, com conservação da energia do sistema, porém utilizá-lo torna a trajetória muito dispendiosa. Em contraste, passos de integração grandes acabam não amostrando eventos mais rápidos, como vibrações e até colisões, levando à uma trajetória repleta de artefatos e inacurada. Dessa maneira, o passo de integração utilizado, de 2fs ($1\text{fs} = 10^{-15}\text{s}$), é igual à duração do evento mais rápido que ocorre na escala da dinâmica molecular, que é a vibração dos átomos da molécula de água.

3.2 . Simulações com diferença de potencial constante

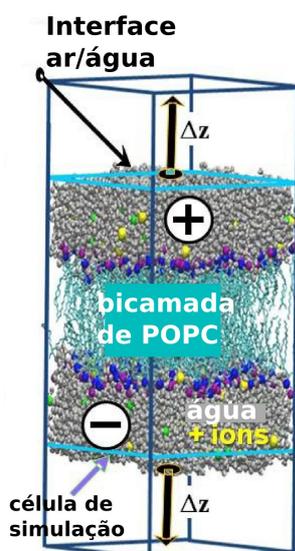


Figura 12: Arquitetura de sistema com diferença de potencial elétrico. As soluções são isoladas por meio de uma camada de vácuo, e sua diferença de carga gera um ΔV . Retirado de Stock, 2013.

O comportamento da membrana como um capacitor leva à separação dos compartimentos celulares. Quando esses compartimentos possuem uma diferença na carga, é criado um potencial elétrico associado, que gera um campo elétrico ao longo do sistema. Algumas construções de sistemas de dinâmica molecular baseiam-se nessa propriedade para realizar simulações em condições de uma diferença de potencial elétrico constante, isolando os compartimentos de água do sistema para criar uma carga líquida ΔQ entre eles^{60,61}. A figura 12 sumariza a construção, onde uma camada de vácuo superior e uma outra inferior com cerca de 250\AA cada, impedem a comunicação entre os compartimentos.

A voltagem do sistema ΔV é dada por

$$\Delta V = \frac{\Delta Q}{A \times C}$$

onde ΔQ é a diferença de cargas entre os compartimentos, C é a capacitância da membrana e A é a área da secção transversal da membrana. Quando há passagem de uma espécie carregada (íons e aminoácidos carregados) para outro lado da membrana, $|\Delta Q|$ diminui, causando uma consequente alteração em ΔV . Com tempo suficiente esses eventos ocorrem espontaneamente até zerar ΔV . Em face à essa inconstância de ΔV ao longo da simulação não é possível estudar o comportamento da proteína na presença de uma diferença de voltagem ou o comportamento dessas espécies carregadas em longas escalas de tempo. Esse impasse é solucionado com a movimentação artificial de uma espécie iônica aleatória de mesma carga para o sentido oposto, mantendo a diferença de carga entre os compartimentos constante.

Foi desenvolvido um pacote acessório ao NAMD⁶², que durante a simulação de dinâmica molecular, monitora o movimento das cargas do sistema e quando alguma espécie carregada atravessa o limite definido, a simulação é interrompida e o VMD⁶³ é utilizado para realizar a correção automática nas cargas dos compartimentos, e na sequência a simulação prossegue normalmente. O pacote possui um conjunto de programas nas linguagens Bash e Tcl e é compatível com qualquer tipo de simulação convencional no NAMD. As simulações possuem os mesmos parâmetros das simulações de equilíbrio convencionais, com exceção do pistão de Langevin, que deve ser desativado. Assim, a simulação possui a característica NVT (número de partículas, volume e temperatura constantes).

O pacote é separado em três módulos:

-Módulo inicial: responsável por preparar o início da dinâmica molecular, obtendo propriedades como dimensões da caixa de simulação e gerando arquivos de configuração.

-Módulo de monitoramento de cargas: responsável por controlar as contribuições das espécies carregadas na simulação, além de determinar qual espécie iônica será movida para contrabalancear o evento de condução.

-Módulo de simulação: programas que auxiliam o NAMD a estabelecer critérios para caracterizar a presença ou ausência de eventos de condução e coordenar as operações decorrentes desse evento.

3.3 . Distância elétrica e excesso de energia

O campo elétrico não varia uniformemente ao longo do eixo transmembrânico. A variação depende da composição perpendicular à membrana do sistema, que pode levar a diversos tipos de variação de potencial eletrostático local. Num segmento c do sistema, a fração do campo elétrico que foi percorrido numa dada posição z pode ser descrita através da distância elétrica δ_c :

$$\delta_c \equiv \frac{\partial}{\partial V} \phi_c(z, V)|_{V=0}$$

Onde $\phi_c(z, V)$ é o perfil eletrostático médio ao longo de z na voltagem V , que pode ser obtido através da integração da equação de Poisson⁶⁴ ou do componente de longa distância do PME³. O perfil de distância elétrica no canal Kv1.2 foi calculado utilizando duas simulações independentes. A primeira ocorreu sem diferença de potencial elétrico, para obter $\phi_c(z, 0mV)$. Outro sistema foi submetido a $\Delta V = 600mV$, com o intuito de obter $\phi_c(z, 600mV)$. Dessa maneira, a solução pôde ser obtida numericamente

$$\delta_c \equiv \frac{[\phi_c(z, \Delta V_2) - \phi_c(z, \Delta V_1)]}{(\Delta V_2 - \Delta V_1)}$$

onde $\Delta V_2 - \Delta V_1 = 600mV$ e c é a conformação aberta do canal. As espécies carregadas estão sujeitas a ter um contribuição energética ao atravessar o campo elétrico. Essa contribuição é denominada como excesso de energia ($\Delta G(V_2 - V_1)$) e em uma dada voltagem $\Delta V = V_2 - V_1$, o excesso de energia de uma espécie de carga q_i é diretamente proporcional à distância elétrica percorrida, como mostrado abaixo:

$$\Delta G(V_2 - V_1) = -q_i \cdot \Delta V \cdot \delta_c$$

É possível observar que, caso a espécie carregada atravessasse o campo elétrico na totalidade, a distância elétrica será igual a 1, e a perda de energia causada pelo excesso de energia se equivale, em modulo, à energia potencial elétrica ($q \times \Delta V$).

3.4 . Docking molecular

Diversas proteínas interagem com pequenas moléculas. Porém, nem todos os pares de interação possuem detalhes precisos sobre os locais e modos de interação de moléculas com proteínas a nível atômico. O crescimento de informação estrutural acerca das proteínas é recente, com a disponibilização de estruturas cristalográficas e avanços nas ferramentas de modelagem. Assim, a caracterização a nível atômico/molecular dessas interações é uma das tarefas mais promissoras da farmacologia atual. Descobrir os sítios de ligação de uma proteína não só dá informações acerca do mecanismo de funcionamento, mas também abre espaço para a busca e desenho de novas drogas. Uma das ferramentas utilizadas para obter-se os sítios de ligação de uma

molécula é o *docking*. Atualmente existem diversas ferramentas de *docking*, como o AutoDock⁶⁵, AutoDockVina⁶⁶, entre outros. De modo geral, os programas de *docking* realizam uma busca da melhor posição do ligante na proteína e em seguida a melhor orientação do ligante naquele local. As melhores posições são classificadas de acordo com as *score functions*, que variam entre os programas.

O programa escolhido foi o AutoDockVina, em face à sua eficiência computacional e compatibilidade com a estrutura já existente no laboratório. A *score function* do AutoDockVina é baseada numa técnica chamada de *local search global optimizer*, onde o ligante tem sua posição alterada e as mudanças só são aceitas pelo critério de Metropolis.

Como um sistema proteína-ligante é dinâmico, o programa realiza a busca com várias configurações flexíveis do ligante. A flexibilidade da proteína também pode fazer sítios aparecerem ou serem escondidos. Dessa maneira, diversos microestados proteicos oriundos de dinâmica molecular são fornecidos para o *docking*.

Após as soluções serem geradas, elas são agrupadas em nuvens, seguindo um critério de proximidade espacial. Soluções que se encontram a uma determinada distância de outras soluções entram numa mesma nuvem. Uma etapa seguinte é a classificação das nuvens em sítios de ligação. Os sítios são definidos a partir dos contatos de aminoácidos que estão próximos da nuvem. Assim, uma proteína multimérica pode ter nuvens distantes que fazem parte do mesmo sítio. Vale ressaltar que a flexibilidade do sistema não assegura aparições regulares de sítios em todas as subunidades da proteína e que a aparição de certos sítios pode ser dependente da conformação em que a proteína se encontra.

3.5 . Cálculos de energia livre por FEP

O *docking* é uma ferramenta amplamente utilizada para busca de sítios. Uma das propriedades calculadas num sítio sugerido é sua respectiva energia de ligação. Porém, o *docking* não leva em conta as moléculas que circundam a proteína, como água, membrana e íons. Além disso, a função de energia do *docking* é muito simplista, levando em conta apenas a posição do ligante, e não as interações intermoleculares. Esses detalhes em conjunto fazem com que o *docking* sugira alguns sítios falsamente positivos, trazendo a necessidade de outro método de cálculo de energia, para obter-se um valor mais acurado das energias dos sítios além de descobrir os falsos positivos.

Uma metodologia bastante utilizada para estimar afinidades de ligantes é o de *Free Energy Perturbation* (FEP). A escolha do FEP se deve pela ampla utilização em trabalhos anteriores do grupo, juntamente com o embasamento teórico da técnica com teorias clássicas de mecânica

estatística, além de ser uma técnica que envolve amostragem, o que aumenta a qualidade dos resultados obtidos. Como contrapartida existe a alta demanda de recursos computacionais e a necessidade de amostragem em regiões equivalentes.

A variação de energia obtida pelo FEP se baseia na mecânica estatística⁶⁷, principalmente na equação de Zwanzig

$$\Delta F_{A \rightarrow B} = -k_b T \ln \langle \exp\left(\frac{-E_B - E_A}{k_b T}\right) \rangle$$

onde ΔF é a variação de energia, k_b é a constante de Boltzmann, T a temperatura, E_B e E_A as energias dos estados B e A, respectivamente.

Porém, é difícil obter uma amostragem comparável dos estados iniciais e finais para ter como resultado um cálculo de energia correto. Então é desejável que os estados possuam diferenças pequenas, para assegurar a reversibilidade do processo. Uma solução para estados de grande diferença é fragmentar a mudança entre esses dois estados em diversas transições entre estados intermediários, partindo do estado inicial, e obter a energia total do processo pela soma das energias das transições reversíveis, como demonstrado abaixo, uma transformação $A \rightarrow B$ pode ser feita da seguinte maneira:



onde são criados N estados intermediários para aplicar as $N + 1$ transformações, cada uma com uma variação de energia associada, segundo a equação de Zwanzig. Assim, a variação total de energia para o processo $A \rightarrow B$ é:

$$\Delta G_{A \rightarrow B} = \Delta G_{A \rightarrow I_1} + \Delta G_{I_1 \rightarrow I_2} + \dots + \Delta G_{I_N \rightarrow B}$$

No FEP, os estados intermediários são mapeados segundo um parâmetro λ , que descreve quanto esse estado possui suas interações intermoleculares desligadas. Assim, o processo completo parte do estado $\lambda = 0$, que possui todas as interações e termina em $\lambda = 1$, um estado onde não há interações eletrostáticas nem de van der Waals.

No caso da ligação do sevoflurano no sítio de ligação do Kv1.2, o FEP é realizado com o ligante partindo um estado onde interage normalmente com o sítio ($\lambda = 0$), sendo transformado até um estado sem interações, correspondente às interações com o vácuo ($\lambda = 1$), resultando na variação de energia de retirar o ligante do sítio de ligação e inseri-lo no vácuo ($\Delta G_{\text{sítio} \rightarrow \text{vácuo}}$). Porém, esse processo não descreve completamente a situação de ligação, que envolve a saída da molécula do reservatório e sua posterior ligação no sítio. Assim, é necessária a descrição energética de outro evento, a solvatação do ligante, que é a transferência do ligante do vácuo para o reservatório ($\Delta G_{\text{vácuo} \rightarrow \text{bulk}} = \bar{\mu}$). Com esses dois valores de energia, a ligação do sevoflurano num sítio possui uma descrição energética completa :

$$\Delta G_{\text{sítio}} = -(\Delta G_{\text{sítio} \rightarrow \text{vácuo}} + \bar{\mu})$$

Onde $\Delta G_{\text{sítio}}$ é a energia de ligação do sítio, $\Delta G_{\text{sítio} \rightarrow \text{vácuo}}$ é a energia calculada pelo FEP do sevoflurano no sítio e $\bar{\mu}$ é a energia de solvatação do sevoflurano (-0,1 kcal/mol; calculado por colaboradores).

3.6 . Constantes de equilíbrio FEP

As propriedades da interação entre o sítio de ligação e o sevoflurano podem ser descritas através de constantes de ligação. Estudos anteriores já trouxeram as relações entre a energia livre de ligação e suas respectivas constantes^{48,50}. Considere que a proteína possua um sítio de ligação j , que pode ser populado por $0 \leq n_j \leq n_j^{\text{max}}$ moléculas. Um estado de ocupação específico da proteína, onde o sítio j possui n ligantes e os outros sítios, caso existam, estejam vazios, é dado por meio da notação $O(0, \dots, n_j, \dots, 0)$. Cada sítio j possui sua constante de ligação $K(n_j)$, determinada pela equação

$$K(n_j) = \frac{1}{n_j!} \times \left[\prod_{i=1}^{n_j} \left(\frac{2\pi}{\beta k_i} \right)^{\frac{3}{2}} \right] \times e^{-\beta[W_X^*(n) - n\bar{\mu}]}$$

onde β corresponde ao fator temperatura (1,677 kcal/mol, para 300K), k_i o valor da constante do potencial harmônico aplicado para a molécula específica do sevoflurano, $W_X^*(n)$ a variação de energia livre calculada pelo FEP de n ligantes presentes no sítio e $\bar{\mu}$ é a energia de solvatação do ligante (-0,1 kcal/mol, calculado por colaboradores). A variação de energia livre absoluta da ligação de n_j ligantes no sítio é encontrada a partir da constante de ligação $K(n_j)$, através do seguinte termo

$$\Delta G^o(n_j) = -\frac{1}{\beta} \ln[K(n_j) \times (C^o)^{n_j}]$$

no qual C^o corresponde à concentração padrão ($C^o = 1 \text{ mol/L}$ ou 1660 \AA^{-3}).

3.7 . Parâmetros de ordem do lipídio

Um dos indicativos da fluidez da membrana é o parâmetro de ordem, que em simulações computacionais pode ser caracterizado pela orientação das ligações C-H das cadeias alifáticas do fosfolipídio, como demonstrado na expressão abaixo

$$S_{CH} = \left\langle \frac{3\cos^2\Theta - 1}{2} \right\rangle$$

onde Θ é o ângulo entre o vetor formado pela ligação do carbono e hidrogênio com um eixo de referência adotado, que é o eixo z . Para a membrana composta por 1-palmitoil-2-oleoil-sn-glicero-3-fosfatidilcolina (POPC), já existem trabalhos envolvendo simulações computacionais que possuem

caracterizados os parâmetros de ordem dos estados gel e líquido^{68,69}, possibilitando a comparação direta dos valores, para a validação do segmento de membrana gerado neste trabalho.

3.8 . Cálculo de energia de partição

Seguindo o objetivo de descobrir as energias de transição do sevoflurano entre os ambientes água-membrana foi utilizada uma simulação contida por um segmento de POPC com presença de uma molécula de sevoflurano. Para obter a paisagem de energia desse ligante ao longo de uma coordenada de reação foi utilizada a metodologia do *Adaptive Biasing Force*⁷⁰ (ABF), presente no módulo de variáveis coletáveis do NAMD. O ABF consiste numa técnica onde é definida uma coordenada de reação, limitada entre os parâmetros ξ_i e ξ_f e dividida em faixas de tamanho igual $d\xi$. Em cada faixa ξ , é registrada a força média F_ξ aplicada num certo grupo de átomos. Adicionalmente, ocorre uma aplicação artificial de uma força na direção oposta, igual à força média em módulo $\langle F_\xi \rangle$, para que o sistema consiga amostrar todos os estados dessa coordenada de reação, independente das barreiras energéticas. Após tempo suficientemente grande, a superfície de energia livre converge e todos os estados ficam equiprováveis no ABF. A variação de energia ΔA entre os limites da coordenada de reação é dada por meio de um potencial de força média (PMF):

$$\Delta A_{a \rightarrow b} = \int_{\xi_a}^{\xi_b} -\langle F_\xi \rangle d\xi$$

O sistema utilizado consiste no segmento de POPC gerado neste trabalho com a inserção de uma molécula de sevoflurano a 30Å do centro da membrana. A coordenada de reação adotada no ABF foi o eixo z , discretizado em faixas de 0,1Å, e com os limites definidos entre o centro da membrana ($z = 0\text{Å}$) e a posição inicial da molécula de sevoflurano ($z = 40\text{Å}$). Caso a molécula ultrapassasse os limites da coordenada, um potencial com uma constante de 10kcal/(mol Å²) era adicionado. A contagem de estados e a força média eram atualizados a cada 1000 passos. Exceto os parâmetros específicos do ABF, os demais parâmetros são os mesmos parâmetros da simulação da seção 3.10.

3.9 . Protocolo de criação do sistema reduzido de membrana

A membrana utilizada nas simulações computacionais é composta por uma bicamada lipídica composta de POPC em fase cristalina.

A estrutura foi obtida por meio do plugin Membrane Builder do VMD, utilizando a topologia CHARMM36⁵⁵. Nessa estrutura todos os átomos de hidrogênio dos fosfolipídeos estão

presentes. Para completar o sistema, o segmento de membrana criado foi solvatado por moléculas de água do modelo TIP3⁷¹ e ionizado com uma solução de KCl 150mM.

Essa configuração foi usada como estrutura inicial para as simulações de dinâmica molecular. O programa utilizado para realizar essas simulações foi o NAMD⁶², com os parâmetros do campo de força CHARMM36⁵². As simulações serão feitas no estado NPT (número de átomos, pressão e temperatura constantes). Foram utilizadas as condições periódicas de contorno nos eixos x, y e z com um raio de *cutoff* de 11Å. Os cálculos eletrostáticos de longo alcance foram realizados utilizando o método PME. O passo de integração utilizado foi de 2fs. A temperatura foi controlada pela dinâmica de Langevin e a pressão foi mantida constante em 1atm por meio do pistão de Langevin. Foram utilizados no início 800 passos de minimização, para evitar choques entre átomos e na sequência 25000000 passos de integração, totalizando 50ns de trajetória.

Inicialmente, o sistema sofreu uma termalização gradual, partindo de 273K para 300K em 0,08ns. As moléculas de POPC sofreram um relaxamento progressivo durante o início da simulação. A cadeia alifática do lipídeo ficou rígida durante o primeiro nanossegundo, enquanto os grupamentos fosfatos ficaram rígidos durante os primeiros 3ns. Após isso, não foi aplicada nenhuma restrição de movimento na simulação durante os 47ns restantes.

3.10 . Simulações de equilíbrio das conformações do canal Kv1.2

Para estudar a interação de ligantes com o canal Kv1.2 é necessário obter um modelo atomístico do canal, inseri-lo em um sistema com membrana e gerar diversos microestados no equilíbrio, para levar em conta a flexibilidade da proteína. Simulações de equilíbrio do Kv1.2, uma com a conformação aberta e outra com a fechada, foram cedidas por colaboradores, que já realizaram diversos trabalhos utilizando essas simulações^{3,40,48}.

O modelo da conformação aberta foi obtido de Treptow *et al.*⁴ e o da fechada em outro estudo envolvendo diversas técnicas de dinâmica molecular²³. Cada estrutura foi inserida numa bicamada lipídica de POPC, solvatado explicitamente por moléculas de água do modelo TIP3 e ionizado por uma solução de KCl 150mM. Ambos sistemas foram simulados utilizando o NAMD, com o campo de força CHARMM36. Foram aplicadas condições periódicas de contorno em todas as dimensões para evitar efeitos de borda. Na intenção de manter as características NPT da trajetória, a temperatura de 300K e a pressão de 1atm foram mantidas constantes utilizado-se o pistão e o termostato de Langevin.

As trajetórias totalizaram 40ns para o estado aberto e 31ns para o estado fechado, fornecendo 20000 e 15500 microestados, respectivamente.

3.11 . Docking Kv1.2

O *docking* foi realizado pelo AutoDockVina⁶⁶, que utilizou como receptor o conjunto de 375 estruturas proteicas escolhidas aleatoriamente das simulações de equilíbrio de cada conformação do canal Kv1.2 e a topologia do sevoflurano como ligante, que teve seu caráter flexível considerado. A varredura de sítios ocorreu num espaço de 125Åx120Åx90Å, que cobre toda a extensão da proteína (sensores de voltagem e domínio do poro). As soluções sugeridas são selecionadas de acordo com a energia de ligação e agrupadas de acordo com a posição espacial e os aminoácidos que compõem o sítio por meio de *scripts* cedidos por colaboradores.

Para verificar a saturação máxima de um sítio foi necessário realizar outro cálculo de *docking* nos resultados do *docking* anterior. Esse procedimento de *redocking* possui os mesmos parâmetros do *docking* convencional, porém é acrescentada uma molécula de sevoflurano no sítio, levando o *redocking* buscar sítios na proteína com um ligante complexado no sítio escolhido. O agrupamento das soluções é idêntico ao do *docking* clássico.

3.12 . Protocolo de *free energy perturbation* (FEP)

O sistema inicial da simulação de FEP é composto pelo microestado correspondente ao receptor da solução de menor energia daquele sítio com a inserção da molécula de sevoflurano. Para evitar colapsos na simulação, são removidas as moléculas de água a 3Å do sevoflurano. São realizadas réplicas do sistema para verificar convergência dos resultados.

Com a finalidade de manter a acurácia dos cálculos de energia, é necessário que o ligante permaneça na vizinhança do sítio durante toda a simulação. Dessa maneira, por meio da seção de variáveis coletáveis do NAMD, é aplicado um potencial harmônico U_{hrm} , resultando numa força proporcional á distância do sevoflurano ao centro do sítio F_{hrm} . Essa constante de força k_{hrm} é dependente da dispersão das soluções de *docking* naquele sítio, descrita pelo desvio médio quadrático (*mean square fluctuation* – MSF):

$$MSF = \frac{\sum_{i=0}^{n_{total}} (\mathbf{r} - \mathbf{r}_0)^2}{n_{total}}$$

Assim, a constante de força é calculada da seguinte maneira:

$$k_{hrm} = \frac{3k_bT}{MSF}$$

onde k_b é a constante de Boltzmann e T a temperatura.

Com o intuito de uma equilibração prévia, cada réplica do sistema inicial da simulação de FEP foi submetida à uma rápida dinâmica molecular de 300 passos de minimização e 5008 passos de integração. O final dessa simulação serviu de *input* para o cálculo de energia livre.

Os cálculos de energia livre utilizando o método *free energy perturbation* (FEP) foram realizados no NAMD, que possui implementado um módulo para esse tipo de simulação. A simulação realizada partiu do parâmetro $\lambda = 0$ para $\lambda = 1$ em 100 transformações de $d\lambda = 0,01$, resultando no desligamento gradual das interações intermoleculares. Cada janela de transformação possui 32000 passos (0,064ns), onde os 1000 primeiros passos correspondem à equilibração pós-transformação e a coleta dos dados ocorre ao longo dos outros 31000 passos. As estimativas da energia livre utilizando-se das réplicas e seus erros associados foram determinados por meio do método *simple overlap sampling* (SOS)⁵⁶.

Nos casos de cálculos de FEP em sítios com saturações maiores que uma molécula, todas as moléculas de sevoflurano são postas no sítio e mantidas nele pelo potencial harmônico, feito de acordo com os respectivos resultados sugeridos pelo *docking*. Porém, apenas uma sofre as transformações do procedimento de FEP.

3.13 . Protocolo de simulações de condução com sevoflurano

Os sistemas utilizados nas simulações com diferença de potencial elétrico para verificar a condução iônica na presença de moléculas de sevoflurano são os sistemas gerados após a equilibração prévia ao FEP. As simulações ocorreram no NAMD, utilizando os parâmetros das simulações de diferença de potencial constante.

4 . Resultados e discussão

4.1 . Sistema de membrana reduzido

A criação do sistema lipídico resultou na inserção de 29 moléculas de POPC em cada camada, resultando numa área inicial de $2790,95\text{\AA}^2$ e numa espessura inicial de 54\AA . O segmento criado está presente na fase cristalina, evidenciado pelas cadeias altamente ordenadas. Entretanto, em condições fisiológicas, a fase predominante da membrana é a fase líquida, caracterizada por uma grande mobilidade, consequência da maior quantidade de interações intercadeia e área por lipídio. Assim, a partir da estrutura inicial da fase cristalina, é necessário obter uma estrutura de membrana correspondente à fase líquida. Como descrito na seção 3.9, o segmento inicial de membrana foi submetido a 50ns de simulação, gerando uma membrana visivelmente diferente, com cadeias mais interdigitadas, e espessura levemente maior, como mostrado na Figura 13.

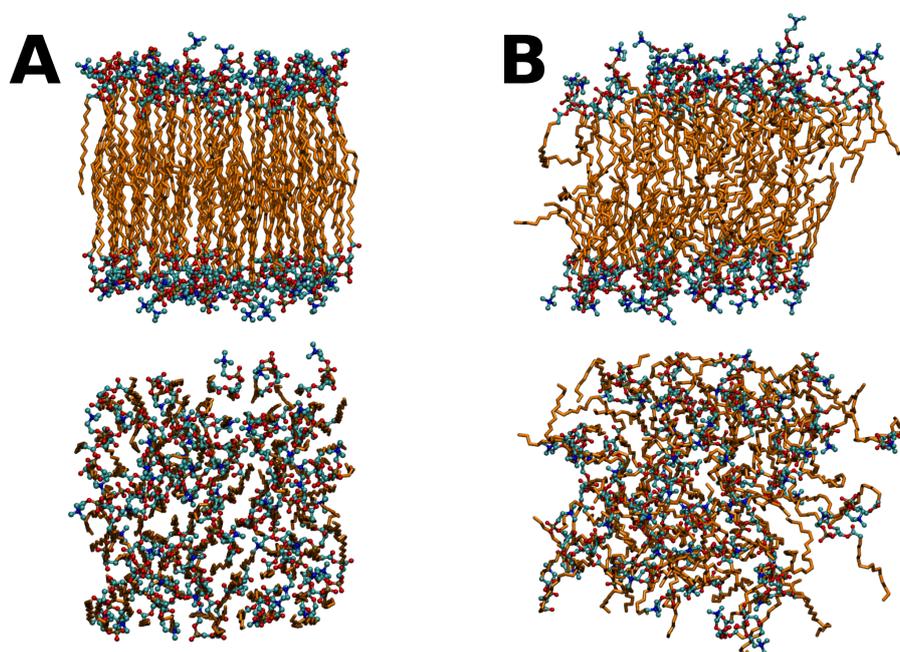


Figura 13: Visão lateral (acima) e superior (abaixo) dos sistemas lipídicos na fase inicial (A) e na fase final (B). As moléculas de água e átomos de hidrogênio foram ocultados para melhor visualização. Os átomos de oxigênio estão representados em vermelho, os de nitrogênio em azul, os fósforos em laranja escuro, os carbonos do glicerol, colina em ciano e da cadeia alifática em laranja.

Para verificar a integridade do segmento de membrana, diversas propriedades foram obtidas e conferidas com resultados obtidos na literatura. A densidade média dos grupos (água, colina, fosfato, caudas lipídicas), mostrada na figura 14 dá detalhes da distribuição dos elementos da membrana ao longo do eixo transmembrânico.

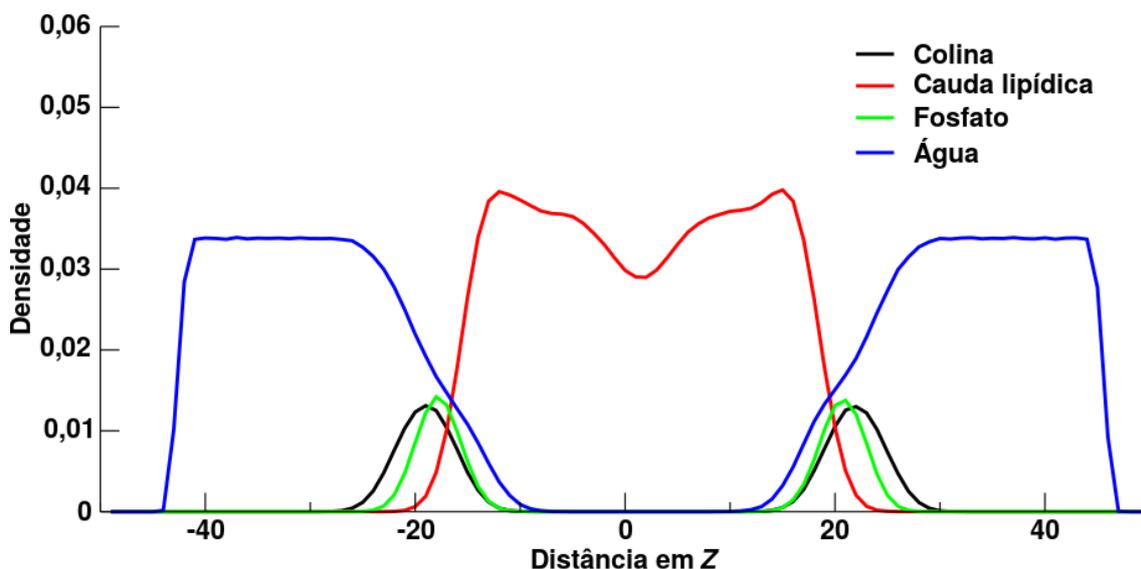


Figura 14: Densidade dos grupos da membrana de POPC (colina, cauda lipídica, fosfato e água) ao longo do eixo transmembrânico.

O perfil de densidade mostrado acima está condizente com estudos de bicamadas fosfolipídicas de POPC através de métodos computacionais⁶⁹. Apesar desse perfil demonstrar a integridade do *patch* lipídico gerado, ele não leva em conta a liberdade conformacional das cadeias lipídicas, impedindo qualquer afirmação sobre a fase do lipídio. Outros parâmetros consideram diretamente a variação de estados das cadeias de POPC e a mobilidade dos resíduos, e por consequência dão informações acerca do estado do lipídio. Um primeiro parâmetro de comparação é a área média por lipídio ($\langle A_L \rangle$), já que lipídios que possuem alta fluidez possuem uma maior área por lipídio. Nos 10ns finais da simulação de DM com a membrana, a área média foi de $3756,36 \text{ \AA}^2$, com desvio padrão de $203,34 \text{ \AA}^2$, resultando em $\langle A_L \rangle = 64,76 \text{ \AA}^2$. Estudos envolvendo simulações de POPC solvatadas em solução de KCl 200mM obtiveram $\langle A_L \rangle = 63,9 \text{ \AA}^2$ ⁷² e uma mensuração obtida experimentalmente obteve $\langle A_L \rangle = 68,3 \text{ \AA}^2$ ⁷³.

Outra propriedade bastante usada é o parâmetro de ordem do lipídio. Cada fase da membrana possui uma faixa de parâmetro de ordem característica, reflexo da variação dos ângulos da ligação C-H das cadeias, como mostrado na seção 3.7. Na figura abaixo (figura 15) encontram-se os perfis de parâmetros de ordem obtidos pela análise de 46ns da trajetória gerada neste trabalho. O perfil produzido é bem semelhante ao de outros estudos envolvendo bicamadas de POPC^{69,74}.

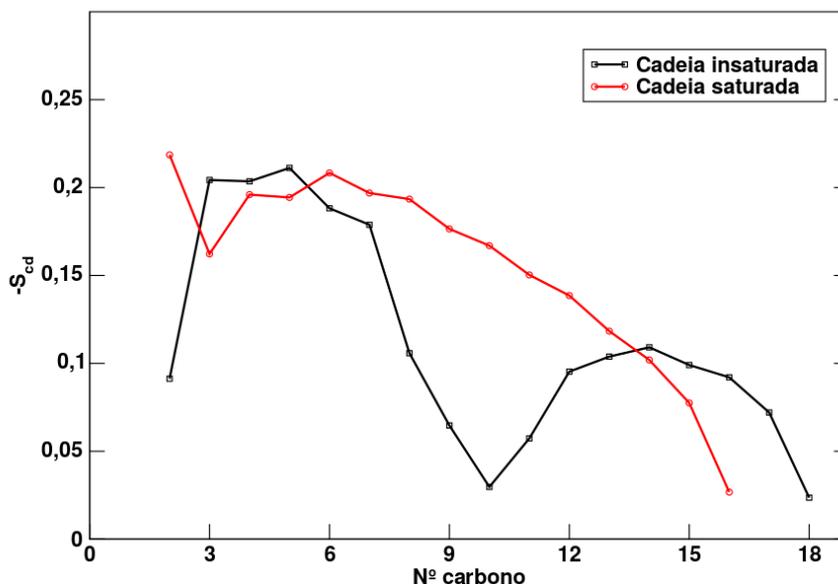


Figura 15: Parâmetro de ordem ($-S_{cd}$) por carbono. Quanto menor o valor de $-S_{cd}$ maior a variação de conformações entre os microestados analisados.

A semelhança entre os perfis sugere que a simulação de DM foi exitosa em levar a membrana do estado cristalino à fase líquida. Com a caracterização de fase completa, esse segmento tornou-se válido para compor o sistema inicial de várias simulações, inclusive de colaboradores, como cálculos de propriedades físico-químicas de ligantes, ou ter uma proteína de membrana ancorada. Caso o segmento de membrana não tenha tamanho suficiente, o fato dessa membrana ter sido gerada numa simulação com condições periódicas de contorno permite replicá-la nos eixos desejados até obter a área de membrana necessária.

Um cálculo de propriedades físico-químicas em que a membrana gerada já foi utilizada é o cálculo da energia de partição do anestésico geral sevoflurano no sistema água-membrana, via *adaptive biasing force* (ABF – seção 3.8). Conhecer a região de maior preferência auxilia na busca de sítios de ligação – a maioria dos sítios deverão estar nessa região. Além disso, conhecer o reservatório da molécula é um detalhe importantíssimo no esclarecimento de sua farmacodinâmica e farmacocinética. A simulação de ABF teve 274ns de duração, com a energia do caminho de partição e a quantidade de microestados por janela mostradas na figura 16.

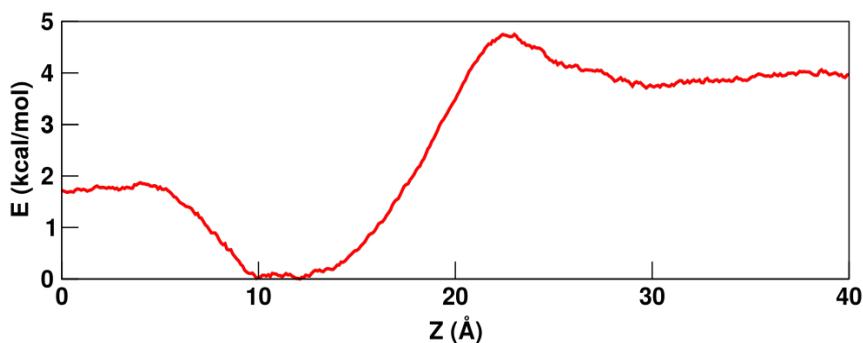
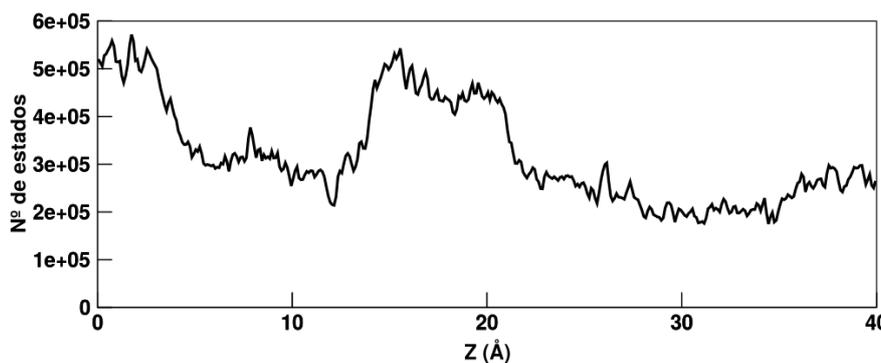
A**B**

Figura 16: Resultados da simulação de ABF. (A) Paisagem de energia livre calculada para o sevoflurano em função do eixo transmembrânico. A origem das coordenadas está no centro da membrana. A interface membrana-água está em $Z=20\text{Å}$ e a partir de $Z=30\text{Å}$, o ambiente é composto somente por água.

(B) Número de estados amostrados pelo ABF em 274ns de simulação.

O perfil indica que o caminho energético do sevoflurano favorece a permanência no ambiente lipídico, condizente com o fato de os anestésicos terem maior afinidade aos solventes apolares. Porém, devida a heterogeneidade dos grupos lipídicos ao longo do eixo transmembrânico, a paisagem de energia ao longo da membrana não é homogênea. Segundo o perfil, a região de maior preferência do ligante é a região entre 9 e 15Å , que de acordo com a figura 14 é a interface da cabeça polar com as caudas lipídicas, região onde em outras simulações também é vista uma maior frequência da permanência de anestésicos, como em cálculos com isoflurano, e simulações de *flooding* com o sevoflurano (dados não publicados).

4.2 . Descoberta e validação do sítio do poro central

Com diversas evidências de que a interação de anestésicos gerais com os canais iônicos se dá pela interação direta, uma questão que surge é a de quais são as regiões da proteína que são importantes para essa interação. Diversos trabalhos vêm mostrando que existem resíduos-chave para a interação do anestésico^{36,40,75} e há a presença de múltiplos sítios de ligação^{46,48}. Porém, não se sabe se todos os sítios foram caracterizados, levando a necessidade de encontrar mais sítios candidatos, e a ideia de que a abertura do canal é consequência de uma ligação dependente de conformação precisa de que os estados aberto e fechado possuam sítios com diferenças tanto em

energias de ligação quanto em localização. Os sítios podem ser encontrados por vários métodos *in vitro*, como mutações sítio-dirigidas⁴⁰, experimentos de ligação irreversível⁴⁶, e também por ferramentas *in silico*, como simulações de dinâmica molecular de *flooding* e *docking* molecular. O uso do *docking* se dá pela rapidez do método e a necessidade primária de encontrar sítios candidatos – suas validações serão feitas pela metodologia de *free energy perturbation* (FEP).

O *docking* do sevoflurano na conformação aberta do Kv1.2 sugeriu 30000 soluções, separadas em 8 sítios (figura 17). Os sítios estão distribuídos em várias regiões da proteína, como na região transmembrânica, na porção voltada extracelularmente e na interface água-lipídio. Também existiu a ocorrência de soluções em locais bastante hidratados, como o poro de condução da proteína e dentro dos sensores de voltagem. Na conformação fechada, o *docking* também apontou 30000 soluções, agrupadas em 8 sítios. Por causa da mudança de conformação, os sítios se dispõem de uma maneira diferente do aberto, apesar de ocuparem regiões semelhantes. A *score function* do *docking* não sugeriu grandes diferenças entre as energias dos sítios da conformação aberta e fechada. Os sítios sugeridos são cavidades anfífilicas que podem permitir o acesso tanto da água como das caudas lipídicas (figura 18).

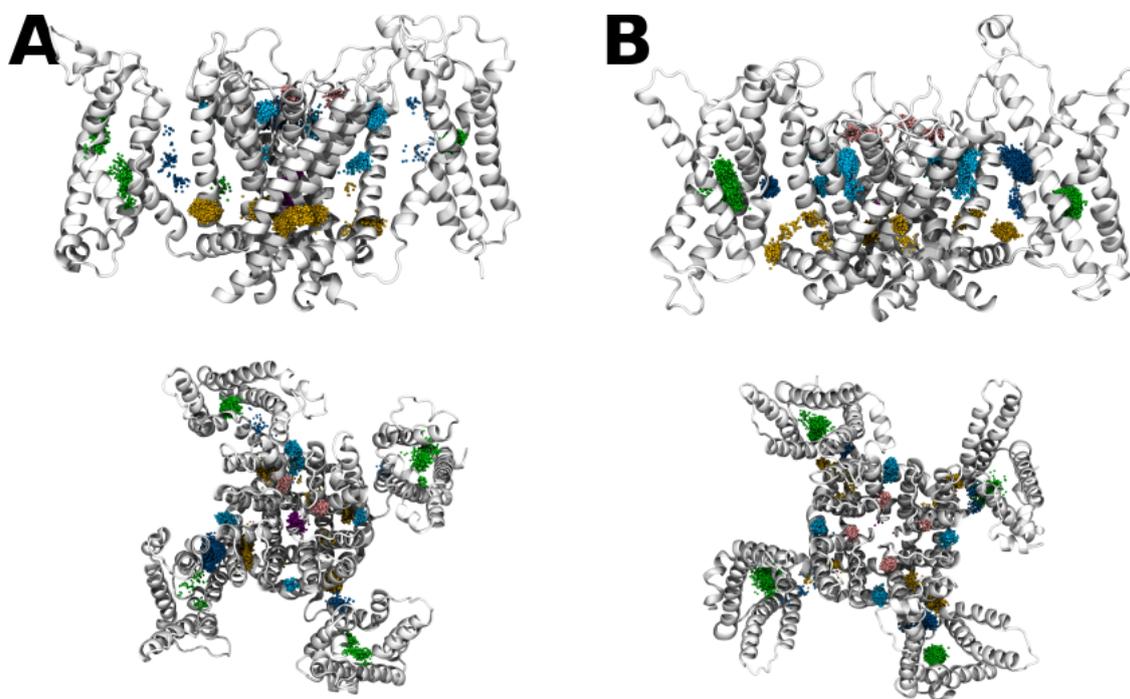


Figura 17: Soluções sugeridas pelo *docking* para as conformações fechada (A) e aberta (B). Cada sítio está representado por uma cor. Figura cedida por Leticia Stock.

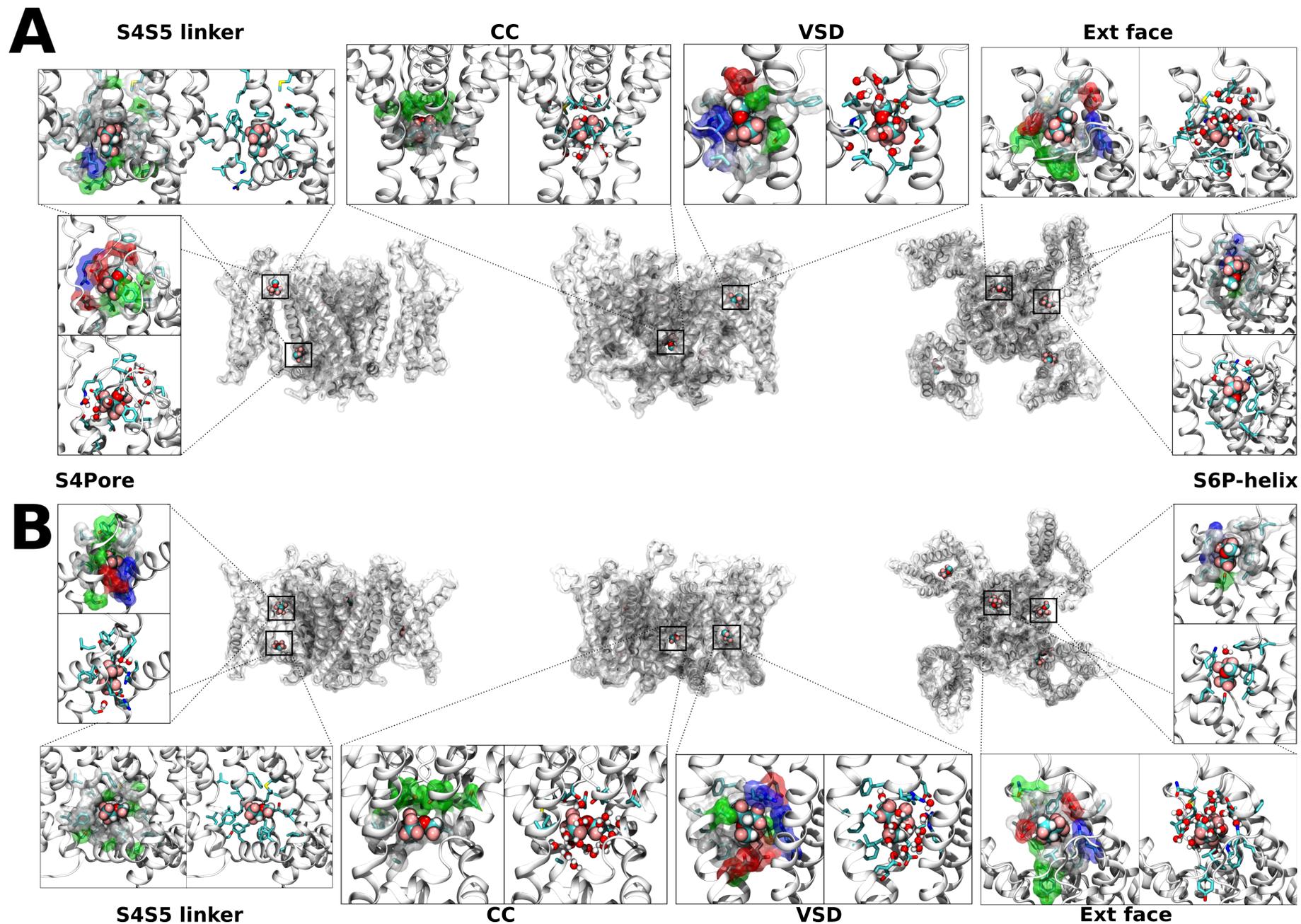


Figura 18: Sítios de interação sugeridos pelo *docking* para a conformação fechada (A) e aberta (B). Para cada sítio, à esquerda está representada a superfície molecular dos sítios (vermelho - negativo; azul - positivo; verde - polar neutro; branco - hidrofóbico). Na direita estão representadas as moléculas de água do complexo, caso existam. Legenda dos sítios: **VSD** - domínio sensor de voltagem; **CC** - cavidade central; **Ext face** – filtro de seletividade; **S4S5 linker** – *linker*; **S4Pore**- interface hélice S4-PH.

A ferramenta de *docking* sugeriu soluções na cavidade central da proteína, tanto para a conformação aberta quanto para a fechada. Doravante, esse sítio será referido como sítio da cavidade central (CC). Como mostrado na tabela 2, a conformação fechada possui mais soluções e um menor valor de energia. Porém, o sevoflurano é um conhecido ativador do Kv1.2, e a localização desse sítio de ligação a princípio não é muito condizente com a ação ativadora, afinal na conformação aberta a molécula deverá competir com o íon na cavidade central, e ainda pode causar um bloqueio estérico no caminho de condução do íon, característica de inibidores de canais iônicos – a ligação no poro central é um mecanismo muito comum de inibição^{51,76}. Apesar das possibilidades levantadas, esse sítio ainda pode ser um falso positivo sugerido pelo *docking*, que será avaliado através dos cálculos de FEP, uma metodologia mais precisa de cálculo de energia.

Tabela 2: Dados do sítio da cavidade central obtidos do *docking* do sevoflurano no Kv1.2 .

Conformação	Energia estimada	Nº de soluções	Aminoácidos
Aberta	-4,8 kcal/mol	17	Met372, Thr373, Thr374, Ala395, Ile396, Gly398, Val399, Ile 402, Ala403
Fechada	-5,14 kcal/mol	478	Met372, Thr373, Thr374, Gly398, Val399, Ile 402, Ala403, Val406, Pro407

Para cada conformação do canal, foram realizadas duas simulações de FEP independentes, chamadas de réplicas, partindo de $\lambda = 0$ e finalizando em $\lambda = 1$. A configuração espacial inicial era correspondente à solução de *docking* de menor energia (vide seção 3.12). A molécula de sevoflurano esteve no espaço correspondente ao sítio de ligação durante toda a extensão de todas as réplicas realizadas (figura 19).

A variação de energia livre de ligação do sevoflurano para o sítio CC calculada pelo FEP mostra um valor negativo para ambas as conformações (tabela 3). Isso indica que o sítio de ligação realmente existe, tanto na conformação aberta quanto fechada, e inclusive com menor energia no estado fechado, resultado condizente com a maior sugestão de soluções na conformação fechada pelo *docking*, além de evidenciar a dependência conformacional da interação sevoflurano-Kv1.2. A maior afinidade para o estado fechado favoreceria o deslocamento do equilíbrio para a conformação fechada do canal, porém cabe ressaltar que o deslocamento do equilíbrio para o estado aberto ou fechado também depende da contribuição de diversos outros sítios distribuídos na proteína, onde inclusive muitos possuem repetições em cada monômero. Como a maioria desses sítios possuem uma estabilização preferencial pelo estado aberto (dados em fase de publicação), a influência do sítio do poro central no equilíbrio conformacional aberto-fechado acaba sendo irrisória.

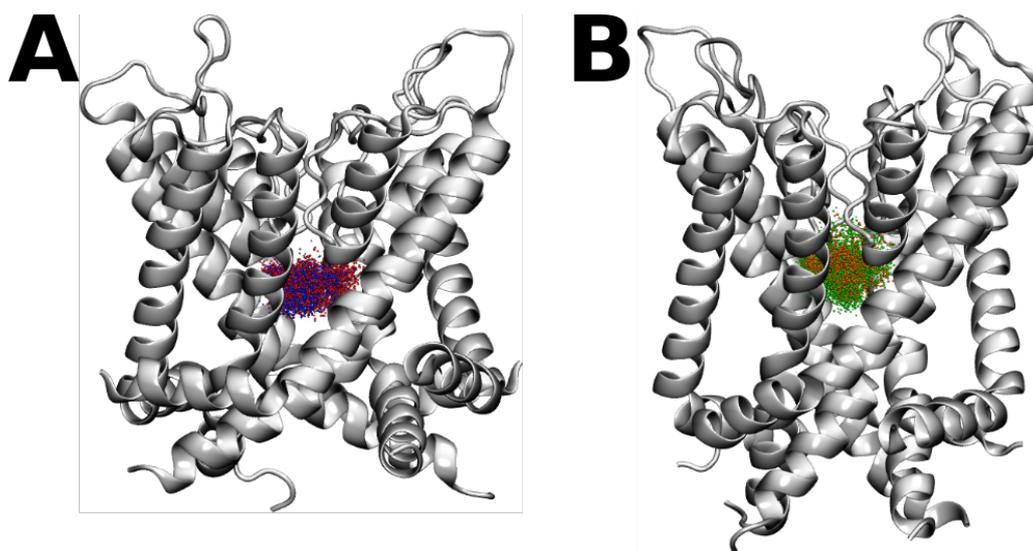


Figura 19: Posição do carbono-2 (FCH₂O - C - 2CF₃) do sevoflurano nas trajetórias de FEP nos estados aberto (A) e fechado (B). Cada cor representa uma réplica.

Tabela 3: Dados dos cálculos de FEP para o sítio da cavidade central.

FEP sítio cavidade central – sevoflurano				
Conformação	ΔG SOS (kcal/mol)	Constante de força (kcal/mol Å)	Constante de ligação (M⁻¹)	ΔG_{lig} (kcal/mol)
Aberta	-4,21	0,24	36,81	-2,15 ± 0,15
Fechada	-5,68	0,16	437,78	-3,60 ± 0,15

4.3 . Análise termodinâmica da competição com K⁺

Com o sítio CC validado, pode-se afirmar que o sevoflurano possui afinidade com a região do poro central. Porém, outras moléculas também podem acessar o poro, por ter uma energia de ligação favorável àquela região. Uma dessas moléculas é o íon potássio, que conhecidamente passa pelo sítio CC, parte de seu caminho de permeação ao longo do canal iônico. Dessa maneira, surge a necessidade de comparar a interação do sevoflurano no sítio CC com a interação do potássio nesse sítio, para avaliar qual dos dois estados é mais espontâneo. Essa comparação será feita apenas para a conformação aberta do canal, já que a conformação fechada impede o acesso de quaisquer moléculas na cavidade central, tornando desnecessário um experimento de competição.

O evento de competição foi descrito utilizando um ciclo de três estados: canal vazio, canal com K⁺ e canal com sevoflurano. A energia livre, e por consequência a constante de ligação, associada à ligação do sevoflurano já foi calculada na seção anterior. Resta o cálculo de energia de ligação do potássio no sítio CC, que foi realizado em duas etapas. A primeira corresponde ao cálculo de FEP com o íon no sítio, que sofreu o desligamento gradual de suas interações

intermoleculares. A segunda foi o cálculo da energia de solvatação do íon, através de um FEP do íon numa superfície isotrópica de água pura. A energia total de ligação equivale à soma dessas energias, semelhante ao processo explicado no final da seção 3.5.

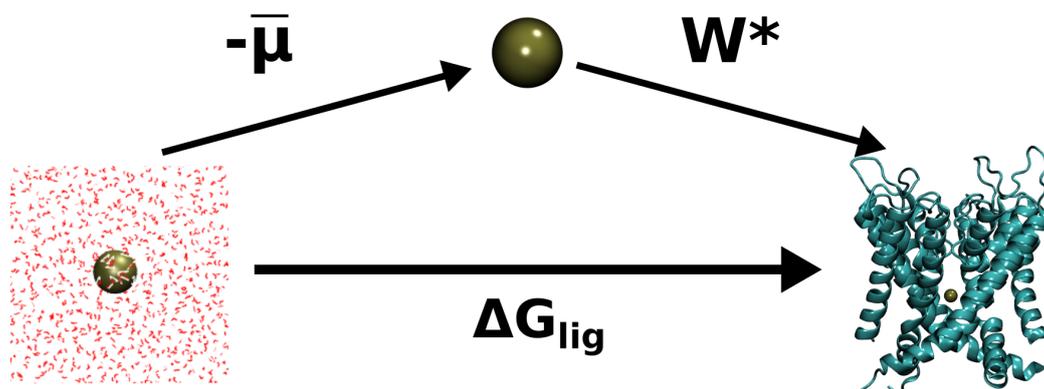


Figura 20: Esquema de cálculo de energia para a ligação do íon no sítio central. O valor de energia $-\bar{\mu}$ corresponde ao custo energético de retirar a camada de solvatação do íon, enquanto W^* é a energia de ligação do K^+ no vácuo para o sítio (calculado pelo FEP). A variação de energia total ΔG_{lig} do processo corresponde à soma dessas energias.

Cada etapa mostrada na figura 20 teve sua variação de energia livre calculada utilizando-se duas réplicas. Os valores calculados estão na tabela 4.

Tabela 4: Variações de energia obtidas diretamente do FEP (Energia calculada), constante de força utilizada e variação de energia livre absoluta (ΔG) do processo. O cálculo de ΔG está conforme a seção 3.6. A variação de energia livre total (ΔG_{lig}) corresponde à do processo mostrado na figura 20.

FEP sítio cavidade central – K^+			
	Energia calculada	Constante de força (kcal/mol Å)	ΔG_{lig} (kcal/mol)
Solvatação ($-\bar{\mu}$)	-65,10	-	$-65,10 \pm 0,05$
Ligação (W^*)	-72,54	0,07	$-71,66 \pm 0,15$
		ΔG_{lig}	$-6,56 \pm 0,2$

Inserindo esses resultados no ciclo proposto, é mostrado que a ligação do sevoflurano no poro central possui menos afinidade que a ligação do potássio no mesmo sítio, ou seja, o K^+ é o vencedor na competição sevoflurano-potássio no sítio CC.

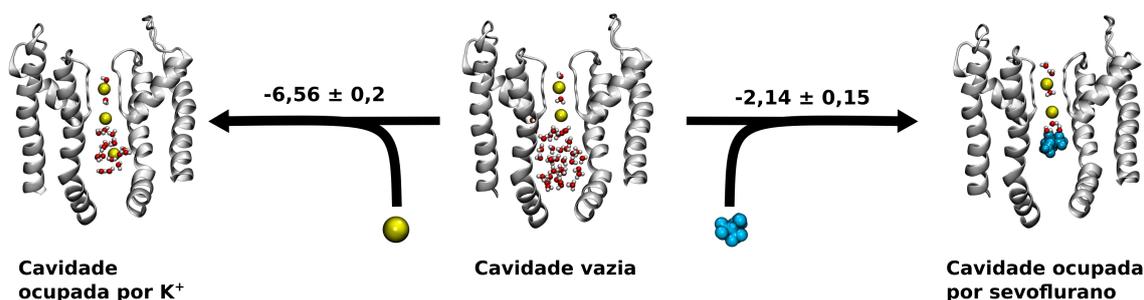


Figura 21: Ciclo de três estados para a ligação do K^+ e sevoflurano no sítio do poro central. Energias em kcal/mol.

As constantes de ligação e as variações de energia livre desse ciclo foram obtidas em sistemas considerados no equilíbrio, ou seja, não houve aplicação de campo elétrico (e por consequência ΔV) nos sistemas utilizados, tornando nula a influência da voltagem nos cálculos. Assim, na presença de ΔV , a entrada do íon K^+ na cavidade central possui uma diferença energética em comparação ao íon K^+ que está na solução, já que houve um deslocamento de carga ao longo do campo elétrico. Nessa situação, essa diferença é denominada como excesso de energia livre⁷⁷, que é proporcional ao potencial elétrico, à distância elétrica percorrida pela molécula e a carga (vide seção 3.3). Considerar a influência da voltagem é imprescindível, pois a condição fisiológica normal de um canal iônico é sob a presença de uma diferença de potencial elétrico, que faz com que trabalho elétrico seja realizado nos resíduos carregados e nos íons, influenciando consideravelmente a energética de todos processos em que eles estão envolvidos, como a condução pelo canal iônico. Dessa maneira, é importante avaliar a influência do campo elétrico na competição do potássio com o sevoflurano. O cálculo do perfil de distância elétrica foi feito por colaboradores, a partir dos perfis eletrostáticos ao longo do eixo z, passando pelo poro central do Kv1.2, num raio de 11Å (figura 22) de uma simulação com $\Delta V = 600mV$ e outra com $\Delta V = 0mV$.

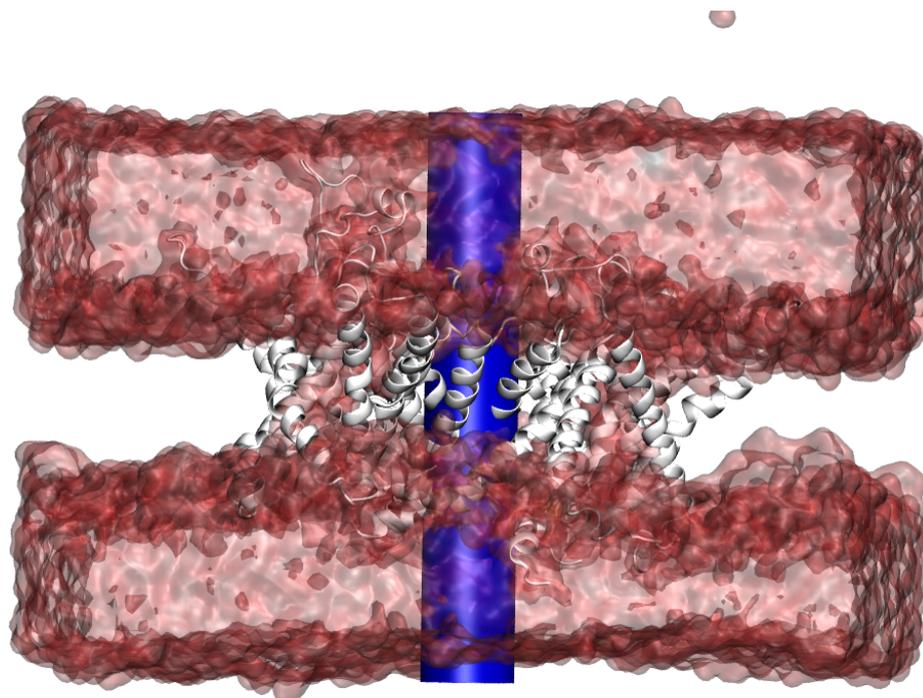


Figura 22: Região do perfil eletrostático utilizado para os cálculos de distância elétrica, representado no cilindro azul. O volume de água está representado em vermelho e a proteína em cinza. A membrana foi ocultada para melhor visualização.

O potássio estava posicionado cerca de $Z=27\text{\AA}$, acoplado a 39% da variação de potencial elétrico ($\delta_c = 0,39$). Numa voltagem de 100mV ($2,3 \text{ kcal}(\text{mol } e)^{-1}$), o excesso de energia leva a um decréscimo de $0,89\text{kcal/mol}$ na energia livre de ligação do potássio no sítio CC. Essa contribuição do excesso de energia faz com que a competição no poro central torne-se ainda mais favorável à permanência do potássio, resultado totalmente condizente com o fluxo iônico observado pelos experimentos de eletrofisiologia⁴⁰.

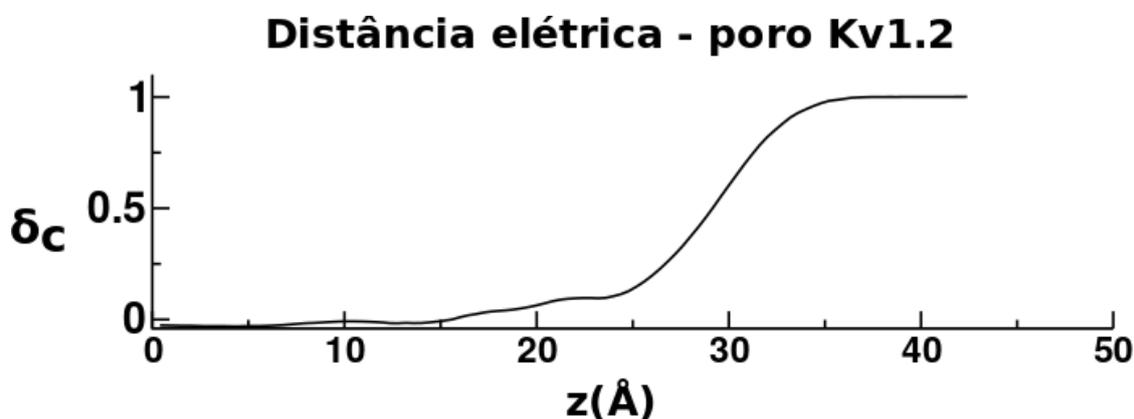


Figura 23: Perfil de distância elétrica do poro do canal Kv1.2 . Cedido por Werner Treptow.

No ciclo de três estados, são abarcadas as possibilidades apenas de ligação do íon ou do ligante na CC. Esse ciclo mostra-se incompleto ao não considerar a possibilidade de uma dupla ocupação: a coexistência do anestésico com o íon no poro central. Assim, surge a necessidade de incrementar o ciclo em mais um estado, o canal ocupado simultaneamente por K^+ e sevoflurano. Obter o custo energético para esse estado trará noção do quanto esse estado é passível de existência. Caso a coexistência seja proibitiva, numa condição de fluxo iônico, os canais não possuirão moléculas de sevoflurano presentes no caminho de permeação. Outra situação também se torna válida: caso a presença simultânea não seja favorável, a presença de uma molécula de sevoflurano no CC pode causar uma interrupção no caminho de permeação iônica, inibindo o canal Kv1.2 .

Um palpite inicial pode ser dado através da realização de *docking* com as estruturas do canal Kv1.2 aberto com a presença de um K^+ no poro central. Foram utilizados como receptores proteicos os mesmos microestados utilizados no *docking* da conformação aberta, com a inserção de um potássio no centro do sítio CC (a numeração dos resíduos de aminoácido está definida na tabela 2). Todos os outros parâmetros, como tamanho do espaço de busca e flexibilidade do ligante, permaneceram os mesmos. Como está sendo avaliada a possibilidade de saturação dupla no sítio, é possível considerar o *docking* do sevoflurano na presença do íon no poro central como um procedimento de *redocking*.

Foram sugeridas 30000 soluções, distribuídas em diversos sítios ao longo da proteína. No sítio do poro central, foram sugeridas apenas três soluções (figura 24), com as energias sugeridas em valores próximos (-4,7 , -4,8 e -5,2 kcal/mol). Esse número é 17,6% do número de soluções encontradas no *docking* do estado aberto vazio. Esse resultado sugere que a presença do K^+ pode afetar a estabilidade do sevoflurano na cavidade central. Porém, os valores de energia de ligação sugeridos não acompanham esse fato, afinal a variação de

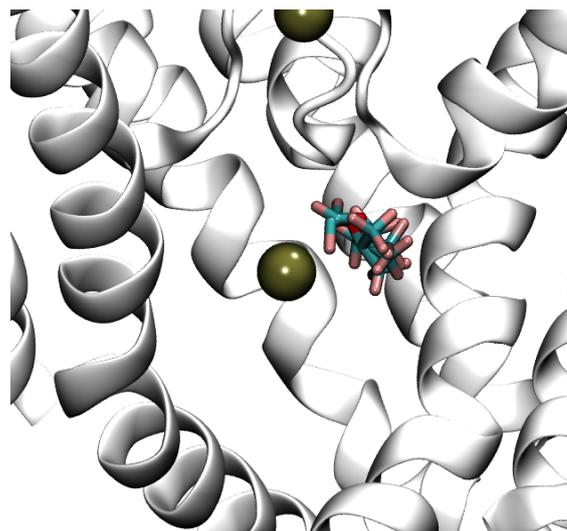


Figura 24: Soluções sugeridas pelo *docking* do sevoflurano no canal Kv1.2 aberto com um íon K^+ presente no sítio da cavidade central.

energia livre é negativa, inclusive menor do que a obtida no *docking* sem o K^+ . Isso mostra que a estimativa de energia está bem inacurada, não podendo ser utilizada na avaliação da coexistência do K^+ e sevoflurano nesse sítio. Essa estimativa de energia, como já foi dito, é causada pelas limitações da *score function* do *docking*, que já tem problemas em tratar interações eletrostáticas entre a molécula e aminoácidos, logo, é esperado ter problemas em interações entre moléculas e íons. Um valor acurado da energia associada à esse processo pode ser calculado através do FEP, que inseriria uma molécula de sevoflurano no sítio central ocupado por um K^+ .

O FEP foi realizado em duas réplicas, que foram construídas a partir do microestado de menor energia sugerido pelo *docking*. Devido ao pequeno número de soluções sugeridas pelo *docking*, que levou a um baixo valor de MSF (definido na seção 3.5), o valor da constante de força utilizado para manter o sevoflurano no sítio foi o mesmo do cálculo na conformação aberta vazia (0,24 kcal/(molÅ)). Também foi aplicado um potencial harmônico com a constante de 10 kcal/(molÅ) para manter o K^+ no centro do sítio.

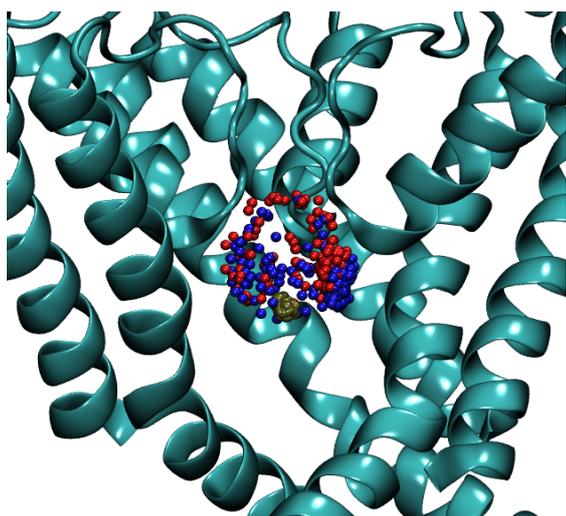


Figura 25: Posição do carbono-2 (FCH₂O - C - 2CF₃) do sevoflurano nas trajetórias de FEP. Os pontos azuis e vermelhos foram obtidos de cada réplica. Os pontos marrons representam a posição do K⁺.

Tabela 5: Propriedades obtidas no FEP do sevoflurano na cavidade central com K⁺.

FEP sítio cavidade central – sevoflurano	
ΔG SOS (kcal/mol)	-1,54
Constante de força (kcal/mol Å)	0,24
Constante de ligação (M⁻¹)	0,42
ΔG absoluto (kcal/mol)	0,51

Os resultados mostrados na tabela 5 mostram que a coabitação do sítio CC pelo sevoflurano e K⁺ possui um custo de 0,51 kcal/mol. Esse custo energético não é alto, tornando esse estado passível de acontecimento em situações de acréscimo de potencial, como um estabelecimento de potencial químico, ou até flutuações térmicas. Além disso, é possível ver na figura 25 que não houve um grande espalhamento do K⁺ no sítio, abrindo a possibilidade de que existem microestados de coabitação no sítio CC onde o K⁺ esteja melhor posicionado com o sevoflurano, permitindo uma diminuição dessa penalidade. A figura 26 apresenta o ciclo de quatro estados, que agora engloba todas as possibilidades de ocupação do sevoflurano e K⁺ no sítio.

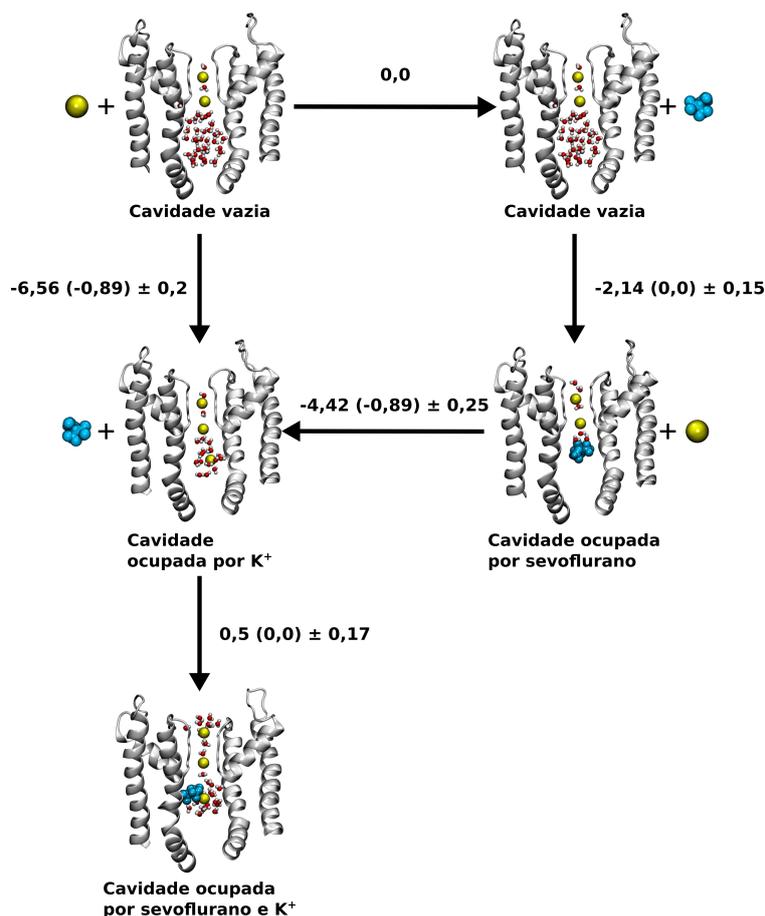


Figura 26: Ciclo termodinâmico dos quatro estados possíveis de ocupação do canal Kv1.2 por sevoflurano. Os valores de energia estão em kcal/mol. Entre parênteses está o valor de energia correspondente ao excesso de energia livre associado a mover um íon K⁺ até uma distância elétrica de 0,39 a 100mV. A variação de energia total considerando a influência de ΔV equivale à soma desses dois componentes.

4.4 . Dinâmica da interação com voltagem

O ciclo proposto na seção anterior mostrou que em voltagens despolarizadoras o íon possui melhor afinidade para a ligação ao poro central. Porém, a abordagem energética não excluiu a possibilidade de coexistência de íon e anestésico no poro central da proteína, devida à baixa barreira de energia e a rigidez imposta na amostragem do potássio. Dessa maneira, para avaliar os efeitos da corrente iônica do Kv1.2 na presença de sevoflurano, foram realizadas simulações de dinâmica molecular com o protocolo de aplicação de voltagem constante, como demonstrado na seção 3.13.

O final da trajetória de equilíbrio de uma das réplicas do FEP no sítio CC foi utilizado como sistema inicial da simulação. Vale ressaltar que a partir da simulação com diferença de voltagem não existe nenhuma aplicação de potenciais artificiais. O sistema possuía uma diferença de carga inicial de $16e$ e uma área transversal de $24388,87\text{\AA}^2$, que de acordo com as informações presentes na seção 3.2, leva a uma voltagem aproximada de 1,05V. Foi escolhido um ΔV maior que

o das condições fisiológicas para acelerar a taxa de amostragem dos eventos voltagem-dependentes, como a condução. No início da simulação, houve uma breve orientação das cargas do sistema, como os aminoácidos carregados da proteína, principalmente do VSD, e dos íons do filtro de seletividade. A trajetória possui 33ns no total, e uma diferença de potencial elétrico média de 800mV (Figura 27).

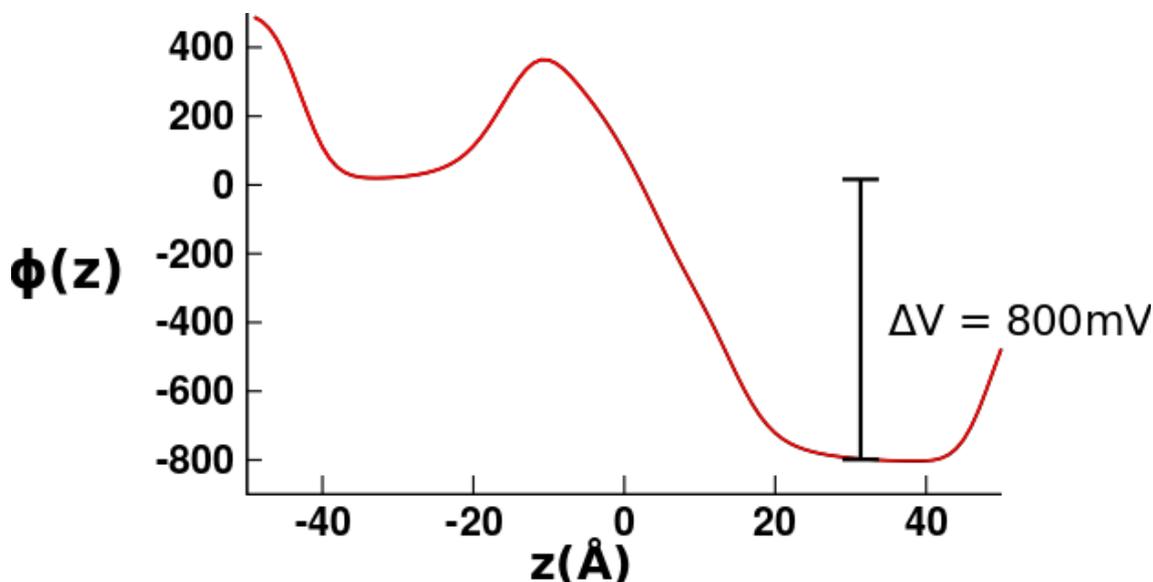


Figura 27: Perfil eletrostático médio $\phi(z)$ da simulação de corrente com Kv1.2 e sevoflurano. O centro da membrana está situado em $z=0\text{\AA}$. A diferença de potencial elétrico é dada pela diferença entre os platôs. Para $z < -40\text{\AA}$ e $z > 40\text{\AA}$, o perfil torna-se desconfigurado devido ao efeito de borda da simulação em z .

Na trajetória é possível ver diversos íons K^+ atravessando o sistema pelo poro de condução do Kv1.2, mesmo com a presença do sevoflurano no mesmo sítio (figura 28). Esse resultado afirma que a coexistência do íon com o sevoflurano na cavidade central é possível, principalmente em situações de fluxo iônico. Assim, apesar de o sevoflurano poder estar presente no caminho de condução iônica, o canal permanece condutivo.

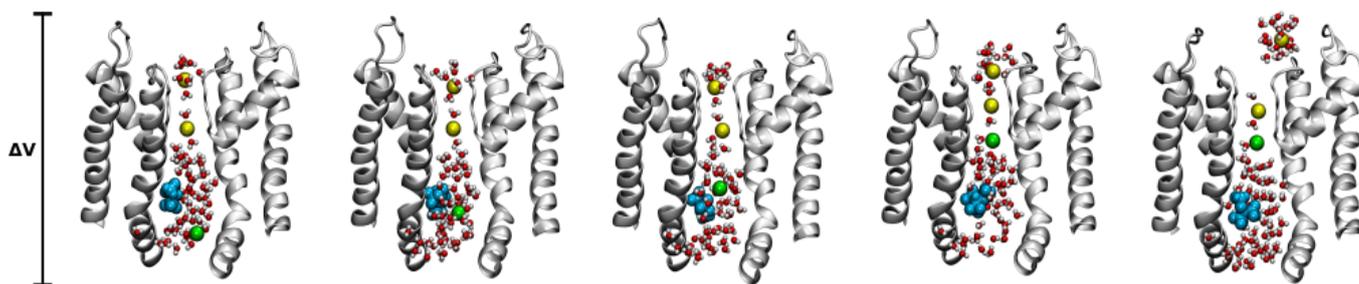


Figura 28: Trajetória de íons K^+ difundindo através do poro de condução do Kv1.2 com a presença de uma molécula de sevoflurano na cavidade.

As coordenadas dos íons que foram conduzidos na simulação e do sevoflurano estão apresentadas na figura 29. Ocorreram 9 eventos de condução na simulação, que levou à uma corrente média de 43pA.

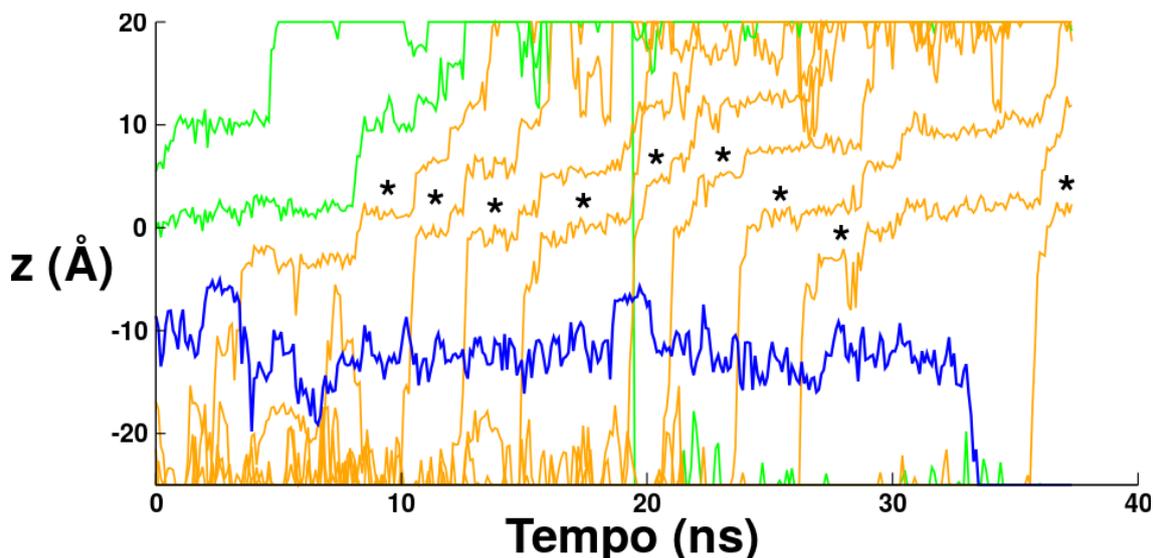


Figura 29: Coordenadas em z ao longo tempo do sevoflurano (azul), dos íons K^+ que iniciaram no filtro de seletividade (verde) e dos íons K^+ que foram conduzidos (laranja). Cada asterisco marca um evento de condução detectado. Note que o 4º evento de condução faz com que um dos íons que iniciou no filtro de seletividade seja movido para o banho inferior (a escolha de qual íon deve ser movido é feita aleatoriamente pelo programa - seção 3.2).

É possível ver que no final da simulação o sevoflurano sai do sítio CC, indo para a solução intracelular. Assim, após 33ns, o canal encontra-se no estado apenas ocupado por íons na cavidade central, que de acordo com o ciclo apresentado na figura 26, é o estado com o menor caminho de energia possível, mostrando que a simulação com ΔV constante está em concordância com toda a descrição termodinâmica realizada neste trabalho. Não será possível avaliar se existe a possibilidade de ligação espontânea do sevoflurano no sítio CC em condições de fluxo iônico, afinal o anestésico está numa condição altamente diluída (cerca de $7,73 \times 10^{-4}M$), e o sítio da cavidade central tem que competir com outros sítios que possuem mais afinidade^{40,48}, tornando a probabilidade desse estado baixíssima, necessitando de longas escalas de tempo para poder amostrá-lo.

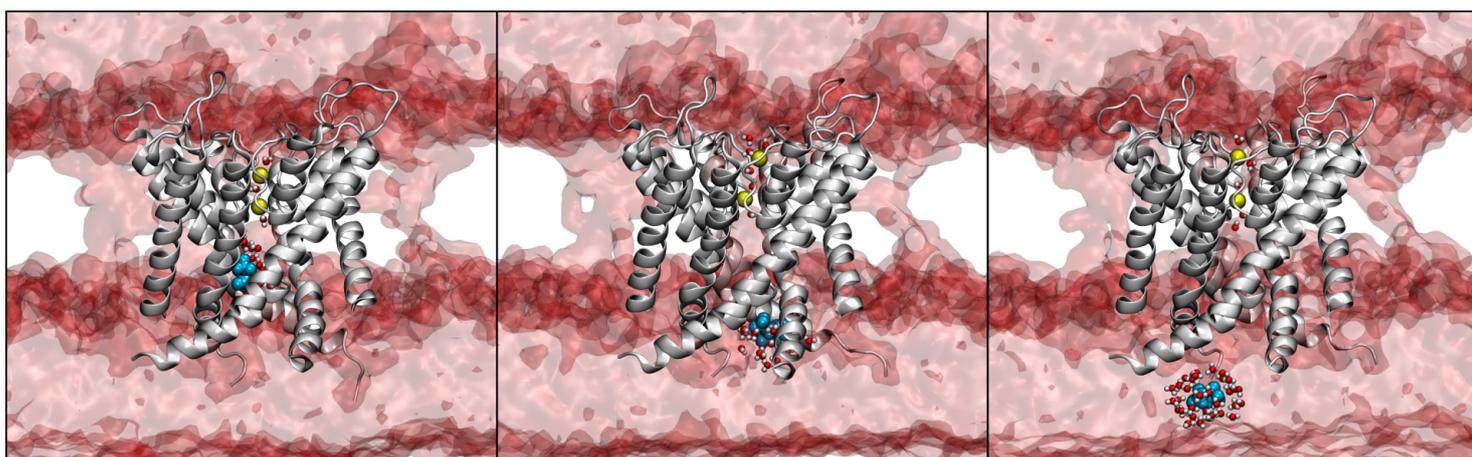


Figura 30: Trajetória do sevoflurano saindo do sítio da cavidade central após 33ns de aplicação de voltagem constante. As moléculas de água mostradas explicitamente são as moléculas que se encontram até 4Å do sevoflurano ou K^+ . As demais moléculas de água estão representadas pela superfície vermelha.

5 . Conclusão

Este trabalho consiste no uso de diversas ferramentas teóricas e computacionais para estudar a interação do anestésico geral sevoflurano com elementos importantes da sua farmacodinâmica: a membrana de POPC e o canal Kv1.2.

O estudo com membrana necessitava de uma validação do modelo de POPC, que foi realizada pela obtenção de propriedades da membrana tais quais: densidades de grupos, área por lipídio e parâmetro de ordem, e sua comparação com os resultados obtidos em outros estudos. O segmento de membrana mostrou estar na íntegro e na fase líquida, fase presente nas condições fisiológicas. Assim, foi feito um sistema composto por água, membrana e sevoflurano para avaliar qual região possui mais afinidade pelo anestésico. Foi demonstrado que o sevoflurano possui maior afinidade pela interface entre as cabeças polares e cauda lipídica do POPC.

Em relação à interação com o Kv1.2, a literatura vem mostrando que é uma interação dependente de concentração e com a presença de múltiplos sítios. Um sítio em particular merece atenção especial: o sítio do poro central. Esse sítio vêm sendo corriqueiramente sugerido por diversas metodologias independentes. Porém, a presença de uma molécula ativadora no caminho de condução iônica levanta desconfiança. Uma primeira possibilidade era que a sugestão desse sítio podia ser um falso positivo das metodologias utilizadas, mas os cálculos de energia realizados neste trabalho mostraram que o sítio de fato existe. Com a existência confirmada, o sevoflurano ainda precisa competir com os íons que passam pela cavidade central para se ligar no sítio. Foi feita uma descrição termodinâmica que descreveu a competição entre íon e anestésico, sem presença de voltagem, e as variações de energia livre de cada processo foram calculadas. Nessas condições, a ligação do potássio já mostra-se mais provável, devido ao menor valor de energia padrão de ligação em comparação à do sevoflurano. Ademais, quando considerada a voltagem, a ligação do K^+ possui mais afinidade do que nas condições de equilíbrio.

Esse ciclo proposto não englobava a possibilidade de coexistência de K^+ e sevoflurano, que possui um pequeno custo energético para acontecer. Simulações com presença de voltagem do Kv1.2 com o sevoflurano no poro central demonstraram que a presença do anestésico não atrapalha a condução iônica do canal. Inclusive, a molécula de sevoflurano desocupa o sítio no final da simulação, levando ao estado mais provável do ciclo termodinâmico proposto, o canal ocupado somente por K^+ .

Em conjuntura, os resultados obtidos neste trabalho permitem afirmar que para a interação sevoflurano-Kv1.2, o sítio da cavidade central não é um falso positivo, e quando ocupado, não

ocorre nenhum impedimento estérico no poro, permitindo o canal a continuar conduzindo íons, como visto nas mensurações eletrofisiológicas. Não é possível afirmar se a presença do anestésico é relacionada com o aumento de corrente máxima do canal, além de fazer inferências do comportamento da corrente iônica em estados de ocupação de duas ou mais moléculas de sevoflurano. As conclusões obtidas neste estudo são de extrema importância para o esclarecimento de um ponto dentre vários outros que compõem o mecanismo molecular de funcionamento dos anestésicos gerais, problema ainda sem solução para a ciência moderna e considerado como um dos maiores desafios para o século⁷⁸.

6 . Referências bibliográficas

1. Honoré, E. The neuronal background K2P channels: focus on TREK1. *Nat. Rev. Neurosci.* **8**, 251–261 (2007).
2. Cohen, A., Ben-Abu, Y., Hen, S. & Zilberberg, N. A Novel Mechanism for Human K2P2.1 Channel Gating FACILITATION OF C-TYPE GATING BY PROTONATION OF EXTRACELLULAR HISTIDINE RESIDUES. *J. Biol. Chem.* **283**, 19448–19455 (2008).
3. Souza, C. S., Amaral, C. & Treptow, W. Electric fingerprint of voltage sensor domains. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **111**, 17510–17515 (2014).
4. Treptow, W. & Tarek, M. Environment of the gating charges in the Kv1.2 Shaker potassium channel. *Biophys. J.* **90**, L64-66 (2006).
5. Amaral, C., Carnevale, V., Klein, M. L. & Treptow, W. Exploring conformational states of the bacterial voltage-gated sodium channel NavAb via molecular dynamics simulations. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **109**, 21336–21341 (2012).
6. Brohawn, S. G. How ion channels sense mechanical force: insights from mechanosensitive K2P channels TRAAK, TREK1, and TREK2. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* n/a-n/a (2015). doi:10.1111/nyas.12874
7. Brohawn, S. G., Su, Z. & MacKinnon, R. Mechanosensitivity is mediated directly by the lipid membrane in TRAAK and TREK1 K⁺ channels. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **111**, 3614–3619 (2014).
8. Lolicato, M., Riegelhaupt, P. M., Arrigoni, C., Clark, K. A. & Minor, D. L. Transmembrane helix straightening and buckling underlies activation of mechanosensitive and thermosensitive K(2P) channels. *Neuron* **84**, 1198–1212 (2014).
9. Thümmler, S., Duprat, F. & Lazdunski, M. Antipsychotics inhibit TREK but not TRAAK channels. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **354**, 284–289 (2007).
10. Trimmer, J. S. & Rhodes, K. J. Localization of Voltage-Gated Ion Channels IN Mammalian Brain. *Annu. Rev. Physiol.* **66**, 477–519 (2004).
11. Long, Q.-Q. *et al.* Long Noncoding RNA Kcna2 Antisense RNA Contributes to Ventricular Arrhythmias via Silencing Kcna2 in Rats With Congestive Heart Failure. *J. Am. Heart Assoc.* **6**, e005965 (2017).
12. Lee, J. K. *et al.* Downregulation of voltage-gated K(+) channels in rat heart with right ventricular hypertrophy. *Am. J. Physiol.* **277**, H1725-1731 (1999).
13. Robbins, C. A. & Tempel, B. L. Kv1.1 and Kv1.2: Similar channels, different seizure models. *Epilepsia* **53**, 134–141 (2012).
14. Fan, L. *et al.* Impaired neuropathic pain and preserved acute pain in rats overexpressing voltage-gated potassium channel subunit Kv1.2 in primary afferent neurons. *Mol. Pain* **10**, 8 (2014).
15. Brew, H. M. *et al.* Seizures and Reduced Life Span in Mice Lacking the Potassium Channel Subunit Kv1.2, but Hypoexcitability and Enlarged Kv1 Currents in Auditory Neurons. *J. Neurophysiol.* **98**, 1501–1525 (2007).
16. Bezanilla, F. The Voltage Sensor in Voltage-Dependent Ion Channels. *Physiol. Rev.* **80**, 555–592 (2000).
17. Schoppa, N. E., McCormack, K., Tanouye, M. A. & Sigworth, F. J. The size of gating charge in wild-type and mutant Shaker potassium channels. *Science* **255**, 1712–1715 (1992).
18. Aggarwal, S. K. & MacKinnon, R. Contribution of the S4 Segment to Gating Charge in the Shaker K⁺ Channel. *Neuron* **16**, 1169–1177 (1996).
19. Long, S. B., Campbell, E. B. & MacKinnon, R. Crystal structure of a mammalian voltage-dependent Shaker family K⁺ channel. *Science* **309**, 897–903 (2005).
20. Franks, N. P. Molecular targets underlying general anaesthesia. *Br. J. Pharmacol.* **147**, S72–S81 (2006).

21. Treptow, W. & Tarek, M. K⁺ Conduction in the Selectivity Filter of Potassium Channels Is Monitored by the Charge Distribution along Their Sequence. *Biophys. J.* **91**, L81–L83 (2006).
22. Seoh, S.-A., Sigg, D., Papazian, D. M. & Bezanilla, F. Voltage-sensing residues in the S2 and S4 segments of the Shaker K⁺ channel. *neuron* **16**, 1159–1167 (1996).
23. Delemotte, L., Tarek, M., Klein, M. L., Amaral, C. & Treptow, W. Intermediate states of the Kv1.2 voltage sensor from atomistic molecular dynamics simulations. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **108**, 6109–6114 (2011).
24. Tao, X., Lee, A., Limapichat, W., Dougherty, D. A. & MacKinnon, R. A Gating Charge Transfer Center in Voltage Sensors. *Science* **328**, 67–73 (2010).
25. Posson, D. J., Ge, P., Miller, C., Bezanilla, F. & Selvin, P. R. Small vertical movement of a K⁺ channel voltage sensor measured with luminescence energy transfer. *Nature* **436**, 848–851 (2005).
26. Vargas, E. *et al.* An emerging consensus on voltage-dependent gating from computational modeling and molecular dynamics simulations. *J. Gen. Physiol.* **140**, 587–594 (2012).
27. Krasowski, M. D. & Harrison, N. L. General anaesthetic actions on ligand-gated ion channels. *Cell. Mol. Life Sci.* **55**, 1278–1303 (1999).
28. Herold, K. F. & Hemmings Jr., H. C. Sodium Channels as Targets for Volatile Anesthetics. *Front. Pharmacol.* **3**, (2012).
29. Barber, A. F., Liang, Q. & Covarrubias, M. Novel Activation of Voltage-gated K⁺ Channels by Sevoflurane. *J. Biol. Chem.* **287**, 40425–40432 (2012).
30. Patel, A. J. *et al.* Inhalational anesthetics activate two-pore-domain background K⁺ channels. *Nat. Neurosci.* **2**, 422–426 (1999).
31. Heurteaux, C. *et al.* TREK-1, a K⁺ channel involved in neuroprotection and general anesthesia. *EMBO J.* **23**, 2684–2695 (2004).
32. Alkire, M. T., Asher, C. D., Franciscus, A. M. & Hahn, E. L. Thalamic microinfusion of antibody to a voltage-gated potassium channel restores consciousness during anesthesia. *Anesthesiology* **110**, 766–773 (2009).
33. Goldstein, D. B. The effects of drugs on membrane fluidity. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **24**, 43–64 (1984).
34. Chen, J., Chen, L., Wang, Y., Wang, X. & Zeng, S. Exploring the Effects on Lipid Bilayer Induced by Noble Gases *via* Molecular Dynamics Simulations. *Sci. Rep.* **5**, 17235 (2015).
35. Miller, K. W., Firestone, L. L., Alifimoff, J. K. & Streicher, P. Nonanesthetic alcohols dissolve in synaptic membranes without perturbing their lipids. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **86**, 1084–1087 (1989).
36. Bu, W. *et al.* Sites and Functional Consequence of Alkylphenol Anesthetic Binding to Kv1.2 Channels. *Mol. Neurobiol.* (2017). doi:10.1007/s12035-017-0437-2
37. Franks, N. P. & Lieb, W. R. Mapping of general anaesthetic target sites provides a molecular basis for cutoff effects. *Nature* **316**, 349 (1985).
38. James, R. & Glen, J. B. Synthesis, biological evaluation, and preliminary structure-activity considerations of a series of alkylphenols as intravenous anesthetic agents. *J. Med. Chem.* **23**, 1350–1357 (1980).
39. Franks, N. P. & Lieb, W. R. Stereospecific effects of inhalational general anesthetic optical isomers on nerve ion channels. *Science* **254**, 427–430 (1991).
40. Liang, Q. *et al.* Positive Allosteric Modulation of Kv Channels by Sevoflurane: Insights into the Structural Basis of Inhaled Anesthetic Action. *PLOS ONE* **10**, e0143363 (2015).
41. Barber, A. F., Liang, Q., Amaral, C., Treptow, W. & Covarrubias, M. Molecular Mapping of General Anesthetic Sites in a Voltage-Gated Ion Channel. *Biophys. J.* **101**, 1613–1622 (2011).
42. Brannigan, G., LeBard, D. N., Hénin, J., Eckenhoff, R. G. & Klein, M. L. Multiple binding sites for the general anesthetic isoflurane identified in the nicotinic acetylcholine receptor transmembrane domain. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **107**, 14122–14127 (2010).

43. LeBard, D. N., Hénin, J., Eckenhoff, R. G., Klein, M. L. & Brannigan, G. General Anesthetics Predicted to Block the GLIC Pore with Micromolar Affinity. *PLoS Comput. Biol.* **8**, e1002532 (2012).
44. Nury, H. *et al.* X-ray structures of general anaesthetics bound to a pentameric ligand-gated ion channel. *Nature* **469**, 428–431 (2011).
45. Jayakar, S. S., Dailey, W. P., Eckenhoff, R. G. & Cohen, J. B. Identification of Propofol Binding Sites in a Nicotinic Acetylcholine Receptor with a Photoreactive Propofol Analog. *J. Biol. Chem.* **288**, 6178–6189 (2013).
46. Woll, K. A. *et al.* Photoaffinity Ligand for the Inhalational Anesthetic Sevoflurane Allows Mechanistic Insight into Potassium Channel Modulation. *ACS Chem. Biol.* (2017). doi:10.1021/acscchembio.7b00222
47. Yokoyama, T. *et al.* Effects of sevoflurane on voltage-gated sodium channel Na_v1.8, Na_v1.7, and Na_v1.4 expressed in *Xenopus* oocytes. *J. Anesth.* **25**, 609 (2011).
48. Stock, L., Hosoume, J. & Treptow, W. Concentration-Dependent Binding of Small Ligands to Multiple Saturable Sites in Membrane Proteins. *Sci. Rep.* **7**, 5734 (2017).
49. Bertaccini, E. J., Dickinson, R., Trudell, J. R. & Franks, N. P. Molecular Modeling of a Tandem Two Pore Domain Potassium Channel Reveals a Putative Binding Site for General Anesthetics. *ACS Chem. Neurosci.* (2014). doi:10.1021/cn500172e
50. Roux, B., Nina, M., Pomès, R. & Smith, J. C. Thermodynamic stability of water molecules in the bacteriorhodopsin proton channel: a molecular dynamics free energy perturbation study. *Biophys. J.* **71**, 670–681 (1996).
51. Barber, A. F., Carnevale, V., Klein, M. L., Eckenhoff, R. G. & Covarrubias, M. Modulation of a voltage-gated Na⁺ channel by sevoflurane involves multiple sites and distinct mechanisms. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **111**, 6726–6731 (2014).
52. Huang, J. & MacKerell, A. D. CHARMM36 all-atom additive protein force field: Validation based on comparison to NMR data. *J. Comput. Chem.* **34**, 2135–2145 (2013).
53. Wang, J., Wolf, R. M., Caldwell, J. W., Kollman, P. A. & Case, D. A. Development and testing of a general amber force field. *J. Comput. Chem.* **25**, 1157–1174 (2004).
54. Schuler, L. D., Daura, X. & van Gunsteren, W. F. An improved GROMOS96 force field for aliphatic hydrocarbons in the condensed phase. *J. Comput. Chem.* **22**, 1205–1218 (2001).
55. Hénin, J., Shinoda, W. & Klein, M. L. United-atom acyl chains for CHARMM phospholipids. *J Chem Phys B* **112**, 7008–7015 (2008).
56. Hénin, J., Brannigan, G., Dailey, W. P., Eckenhoff, R. & Klein, M. L. An Atomistic Model for Simulations of the General Anesthetic Isoflurane. *J. Phys. Chem. B* **114**, 604–612 (2010).
57. Verlet, L. Computer "experiments" on classical fluids. I. Thermodynamical properties of Lennard-Jones molecules. *Phys. Rev.* **159**, 98 (1967).
58. Beeman, D. Some multistep methods for use in molecular dynamics calculations. *J. Comput. Phys.* **20**, 130–139 (1976).
59. Hockney, R. W. Potential Calculation and Some Applications. *Methods Comput Phys* **9** 135-2111970 (1970).
60. Stock, L., Delemotte, L., Carnevale, V., Treptow, W. & Klein, M. L. Conduction in a Biological Sodium Selective Channel. *J. Phys. Chem. B* **117**, 3782–3789 (2013).
61. Delemotte, L., Dehez, F., Treptow, W. & Tarek, M. Modeling Membranes under a Transmembrane Potential. *J. Phys. Chem. B* **112**, 5547–5550 (2008).
62. Phillips, J. C. *et al.* Scalable molecular dynamics with NAMD. *J. Comput. Chem.* **26**, 1781–1802 (2005).
63. Humphrey, W., Dalke, A. & Schulten, K. VMD: Visual molecular dynamics. *J. Mol. Graph.* **14**, 33–38 (1996).

64. Ulmschneider, M. B. *et al.* Molecular dynamics of ion transport through the open conformation of a bacterial voltage-gated sodium channel. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **110**, 6364–6369 (2013).
65. Morris, G. M. *et al.* AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility. *J. Comput. Chem.* **30**, 2785–2791 (2009).
66. Trott, O. & Olson, A. J. AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. *J. Comput. Chem.* **31**, 455–461 (2010).
67. Chipot, C. & Pearlman, D. A. Free Energy Calculations. The Long and Winding Gilded Road. *Mol. Simul.* **28**, 1–12 (2002).
68. Vermeer, L. S., Groot, B. L. de, Réat, V., Milon, A. & Czaplicki, J. Acyl chain order parameter profiles in phospholipid bilayers: computation from molecular dynamics simulations and comparison with ²H NMR experiments. *Eur. Biophys. J.* **36**, 919–931 (2007).
69. Heller, H., Schaefer, M. & Schulten, K. Molecular dynamics simulation of a bilayer of 200 lipids in the gel and in the liquid crystal phase. *J. Phys. Chem.* **97**, 8343–8360 (1993).
70. Darve, E., Rodríguez-Gómez, D. & Pohorille, A. Adaptive biasing force method for scalar and vector free energy calculations. *J. Chem. Phys.* **128**, 144120 (2008).
71. Jorgensen, W. L., Chandrasekhar, J., Madura, J. D., Impey, R. W. & Klein, M. L. Comparison of simple potential functions for simulating liquid water. *J. Chem. Phys.* **79**, 926–935 (1983).
72. Jurkiewicz, P., Cwiklik, L., Vojtíšková, A., Jungwirth, P. & Hof, M. Structure, dynamics, and hydration of POPC/POPS bilayers suspended in NaCl, KCl, and CsCl solutions. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* **1818**, 609–616 (2012).
73. Kučerka, N., Tristram-Nagle, S. & Nagle, J. F. Structure of Fully Hydrated Fluid Phase Lipid Bilayers with Monounsaturated Chains. *J. Membr. Biol.* **208**, 193–202 (2006).
74. Ferreira, T. M. *et al.* Cholesterol and POPC segmental order parameters in lipid membranes: solid state ¹H–¹³C NMR and MD simulation studies. *Phys Chem Chem Phys* **15**, 1976–1989 (2013).
75. Covarrubias, M., Barber, A. F., Carnevale, V., Treptow, W. & Eckenhoff, R. G. Mechanistic Insights into the Modulation of Voltage-Gated Ion Channels by Inhalational Anesthetics. *Biophys. J.* **109**, 2003–2011 (2015).
76. Piechotta, P. L. *et al.* The pore structure and gating mechanism of K2P channels. *EMBO J.* **30**, 3607–3619 (2011).
77. Treptow, W., Tarek, M. & Klein, M. L. Initial Response of the Potassium Channel Voltage Sensor to a Transmembrane Potential. *J. Am. Chem. Soc.* **131**, 2107–2109 (2009).
78. Science, A. A. for the A. of. So Much More to Know … *Science* **309**, 78–102 (2005).