



**Universidade de Brasília**  
Instituto de Ciências Biológicas  
Departamento de Biologia Celular  
Programa de Pós-Graduação em Biologia Molecular

**Análise do impacto da ligação de  
anestésicos no equilíbrio entre estados do  
canal Kv1.2 diretamente de simulações de  
*flooding* em altas concentrações**

Estudante de mestrado  
**Natália Mendes de Oliveira**

Orientador  
**Prof. Dr. Werner Treptow**

Dissertação apresentada como requisito parcial para conclusão do  
Mestrado Profissional do Programa de Pós-Graduação em Biologia  
Molecular

**Brasília**  
**2021**

# Agradecimentos

Parte desse trabalho foi desenvolvido durante a pandemia, logo gostaria de começar agradecendo a todos os profissionais da saúde e da área acadêmica que batalharam contra essa doença e contra a desinformação.

Em segundo lugar gostaria de agradecer a meus pais e a minha irmã. Obrigada pela compreensão e pela paciência que tiveram comigo durante essa jornada de aprendizado e por sempre apoiarem meus estudos.

Também gostaria de agradecer a meu orientador, Werner Treptow, por me acolher em sua equipe e por todos os ensinamentos e indagações que me fizeram refletir e me estimularam a continuar estudando e a ir atrás de respostas. Ter a oportunidade de trabalhar junto com um profissional tão empenhado e que está sempre atrás de desafios é muito empolgante e gratificante.

A meus amigos do LBTC: Camila, Fiorote, João, Leonardo, Letícia, Miguel e Vinícius, obrigado por criarem um ambiente de trabalho acolhedor e descontraído. Um agradecimento especial para o Leonardo que me ensinou muito e sempre estava disponível para responder minhas dúvidas.

Agradeço também meus amigos de longa data. Obrigada pelo apoio e amizade. Seus conselhos foram essenciais e agradeço por sempre arranjam um tempinho para me ajudar. Um agradecimento especial para Juliana que me ajudou muito com a revisão da dissertação.

Por fim, gostaria de agradecer ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Molecular, bem como a Universidade de Brasília e as agências de fomento (CAPES, CNPq, FAPDF), não só pelo apoio financeiro e de infraestrutura, mas pela postura frente a situação extraordinária da pandemia.

# RESUMO

Os anestésicos gerais são uma classe de drogas fundamentais para a medicina, mas apesar de serem utilizados há mais de dois séculos, o mecanismo molecular da anestesia geral permanece desconhecido. A dificuldade de esclarecer essa questão se deve ao fato de eles produzirem efeitos sistêmicos semelhantes, mas não apresentarem uma estrutura molecular parecida.

Uma das teorias que surgiram para explicar esse fenômeno é a perturbação do equilíbrio entre os estados das proteínas devido à ligação do anestésico, em que a probabilidade de ocorrência de cada conformação depende da energia de ligação do anestésico com cada estado. Para investigar essa perturbação do equilíbrio conformacional, o canal dependente de voltagem Kv1.2 foi escolhido por possuir as conformações abertas e fechadas caracterizadas, e por dados de eletrofisiologia mostrarem respostas diferentes ao sevoflurano, que ativa o canal, e ao propofol, que não aparenta alterar sua atividade, oferecendo assim um controle negativo para as análises.

Simulações de *flooding* em altas concentrações, um método computacional em que o canal é equilibrado na presença de um meio saturado com ligantes que interagem com a proteína em múltiplas regiões degeneradas a taxas reversíveis e finitas, foram realizadas para obter a densidade de probabilidade espacial  $\rho(R)$  de sevoflurano e propofol com o canal Kv1.2 nos estados aberto e fechado. As probabilidades de ocupância foram, então, comparadas com curvas obtidas por meio de um *toy model* baseado em um arcabouço teórico. As funções de partição para os estados aberto e fechado foram, então, calculadas a partir dos histogramas do modelo e usadas para estimar a probabilidade de abertura dependente de voltagem  $\rho_o(V)$  do Kv1.2 na presença desses anestésicos.

A metodologia foi capaz de mostrar que o sevoflurano tem maior afinidade pela conformação aberta, enquanto o propofol tem afinidade muito semelhante pelos dois estados. Esse resultado está em concordância com os dados experimentais e favorece a hipótese da interferência direta no equilíbrio conformacional dos canais pelos anestésicos. Por fim, o estudo visou examinar o estado de ligação canal-anestésico usando uma metodologia que fosse capaz de descrevê-lo e que possuísse uma análise simples e eficiente.

# ABSTRACT

General anesthetics are a class of drugs that are fundamental to medicine, but despite their use for over two centuries, the molecular mechanism of general anesthesia remains unknown. The difficulty to clarify this issue is due to the fact that they produce similar systemic effects, but do not have a similar molecular structure.

One of the theories that have emerged to explain this phenomenon is the disturbance of the balance between protein states due to anesthetic binding, where the probability of occurrence of each conformation depends on the anesthetic binding energy with each state. To investigate this disturbance of conformational equilibrium, the voltage-dependent Kv1.2 channel was chosen because its open and close conformations are characterized, and electrophysiology data have shown different responses to sevoflurane, which activates the channel, and propofol, which does not alter its activity, thus offering a negative control for analysis.

Flooding simulations at high concentrations, a computational method where the channel is equilibrated in the presence of an environment saturated with ligands which bind to the protein over multiple degenerate regions at reversibly and finite rates, were performed to obtain the spatial probability density  $\rho(R)$  of sevoflurane and propofol for the Kv1.2 channel in open and close states. The binding probabilities were then compared with curves obtained through a toy model based on the theoretical framework. The partition functions for the open and close states were then calculated from the model histograms and used to estimate the voltage-dependent open probability  $\rho_o(V)$  of Kv1.2 in the presence of these anesthetics.

The simulations were able to show that sevoflurane has a higher affinity for the open conformation whereas propofol has very similar affinity for both states. This result is in agreement with experimental data and favors the hypothesis of direct interference in the conformational equilibrium of channels by anesthetics. Finally, the study aimed to examine the channel-anesthetic binding state using a methodology that was capable of describing it and that had a simple and efficient analysis.

## Sumário

1. Introdução.....	1
1.1 Transporte na membrana.....	1
1.1.1 Membrana celular.....	1
1.1.2 Potencial da membrana.....	4
1.1.3 Canais iônicos.....	7
1.1.3.1 Kv1.2.....	9
1.2 Anestésicos Gerais.....	11
1.2.1 Modulação do Kv1.2.....	15
2. Justificativa e Objetivos.....	19
2.1 Justificativa.....	19
2.2 Objetivos gerais.....	21
2.3 Objetivos específicos.....	21
3. Métodos.....	22
3.1 Metodologia Computacional.....	22
3.1.1 Simulações de dinâmica molecular.....	23
3.1.2 Campo de força.....	23
3.1.3 Integração das equações de movimento.....	25
3.1.4 Interações de longa distância.....	26
3.1.5 Condição periódica de contorno.....	27
3.1.6 Simulações tipo flooding-MD.....	28
3.2 Teoria.....	29
3.2.1 Equilíbrio entre estados.....	29
3.2.2 Constante de Ligação e Probabilidade de Ocupância.....	31
3.2.3 Probabilidade de abertura.....	32
3.3 Protocolos.....	34
3.3.1 Simulações MD.....	34
3.3.2 Sistemas.....	35
3.4 Análises.....	37
3.4.1 Análise de estabilidade e equilíbrio.....	37
3.4.2 Análise das distribuições.....	37
3.4.3 Análise do equilíbrio entre estados.....	38
3.4.4 Análise das propriedades da membrana.....	39
4. Resultados e discussão.....	41
4.1 Propriedades da membrana.....	41

4.2	Estabilidade das simulações .....	45
4.3	Distribuição dos ligantes .....	49
4.4	Impacto no equilíbrio entre estados .....	55
5.	Conclusões e Perspectivas.....	58
6.	Referências Bibliográficas .....	61

## Lista de Figuras

Figura 1 Esquema e fórmula química de uma fosfatidilcolina, um exemplo de fosfolípido presente na membrana. (Figura adaptada de Alberts et al. 2009 <sup>3</sup>). 2

Figura 2 Resumo dos tipos de transporte de solutos pela membrana<sup>4</sup>. Em (A-B) observamos a difusão simples, movimentação da região de maior para de menor concentração, sendo possível apenas para solutos que são permeáveis na membrana. No caso de espécies iônicas (C), o canal iônico é capaz de emular um ambiente favorável para transporte a favor do gradiente eletroquímico do íon. As proteínas também são capazes de transportar íons contra seu gradiente (D-E), mas isso requer gasto de energia para ultrapassar a barreira energética desfavorável. A energia para o transporte pode ser obtida da hidrólise de ATP (D), realizado pelas bombas de sódio e potássio, por exemplo. Outra opção (E) é usar a energia do fluxo de um soluto secundário a favor de seu gradiente para bombear um íon contra seu gradiente..... 2

Figura 3 Exemplo de um neurônio. Os sinais chegam pelos dendritos, passam pelo corpo celular e seguem pelo axônio até a região terminal da célula que envia o sinal para as células próximas. (Figura adaptada de Alberts et al. 2009 <sup>3</sup>). .... 5

Figura 4 Exemplificação de um potencial de ação. Quando um estímulo consegue ativar uma quantidade suficiente de canais Nav para ultrapassar o limiar de ativação do potencial de ação, a membrana é despolarizada e o potencial cresce em direção ao potencial de equilíbrio do sódio. Após um tempo, os canais Nav são inativados e os Kv de cinética lenta são abertos, resultando no decaimento do potencial da membrana que agora tende para o potencial de equilíbrio do potássio. Por fim, os canais Kv também são inativados e o potencial da membrana volta para o repouso. (Gráfico adaptado de DOI: <http://doi.org/10.24927/rce2015.253>) ..... 6

Figura 5 Representação do canal Kv1.2. (A) Visão superior da estrutura tetramérica do canal. Domínio do poro em laranja e domínio VSD em azul, com hélice S4 evidenciada em amarelo. (B) Visão lateral da estrutura completa de um cristal de Kv1.2 incluindo o domínio T1 (ciano). (C) Monômero do Kv1.2 mostrando hélices S1-S4 do VSD, linker (LK) que une S4-S5, e hélice do poro (PH) com o filtro de seletividade (SF)..... 10

Figura 6 Sensibilidade a voltagem de um canal de potássio dependente de voltagem. (A) Topologia de uma subunidade do Kv1.2. Resíduos envolvidos na sensibilidade à voltagem estão evidenciados na estrutura em branco, bem como os resíduos que fazem parte do centro catalítico (em vermelho). (B) Em potenciais elétricos internos negativos, o canal se encontra preferencialmente no repouso e com o poro fechado ( $p_o$  do canal é muito baixa). Já no caso de potenciais elétricos internos positivos, a hélice S4 se move para cima e tensiona o linker S4-S5 (rosa) que abre a parte inferior do poro, permitindo a hidratação da região e subsequente abertura total do poro ( $p_o$  do canal aumenta)..... 11

Figura 7 Correlação de Meyer-Overton para anestésicos inalatórios. Quanto maior a lipossolubilidade do composto em óleo, maior é sua potência anestésica. A potência é referente a dose necessária para indução da anestesia e a lipossolubilidade está relacionada ao coeficiente de partição em óleo do anestésico. O gráfico mostra que o halotano é um dos anestésicos inalatórios mais potentes, e de fato ele é muito utilizado. (Figura retirada de DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-020-64436-z>)..... 13

Figura 8 A modulação do canal Kv1.2 é evidenciada nas curvas da relação G-V, que mostram o aumento do fluxo de íons em função da mudança de voltagem. (A) Gráficos adaptados de Liang et al. 2015<sup>33</sup> que mostram aumento de  $G_{máx}$  do canal selvagem Kv1.2 (WT) e deslocamento negativo da curva na presença de 1mM de sevoflurano. Esses efeitos são amplificados nos mutantes Kv1.2 FRAKT e Kv1.2 G329T. (B) Gráficos adaptados de Bu et al. 2018<sup>48</sup> mostram que na presença de 30 $\mu$ M de propofol não há alteração na relação G-V do canal selvagem, mas o mutante KV1.2 G329T já demonstra sensibilidade à mesma quantidade do anestésico. .... 17

Figura 9 Curvas de probabilidade de abertura do Kv1.2 adaptado de Stock et al. 2018<sup>69</sup>.  $p_o(V)$  do canal para diferentes valores de voltagem. A curva preta mostra

o controle experimental, sem ligante, que só é afetado pela voltagem. Em azul temos a referência experimental para 1mM de sevoflurano <sup>33</sup> , enquanto as demais curvas correspondem às $\rho_o(V)$ estimadas para as concentrações de 1mM(vermelho), 10mM(verde) e 100mM(amarelo) usando modelo in silico. (B) Análise de decomposição por sítio para a concentração de 100mM. ....	18
Figura 10 Exemplificação da condição periódica de contorno. A caixa principal, destacada no centro da figura, está rodeada por réplicas no plano tridimensional. No exemplo, quando o átomo em vermelho atravessa o limite da caixa principal e entra na réplica superior, o átomo equivalente à sua imagem na réplica inferior, extremidade oposta, aparece no sistema principal .....	28
Figura 11 Ciclo termodinâmico entre dois estados, $X = \{\text{aberto} - A, \text{fechado} - F\}$ , na presença de ligantes. Em que $O_x(0_n)$ representa o receptor vazio com todos os ligantes L no banho, e $O_x(n)$ é um estado de ocupância com n ligantes interagindo com a interface proteica. A transição entre estados é mediada pela constante de equilíbrio K.....	31
Figura 12 Interação de ligantes com interface proteica mediada pela constante de ligação $K_x(n)$ .....	32
Figura 13 Área da membrana. (A) Área total da membrana (em cinza) dos sistemas com proteína. Os lipídios próximos à proteína possuem um potencial diferente dos demais por conta da interação direta com o canal. Portanto, para calcular as propriedades dessa membrana com mais acuracidade, ela é dividida em duas regiões: (B) interface membrana-proteína (em amarelo) e região afastada da proteína (em marrom).....	40
Figura 14 Particionamento de ligantes na membrana. As 3 etapas mostram o sistema inicial, metade do tempo de simulação e equilíbrio (sevoflurano em azul, solução aquosa na representação QuickSurf e membrana oculta para melhor visualização).....	41
Figura 15 Parâmetro de ordem ( $-S_{CH}$ ) por carbono da cadeia insaturada (esquerda) e saturada (direita). (A) Parâmetro retirado das simulações sem canal. Para os demais sistemas, os valores foram registrados considerando duas regiões: afastada (B) e perto do canal (C). Os gráficos apresentam os sistemas com as duas conformações do Kv1.2 sem ligante (em preto) como referência,	



bem como os respectivos flooding com sevoflurano a 50mM (em laranja) e 150mM (em vermelho), e propofol a 50mM (em azul).....	45
Figura 16 Perfil de RMSD. Os cálculos foram feitos para a cadeia principal dos canais das simulações de fld-MD com sevoflurano (SEV), e propofol (PFL) ao longo da trajetória, para os estados aberto e fechado. ....	46
Figura 17 Estado dos domínios VSDs dos canais nas simulações tipo flooding. A distância entre a arginina R1 da hélice S4 e a fenilalanina da hélice S2 foram calculadas para os 4 VSDs do Kv1.2. Para os canais abertos, a média de distância foi de 22 Å, enquanto para o fechado foi de 10 Å. A estrutura média de um VSD no estado ativado e no estado desativado estão exemplificadas em (C). ....	47
Figura 18 Perfil de hidratação médio ( $z$ ) no eixo Z do poro do canal. No canal aberto (A), foi observado um entupimento do poro pelos anestésicos (evidenciado em vermelho), principalmente o propofol que tem uma tendência maior de se agregar. Já no canal fechado (B), o poro hidrofóbico se manteve fechado, impedindo a entrada de água e anestésicos na cavidade. As simulações sem anestésicos foram usadas como controle. (C) Exemplificação da cavidade do poro (em preto) aberta e fechada. Moléculas de água estão representadas em forma de densidade (em vermelho) e os aminoácidos que tampam a cavidade estão evidenciados em laranja. ....	48
Figura 19 Particionamento de ligantes na membrana dos sistemas sem canal. (A) Fração de ligantes na membrana ao longo do tempo. (B) Média de ligantes ( $z$ ) no eixo Z. ....	49
Figura 20 Distribuição dos anestésicos no sistema. Fração de sevoflurano (SEV) e propofol (PFL) na solução aquosa (azul), membrana (vermelho) e próximo à proteína (preto) ao longo da trajetória. ....	50
Figura 21 Distância de interação com a proteína. Densidade de ligantes em função do raio de distância ( $r$ ) da proteína. A linha tracejada aponta o $r^* = 5\text{Å}$ onde há um pico de densidade, demarcando a distância em que a ligação dos ligantes com a proteína é mais favorável. ....	51
Figura 22 Distribuição dos ligantes no reservatório. Gráficos à esquerda mostram a média de ligantes no eixo Z e a densidade de ligantes $\rho$ na membrana no	

equilíbrio. Em cinza foram traçados os limites do reservatório (região na membrana mais energeticamente favorável para os ligantes). Gráficos à direita apresentam o número de ligantes ao longo do tempo, bem como o número médio de ligantes  $n$  no equilíbrio (linha preta tracejada demarca o começo do equilíbrio na simulação). ..... 52

Figura 23 Mapa de densidade na interface proteica. (A) O centro geométrico dos ligantes próximo à proteína é mapeado a cada quadro da trajetória. (B) Essa informação é usada para gerar um mapa de densidade na interface proteica que delimita o volume do sítio proteico. .... 53

Figura 24 Mapeamento dos anestésicos no sítio proteico para os sistemas com 150mM e 50mM de sevoflurano e com 50mM de propofol. (A) Estrutura média da proteína e densidades tridimensionais obtidas no equilíbrio (laranja e ciano – sistema com canal aberto, vermelho e azul – sistema com canal fechado). .... 54

Figura 25 Probabilidade de ocupância do sítio proteico  $\rho(n)$ . As curvas preenchidas correspondem às  $\rho(n)$  calculadas diretamente das simulações de flooding (laranja e ciano – canal aberto, vermelho e azul – canal fechado). Já as curvas tracejadas equivalem às  $\rho(n)$  calculadas usando as equações do modelo teórico de forma a sobrepôr o máximo possível os gráficos do flooding. .... 56

Figura 26 Curvas de probabilidade de abertura dependente de voltagem  $\rho_o(V)$  do canal Kv1.2. Probabilidade de abertura do canal para controle experimental sem ligante (em preto), referência experimental com 1mM de sevoflurano (em cinza)<sup>33</sup>, referências in silico de docking e FEP para 10mM (em rosa) e 100mM (em roxo) de sevoflurano<sup>69</sup>. Por fim, as curvas obtidas usando os dados do flooding com 150mM (em vermelho) e 50mM (em laranja) de sevoflurano e 50mM de propofol (em azul) que apresentaram um deslocamento de -91.4mV, -28.4mV e +3.94mV, respectivamente. .... 57

## Lista de Tabelas

Tabela 1 Concentrações iônicas de uma célula de mamíferos<sup>3</sup> e respectivos potenciais de equilíbrio/repouso estimados pela equação de Nernst ( $T=300K$ ,  $R=8.314 J.K^{-1}.mol^{-1}$  e  $F= 96485 C.mol^{-1}$ ). ..... 4

Tabela 2 Características e propriedades dos anestésicos gerais: sevoflurano e propofol. ....	15
Tabela 3 Característica dos sistemas sem ligantes. ....	35
Tabela 4 Características dos sistemas ligante-membrana.....	36
Tabela 5 Características dos sistemas ligante-canal. ....	36
Tabela 6 Valores da área por lipídio ( $A_L$ ) em $\text{\AA}^2$ . Análise foi separada em duas regiões: 'afastado' contemplando todos os lipídios a mais de 5 angstroms da proteína; e 'perto' para os lipídios dentro de um raio de 5 angstroms da proteína. ....	42
Tabela 7 Características da distribuição de ligantes na membrana. Número total de ligantes nos sistemas e número médio $n$ no equilíbrio, volume médio da membrana e densidade média de ligantes no volume da membrana no equilíbrio. ....	53
Tabela 8 Características da distribuição de ligantes na interface proteica. Número total de ligantes nos sistemas e número médio $n$ no equilíbrio, volume médio do sítio proteico e densidade média de ligantes no volume da interface no equilíbrio.....	54
Tabela 9 Valores relativos usados no toy model para calcular a constante de ligação.....	55
Tabela 10 Deslocamento da $V_{1/2}$ do Kv1.2 na presença de anestésicos.....	58

## Lista de Abreviações

**POPC:** 1-palmitoil-2-oleoil-sn-glicero-3-fosfatidilcolina

**Kv:** canal de potássio dependente de voltagem

**VSD:** domínio sensor de voltagem

**SNC:** sistema nervoso central

**PA:** potencial de ação

**FEP:** *free energy perturbation*

**MD:** dinâmica molecular | **FLD:** *flooding*

**SEV:** sevoflurano | **PFL:** propofol



# 1. Introdução

O sistema nervoso é uma das maquinarias mais complexas da biologia. Sua unidade fundamental de organização são as células neuronais que formam uma rede que transmite sinais gerados a partir da percepção de estímulos físico-químicos que, posteriormente, serão processados e interpretados no cérebro.

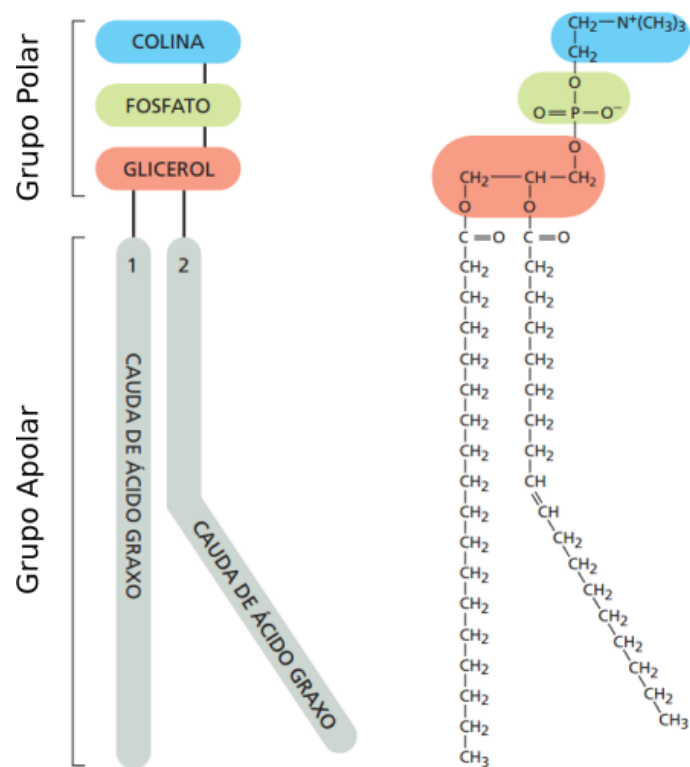
O que garante a fidelidade da propagação do sinal por todo o trajeto, desde a posição inicial do estímulo, até a região onde ele será interpretado, é o transporte de íons mediado por canais iônicos, assim como as características elétricas da membrana celular e a fisionomia diferenciada dos neurônios. Dessa forma, qualquer interferência em um desses aspectos pode alterar ou comprometer o funcionamento normal do sistema nervoso central (SNC). Nos casos mais sérios observamos degenerações que causam doenças, como Parkinson<sup>1</sup>. Já alterações mais brandas podem induzir estados transitórios de, por exemplo, anestesia<sup>2</sup>.

## 1.1 Transporte na membrana

### 1.1.1 Membrana celular

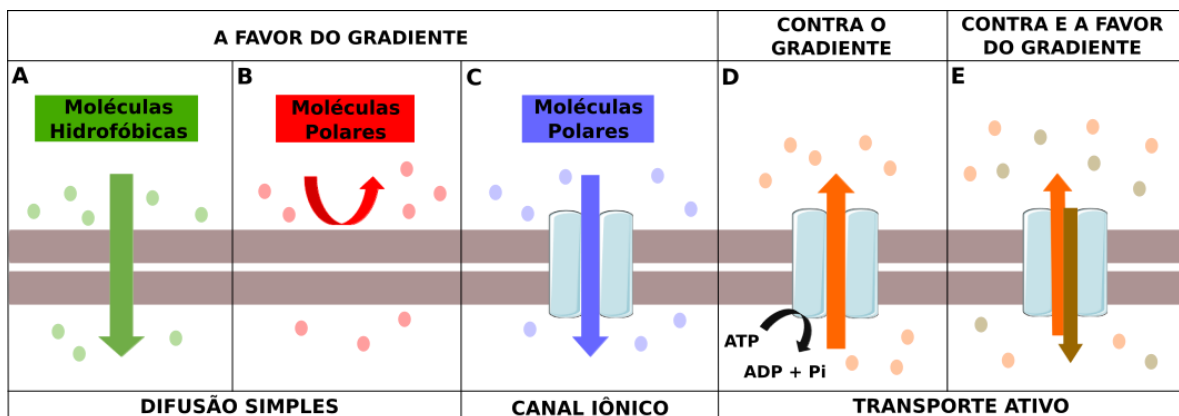
A membrana celular é uma estrutura de bicamada que tem como função básica definir os limites espaciais da célula e manter as diferenças entre o conteúdo extracelular e do citosol. Esse papel de barreira seletiva ocorre graças à sua composição. Nos eucariotos, a composição das monocamadas é assimétrica, mas ambas são formadas, basicamente, de esteróis (conferem rigidez), glicolipídios, proteínas transmembrânicas ou periféricas, e o componente mais abundante são os fosfolipídios.

Como os fosfolipídios possuem caráter anfipático (grupo polar fosfato e cauda apolar de hidrocarbonos) e têm forma cilíndrica, eles acabam formando bicamadas espontaneamente em ambientes aquosos e, para reduzir ao máximo a energia livre nesse tipo de solução, essa estrutura forma um compartimento esférico fechado para evitar que os lipídios das bordas entrem em contato com a água. A interação entre os componentes da membrana é dada, principalmente, por forças não covalentes e eles formam uma estrutura dinâmica que varia de fluidez dependendo da composição dos lipídios<sup>3</sup>.



**Figura 1** Esquema e fórmula química de uma fosfatidilcolina, um exemplo de fosfolípido presente na membrana. (Figura adaptada de Alberts et al. 2009<sup>3</sup>).

A taxa de difusão de um soluto através da membrana varia, principalmente, de acordo com a solubilidade relativa em lipídios da molécula. O caráter lipofílico da membrana favorece o transporte de compostos hidrofóbicos por difusão simples. No caso de íons e moléculas carregadas, a barreira energética é tão alta para difusão que elas são consideradas impermeáveis (Figura 2).



**Figura 2** Resumo dos tipos de transporte de solutos pela membrana<sup>4</sup>. Em (A-B) observamos a difusão simples, movimentação da região de maior para de menor concentração, sendo possível apenas para solutos que são permeáveis na membrana. No caso de espécies iônicas (C), o canal iônico é capaz de emular um ambiente favorável para transporte a favor do gradiente eletroquímico do íon. As proteínas também são capazes de transportar íons contra seu gradiente (D-E), mas isso requer gasto de energia para ultrapassar a barreira energética desfavorável. A energia para o transporte pode

ser obtida da hidrólise de ATP (D), realizado pelas bombas de sódio e potássio, por exemplo. Outra opção (E) é usar a energia do fluxo de um soluto secundário a favor de seu gradiente para bombear um íon contra seu gradiente.

O transporte de um espécime do compartimento A para o compartimento B possui um potencial químico associado (energia livre associada a diferença de concentração entre os compartimentos), dado por:

$$\Delta\bar{G}_{A\rightarrow B} = RT \ln \frac{[X_B]}{[X_A]} \quad 1.1$$

onde,  $R$  é a constante dos gases ( $\sim 1.98 \text{ cal.mol}^{-1}.\text{K}^{-1}$ ),  $T$  é a temperatura do sistema (em Kelvin),  $[X_B]$  e  $[X_A]$  são as concentrações do íon X nos compartimentos B e A, respectivamente.

No caso de espécies carregadas, a diferença da concentração de moléculas entre os compartimentos também implica uma diferença líquida de cargas e, conseqüentemente, diferença de potencial elétrico. E, nesse caso, o transporte de íons entre compartimentos também requer trabalho elétrico  $W_{A\rightarrow B}$  dado pela equação:

$$W_{A\rightarrow B} = zF(V_B - V_A) \quad 1.2$$

em que,  $z$  é a valência do íon X,  $F$  é a constante de Faraday ( $2,3 \times 10^4 \text{ cal. V}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1}$ ), e  $\Delta V$  é a diferença de voltagem entre os compartimentos (em Volts).

Por fim, o potencial eletroquímico ( $\Delta\bar{G}^{eq}$ ) é o resultado da influência dos componentes elétrico e químico no transporte de espécies iônicas. Essa energia eletroquímica é armazenada e usada pela membrana para produzir e transmitir sinais elétricos nas células nervosas e musculares, transportar moléculas através das proteínas acopladas e produzir ATP. Ela é descrita como:

$$\Delta\bar{G}^{eq} = \Delta\bar{G}_{A\rightarrow B} + W_{A\rightarrow B} \quad 1.3$$

$$\Delta\bar{G}^{eq} = RT \ln \frac{[X_B]}{[X_A]} + zF(V_B - V_A) \quad 1.4$$

O potencial eletroquímico dita a espontaneidade do transporte: quando  $\Delta\bar{G}_{A\rightarrow B}^{eq} < 0$ , o transporte é espontâneo no sentido  $A \rightarrow B$ , e o contrário é verdade para  $\Delta\bar{G}_{A\rightarrow B}^{eq} > 0$ . O equilíbrio entre os compartimentos ocorre quando o potencial eletroquímico é igual a zero.

### 1.1.2 Potencial da membrana

Como explicado anteriormente, devido à impermeabilidade da membrana, existe uma diferença de cargas elétricas entre a bicamada, e como essa tem uma espessura fina (~5nm), os íons das duas camadas acabam interagindo por campos eletrostáticos, criando um potencial de membrana. Esse potencial está relacionado com as duas componentes do potencial eletroquímico e, quando a força elétrica motriz do íon contrabalança seu gradiente de concentração, temos um evento em que não há fluxo líquido de um determinado íon entre compartimentos, chamado de potencial de equilíbrio ou reverso, calculado pela equação de Nernst<sup>3</sup>:

$$V_{ion} = \frac{RT}{zF} \ln \left( \frac{[C_{extra}]}{[C_{intra}]} \right) \quad 1.5$$

onde  $V_{ion}$  é o potencial de equilíbrio (Volts) de um íon,  $z$  é a carga desse íon,  $F$  é a constante de Faraday,  $T$  é a temperatura (Kelvin),  $R$  é a constante dos gases e a razão representa a diferença de concentração do íon dentro  $[C_{intra}]$  e fora da célula  $[C_{extra}]$ .

Dependendo da quantidade de proteínas com função de transporte acopladas na membrana, a permeabilidade da membrana a íons pode variar, e o potencial de membrana tende para o potencial de equilíbrio do íon mais permeável (nos neurônios esse íon é o  $K^+$ ). No caso de permeabilidade a mais de uma espécie iônica, o potencial de equilíbrio é calculado pela equação Gold-Hodgkin-Katz (GHK):

$$V_m = \frac{RT}{F} \ln \left( \frac{\sum_{cat}^N P_{Cat} [Cat]_{extra} + \sum_{an}^M P_{An} [An]_{intra}}{\sum_{cat}^N P_{Cat} [Cat]_{intra} + \sum_{an}^M P_{An} [An]_{extra}} \right) \quad 1.6$$

nessa equação a permeabilidade ( $P_{cat}$  e  $P_{an}$ ) de todas as espécies  $N$  de cátions (Cat) e  $M$  de ânions (An) é levada em conta.

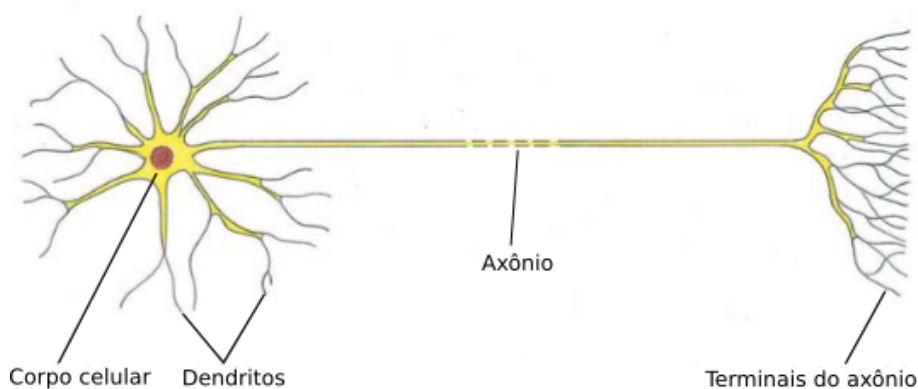
**Tabela 1** Concentrações iônicas de uma célula de mamíferos<sup>3</sup> e respectivos potenciais de equilíbrio/repouso estimados pela equação de Nernst ( $T=300K$ ,  $R=8.314 J.K^{-1}.mol^{-1}$  e  $F= 96485 C.mol^{-1}$ ).

Íon	$[C_{intra}]$	$[C_{extra}]$	$V_{ion}$
$K^+$	140 mM	5 mM	-85 mV
$Na^+$	5-15 mM	145 mM	+70 mV
$Cl^-$	5-15 mM	110 mM	-65 mV

O potencial de membrana é gerado com uma mudança pequena de cargas, de forma que não ocorrem grandes alterações na concentração após o deslocamento de



íons. Além disso, o transporte de cargas é rápido, na casa dos milissegundos<sup>5</sup>. Essa propriedade é explorada pelos neurônios que, com sua fisionomia de tubo alongado, remetem a cabos eletrônicos vazados, onde a membrana age como capacitor e os canais iônicos agem como condutores elétricos.



**Figura 3 Exemplo de um neurônio.** Os sinais chegam pelos dendritos, passam pelo corpo celular e seguem pelo axônio até a região terminal da célula que envia o sinal para as células próximas. (Figura adaptada de Alberts *et al.* 2009<sup>3</sup>).

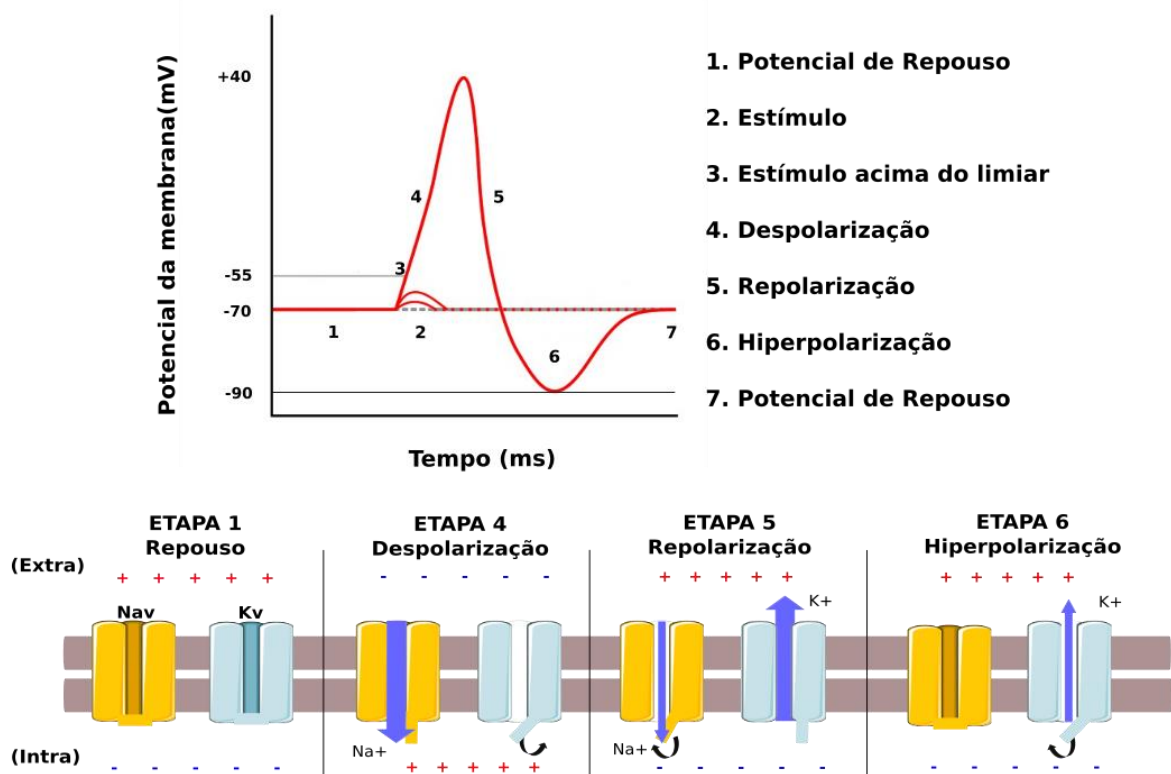
Quando um neurônio recebe um estímulo nos dendritos, ele é capaz de transmitir um sinal elétrico por seu axônio até os ramos terminais (Figura 3), onde esse sinal será convertido em sinal químico. Devido à distância a ser percorrida, o sinal tem que ser amplificado ao longo da trajetória e manter-se unidirecional. Esse trajeto é assegurado pelo potencial de ação (PA), um evento unitário de caráter tudo ou nada.

O PA é originado no segmento inicial do axônio que possui uma alta densidade de canais de  $\text{Na}^+$ <sup>6</sup>, mas para que o fenômeno comece é preciso que um estímulo ultrapasse o limiar de ativação do potencial de ação ( $\sim -55\text{mV}$ ), senão o sinal é perdido (Figura 4, etapa 2). Quando o limiar é ultrapassado (Figura 4, etapa 3), os canais de sódio dependentes de voltagem ( $\text{Nav}$ ) de ação rápida são abertos e o influxo de sódio leva à despolarização da membrana, assim, o potencial da membrana aumenta até atingir o potencial de repouso do sódio (Figura 4, etapa 4).

Durante a despolarização os canais de  $\text{K}^+$  dependentes de voltagem ( $\text{Kv}$ ) também são ativados, porém eles têm uma cinética de abertura lenta comparada aos de sódio. Por consequência, quando os  $\text{Kv}$ s começam a se abrir, os canais  $\text{Nav}$  já estão na sua fase de inativação, resultando no período de repolarização (Figura 4, etapa 5), em que o influxo de  $\text{Na}^+$  diminui consideravelmente e o efluxo de  $\text{K}^+$  se torna abundante. Por fim, com a atuação dos canais  $\text{Kv}$  e de vazamento de  $\text{K}^+$  ocorre a

hiperpolarização da membrana, em que o potencial tende ao potencial de equilíbrio do  $K^+$  (Figura 4, etapa 6), até que os canais  $Kv$  se fecham e o potencial de repouso da membrana é reestabelecido (Figura 4, etapa 7).

A propagação do PA se deve ao fluxo de corrente axial que despolariza regiões do axônio enquanto as regiões anteriores entram em um período de refração, onde os canais  $Nav$  estão inativados e, por isso, não é possível disparar outro potencial de ação. A amplificação dos PAs ocorre nos nódulos de Ranvier, região com altas densidades de canais  $Nav$  e com limiar de PA reduzido<sup>6</sup>. Além disso, o axônio conta com a mielinização, revestimento que serve como isolante elétrico, que aumenta a resistência da membrana e diminui capacitância do axônio, aumentando, assim, a velocidade de condução do PA no axônio<sup>4</sup>.



**Figura 4 Exemplificação de um potencial de ação.** Quando um estímulo consegue ativar uma quantidade suficiente de canais  $Nav$  para ultrapassar o limiar de ativação do potencial de ação, a membrana é despolarizada e o potencial cresce em direção ao potencial de equilíbrio do sódio. Após um tempo, os canais  $Nav$  são inativados e os  $Kv$  de cinética lenta são abertos, resultando no decaimento do potencial da membrana que agora tende para o potencial de equilíbrio do potássio. Por fim, os canais  $Kv$  também são inativados e o potencial da membrana volta para o repouso. (Gráfico adaptado de DOI: <http://doi.org/10.24927/rce2015.253>)

### 1.1.3 Canais iônicos

Os canais iônicos, anteriormente citados, são proteínas transmembrânicas que permitem a travessia de íons sem que eles entrem em contato com o interior hidrofóbico da membrana. Diferente de proteínas transportadoras, os canais possuem um poro aquoso que possibilita o fluxo passivo de íons a favor de seu gradiente eletroquímico, e que é capaz de selecionar a passagem de uma espécie iônica por tamanho e carga por intermédio do filtro de seletividade. A passagem de um íon de potássio por um canal seletivo a  $K^+$ , por exemplo, é possível devido as carbonilas presentes no filtro que interagem com o potássio compensando a perda de interações com a água que o íon sofre ao entrar na região do poro. Os oxigênios desse grupo são espaçados de forma a acomodar o potássio, enquanto outros tipos iônicos não são capazes de se posicionar nessa região<sup>7</sup>.

Outra mecânica dos canais iônicos é a transição, em taxas variadas, entre diferentes estados (condutor↔não condutor). A abertura do canal é mediada pelo mecanismo de controle do poro, conhecido como *gating*, que está sujeito à influência de outros domínios proteicos modulados por fatores externos como pH<sup>8</sup>, voltagem<sup>9</sup>, temperatura<sup>10</sup> e tensão na membrana<sup>11</sup>. Essa modulação, por sua vez, acarreta mudanças na probabilidade de abertura do canal ( $\rho_o$ ). Quanto maior o  $\rho_o$ , maior o número de canais na conformação aberta, e, conseqüentemente, maior a condutância iônica ( $G$ ) macroscópica de uma dada população de canais do mesmo tipo. Essa relação é descrita a seguir:

$$G_x = N \cdot \rho_o \cdot \gamma \quad 1.7$$

em que,  $G_x$  é a condutância iônica de x, N é o número total de canais presentes, e  $\gamma$  é a corrente unitária.

Dentre as diversas classes de canais presentes na célula, a subfamília dos canais dependentes de voltagem é uma das mais estudadas, levando em conta sua importância na propagação de um PA pela célula. Nessa subfamília, os canais são classificados conforme o íon seletivo: Cav (seletivos a cálcio) Nav (seletivos a sódio), Kv (seletivos a potássio) e HCN (seletivos a cátions). Além disso, para esses canais, a permeação de íons é dependente da voltagem da membrana, logo, a equação 1.7 pode ser reescrita em função da diferença de voltagem V.

$$G(V) = N \cdot \rho_o(V) \cdot \gamma \quad 1.8$$

Por outro lado, a condutância máxima do canal ( $G_{\text{máx}}$ ) é independente de voltagem e é obtida quando a probabilidade de abertura do canal é máxima.

A estrutura básica de um canal dependente de voltagem de  $K^+$  é de um tetrâmero com 6 alfa hélices (S1-S6). As hélices S1-S3 formam um interior hidrofílico para comportar a região carregada da hélice S4, uma hélice flexível e sensível a voltagem, carregada de argininas e lisinas. Essa hélice se liga à hélice S5 por intermédio de uma hélice menor chamada de *linker*. Por fim, a hélice S5, juntamente com a S6 formam um poro hidrofílico para a passagem de íons (Figura 5).

Em relação ao mecanismo de sensibilidade à voltagem, experimentos de *patch clamp*<sup>12</sup> foram essenciais para detectar movimentação de cargas que explicassem mudanças na conformação do canal em resposta a mudanças no campo elétrico. A precisão dessa técnica permite medir, praticamente, o equivalente à função individual de um canal, e consiste no uso de uma pipeta para aderir uma parte da membrana e, ao se manter um potencial constante, o aparato consegue calcular a corrente iônica de um canal<sup>13</sup>. Usando esse método foram constatadas pequenas correntes durante uma despolarização que não correspondiam a uma corrente iônica, e sim, à reorientação de aminoácidos carregados de um canal iônico<sup>14</sup>. Essas correntes foram chamadas de *gating currents*, e a partir da integração dessa variável pelo tempo encontra-se a quantidade total de cargas que se movimentaram, *gating charges* ( $\Delta Q$ ), na presença de um campo elétrico.

As *gating charges* foram previstas por Hodgkin e Huxley e foram detectadas pela primeira vez em 1973, por Armstrong *et al.*<sup>14</sup>. Os estudos subsequentes<sup>15-17</sup> mostram que o segmento S4 é o principal responsável pelas *gating currents* e, conseqüentemente, sua movimentação está atrelada à probabilidade de abertura do canal. Por conseguinte, algumas teorias se propuseram a explicar a transferência de cargas pelo campo elétrico e estão descritas brevemente abaixo:

- I. Deslizamento da hélice (*helical-screw model*)<sup>18</sup> : os resíduos carregados da S4 formam pares de íons com os resíduos ácidos nos segmentos S2 e S3 vizinhos. Após a ativação, somente a hélice S4 se movimenta cerca de 10-15 Å (no sentido perpendicular à membrana) de forma similar a um pistão e cruza um campo elétrico focalizado e imóvel, enquanto rotaciona ~180 ° para a esquerda;

- II. Transportador (*transporter model*)<sup>19</sup> : hidratação da S4 focaliza o campo elétrico no domínio sensor voltagem (VSD) e a ativação envolve remodelamento desse campo ao invés de grandes deslocamentos da S4;
- III. Remo sensor-voltagem (*voltage-sensor paddle model*)<sup>20</sup> : Região C-terminal da S3 e segmento S4 formam um “remo” que, após a despolarização, percorre uma grande distância, cerca de 20 Å pela membrana, até a região externa.

Com o acúmulo de experimentos e evidências, os modelos *paddle* e *transporter* perderam forças, mas suas principais propostas continuam relevantes para o consenso geral que tem o modelo *helical-screw* como base. A movimentação sugerida é que após a hidratação do VSD, o campo elétrico é concentrado na constrição hidrofóbica dessa região e a S4 se movimenta cerca de 10 a 15 Å na direção transmembrânica, impulsionada pela formação de pontes salinas com os resíduos negativos vizinhos<sup>21</sup>.

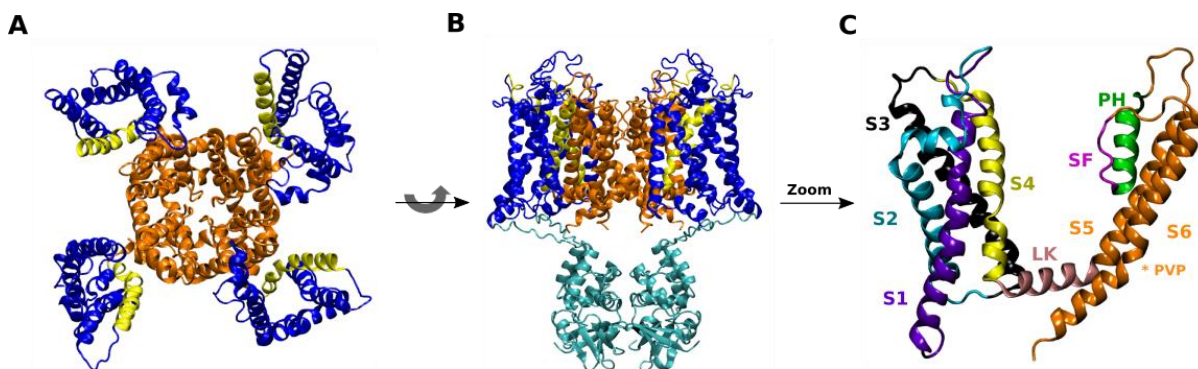
### 1.1.3.1 Kv1.2

O membro da subfamília de canais de potássio dependente de voltagem Kv1.2 é um canal presente em mamíferos, e em humanos é codificada pelo gene *KCNA2*. Está presente em maior abundância nos axônios de neurônios do neocórtex, hipocampo e bulbo olfatório<sup>22</sup> atuando, principalmente, na etapa de repolarização do potencial de ação. A expressão disfuncional do canal Kv1.2 é associado a neuropatologias em humanos, como epilepsia<sup>23</sup> e distúrbio de dor<sup>24</sup>. Além disso, estudos mostraram letalidade em camundongos com nocaute desse canal<sup>25</sup>.

Os detalhes estruturais do Kv1.2 foram evidenciados a partir de sua estrutura cristalográfica<sup>26</sup>. Ele compartilha a estrutura geral dos canais de sua família, e pode ser separado por três domínios: domínio do poro (contempla S5-S6 e filtro de seletividade), domínio sensível à voltagem (contempla S1-S4, chamado de VSD) e domínio de tetramerização citoplasmático (T1) (Figura 5).

O filtro de seletividade dos Kv possui uma sequência altamente conservada, TVGYG<sup>27</sup>, com permeabilidade praticamente exclusiva aos íons K<sup>+</sup>. O canal também conta com a região conservada PVP na hélice S6, exclusiva dos Kv eucarióticos<sup>28</sup> e que está envolvida com o *gate*<sup>17,29</sup> do canal. As hélices do VSD se dispõem em

formato de ampulheta com os resíduos carregados voltados para o interior da estrutura, sendo que a fenilalanina F<sup>233</sup> atua como bloqueador hidrofóbico, evitando que a região interna do VSD também funcione como região condutora de íons e água<sup>30</sup>. Ademais, a função do domínio T1 ainda não está completamente elucidada, mas sua remoção parece não acarretar prejuízos no funcionamento do canal<sup>31-33</sup>.

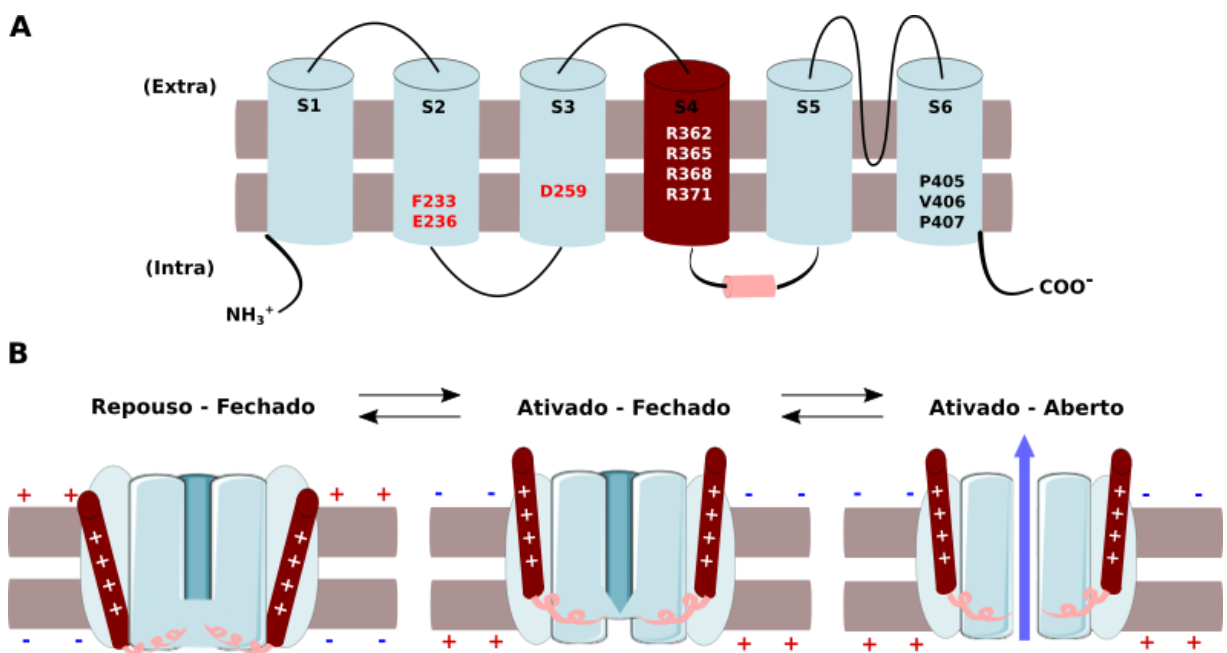


**Figura 5 Representação do canal Kv1.2.** (A) Visão superior da estrutura tetramérica do canal. Domínio do poro em laranja e domínio VSD em azul, com hélice S4 evidenciada em amarelo. (B) Visão lateral da estrutura completa de um cristal de Kv1.2 incluindo o domínio T1 (ciano). (C) Monômero do Kv1.2 mostrando hélices S1-S4 do VSD, linker (LK) que une S4-S5, e hélice do poro (PH) com o filtro de seletividade (SF).

A estrutura cristalográfica citada corresponde ao canal no estado aberto, e na busca de uma estrutura que representasse o estado fechado, vários estudos *in silico* surgiram propondo sua caracterização<sup>17,34,35</sup>. A partir do refinamento das estruturas obtidas computacionalmente e de uma simulação de longa duração na presença de potencial negativo<sup>32</sup> constatou-se múltiplos estados de repouso, e uma conformação fechada que satisfazia dados experimentais<sup>36</sup>.

Assim foi definido que, na presença de um campo elétrico focalizado, as cargas positivas da S4 (principalmente as primeiras 4 argininas, R1-R4) ficam em posições favoráveis ao pareamento com os resíduos negativos presentes no VSD ou com o grupo fosfato dos lipídios e o rearranjo das pontes salinas entre esses resíduos movimenta a hélice. Os resíduos F<sup>233</sup> (S2), E<sup>236</sup> (S2) e D<sup>259</sup> (S3) atuam como centro de transferência de cargas catalisando a transferência de cada resíduo da S4 pelo campo à medida que eles passam por essa região<sup>34</sup>. O movimento é constatado pela interação do resíduo R1 com o F<sup>233</sup> no estado fechado e interação do resíduo R5 com o F<sup>233</sup> no estado aberto<sup>35,37</sup>.

O mecanismo de ativação pode ser explicado pela hélice *linker* S4S5, que conecta o segmento S4 ao S5, mas que também está acoplada, eletromecanicamente, com a região C-terminal do segmento S6<sup>38,39</sup>, assim, a força elétrica associada à ascensão da S4 causada por um campo elétrico é convertida em força mecânica, via tensão do *linker*, que acaba movimentando a S6 e desobstruindo o poro. Cerca de 14 cargas elementares ( $\Delta Q = 14e^-$ ) devem se movimentar para mudar o estado do Kv1.2 de fechado para aberto<sup>17,35</sup>, ou seja, para o canal entrar no estado aberto todas as 4 subunidades de VSD têm que estar ativadas<sup>35</sup>.



**Figura 6 Sensibilidade a voltagem de um canal de potássio dependente de voltagem.** (A) Topologia de uma subunidade do Kv1.2. Resíduos envolvidos na sensibilidade à voltagem estão evidenciados na estrutura em branco, bem como os resíduos que fazem parte do centro catalítico (em vermelho). (B) Em potenciais elétricos internos negativos, o canal se encontra preferencialmente no repouso e com o poro fechado ( $\rho_o$  do canal é muito baixa). Já no caso de potenciais elétricos internos positivos, a hélice S4 se move para cima e tensiona o linker S4-S5 (rosa) que abre a parte inferior do poro, permitindo a hidratação da região e subsequente abertura total do poro ( $\rho_o$  do canal aumenta).

## 1.2 Anestésicos Gerais

A anestesia geral é um estado associado à perda da consciência, amnésia, analgesia e imobilidade. Esse estado ainda pode ser revertido com facilidade, o que o tornou extremamente cobiçado em procedimentos médicos, principalmente

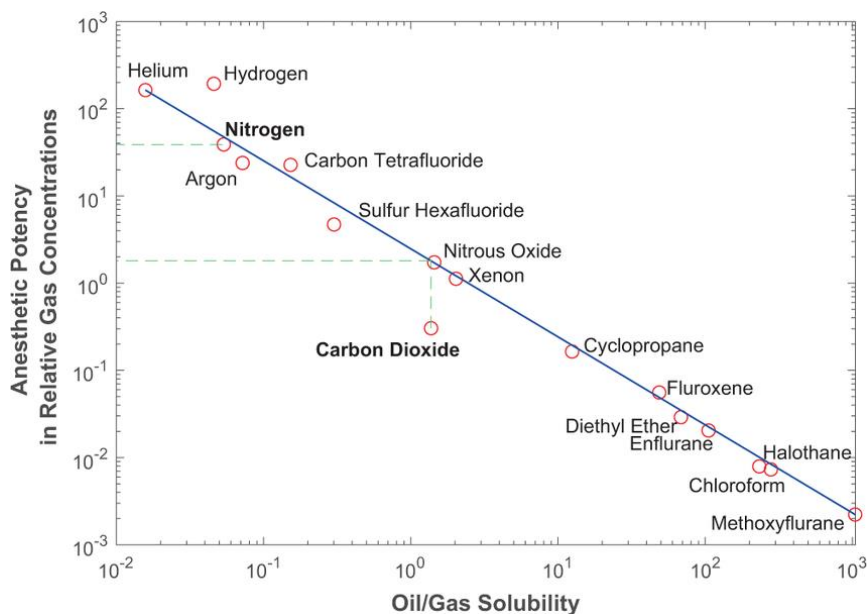
cirúrgicos, sendo que os registros de indução desse estado datam de meados de 1800<sup>40</sup>.

Os anestésicos gerais são os fármacos responsáveis por gerar tal estado, e apesar de produzirem um efeito sistêmico similar, variam na sua composição química, abrangendo fenóis, hidrocarbonetos halogenados, barbitúricos, gases inorgânicos, entre outros<sup>40</sup>. Devido à ausência de um padrão estrutural compartilhado entre os anestésicos, atualmente eles são classificados de acordo com a via de administração, intravenosos ou inalatórios, sendo que o primeiro grupo é mais utilizado para indução da anestesia enquanto o segundo é para sua manutenção.

Os anestésicos gerais modificam o funcionamento do SNC e acabam alterando a comunicação entre regiões diferentes do cérebro. Essas alterações, reveladas por eletroencefalografia (EEG), são interpretadas como oscilações na atividade cerebral que estão associadas às características comportamentais da anestesia geral<sup>2,41</sup>. Mas, apesar do conhecimento a nível sistêmico, do histórico de uso e avanços no campo da anestesiologia, o mecanismo molecular por trás do estado anestésico ainda é desconhecido. A dificuldade situa-se no efeito abrangente e no fato de que não há um padrão químico comum entre os anestésicos para implicar um mecanismo específico para todos.

Inicialmente, acreditava-se que uma propriedade físico-química geral seria responsável pela ação dos anestésicos, e a lipofilicidade pareceu atender essa suposição. A importância desse fator é evidenciada pela regra de Meyer-Overton, que correlaciona a potência do anestésico de forma diretamente proporcional à sua solubilidade em óleo<sup>42</sup>.





**Figura 7 Correlação de Meyer-Overton para anestésicos inalatórios.** Quanto maior a lipossolubilidade do composto em óleo, maior é sua potência anestésica. A potência é referente a dose necessária para indução da anestesia e a lipossolubilidade está relacionada ao coeficiente de partição em óleo do anestésico. O gráfico mostra que o halotano é um dos anestésicos inalatórios mais potentes, e de fato ele é muito utilizado. (Figura retirada de DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-020-64436-z>).

Dessa correlação surgiu a teoria lipídica, ou indireta, que sugere que a partição de um anestésico na membrana altera suas propriedades físico-químicas e, conseqüentemente, modifica o funcionamento de proteínas do neurônio de maneira inespecífica<sup>43</sup>. A princípio, esse distúrbio na membrana causado pelos anestésicos estaria relacionado com a expansão de volume<sup>44</sup>, aumento da fluidez<sup>45</sup> e mudanças no perfil de pressão lateral da membrana<sup>44,46</sup>. Contudo, essas mudanças por si só não são capazes de explicar casos como:

- I. Seletividade: insensibilidade de canais a certos anestésicos mesmo sendo sensíveis a outros <sup>47,48</sup>;
- II. Estereoseletividade: um isômero mais potente que o outro mesmo tendo a mesma lipossolubilidade<sup>49</sup>;
- III. Exceções à regra de Meyer-Overton: álcoois de cadeia longa não têm efeito anestésico, ao contrário do esperado<sup>50</sup>;
- IV. Alterações químicas: derivados de anestésicos com pequenas alterações em grupos químicos não têm a mesma ação<sup>51</sup>.

Por fim, foi constatado que concentrações fisiológicas relevantes de anestésicos afetam minimamente as propriedades da membrana, e que essas alterações poderiam ser replicadas por um aumento singular da temperatura<sup>52,53</sup>.

Contudo, por mais que as evidências mostrem que a ação indireta não é inteiramente responsável pela anestesia, é importante ressaltar que sua participação não deve ser descartada, uma vez que ainda existem evidências a favor desse tipo de modulação, como o trabalho recente de Pavel *et al.*<sup>54</sup>, que mostrou sinais de um mecanismo de ativação de canais de vazamento (TREK-1) via perturbação de balsas lipídicas por clorofórmio e isoflurano.

Devido as inconformidades de evidências do modelo indireto, a busca por mecanismos de ação transferiu sua atenção para as proteínas, já que elas oferecem diversas regiões transmembrânicas favoráveis à ligação de pequenos ligantes hidrofóbicos. Logo foi constatado que os anestésicos interagem e alteram a atividade de diferentes tipos de canais iônicos<sup>55</sup>. Assim, surgiu a teoria da ação direta, a qual sugere que a ligação direta de anestésicos em sítios específicos dos canais modula a dinâmica de proteínas como receptores de neurotransmissores (ex: GABA<sub>A</sub><sup>56,57</sup>), canais voltagem dependentes (ex: Kv<sup>58</sup>, Nav<sup>59</sup>) e constitutivamente abertos (ex: K2P<sup>47</sup>) resultando em depressão da transmissão neuronal excitatória e aumento da inibição neuronal.

Estudos de eletrofisiologia em sistemas reducionistas foram uns dos primeiros a apontar a relação direta ao mostrarem o deslocamento da atividade do canal em concentrações significativas dos anestésicos. Além disso, modelos *in vivo* mostraram que o estado de anestesia de roedores foi revertido após a infusão de anticorpos específicos ao canal iônico Kv1.2<sup>60</sup>, resultado semelhante também observado usando o inibidor de Kv1.3, ShK-186<sup>61</sup>. Em outro experimento, ratos nocaute para o canal TREK-1 apresentaram resistência ao efeito de anestésicos gerais<sup>62</sup>. Por fim, a união de estruturas cristalográficas com mutações pontuais e estudos de dinâmica molecular já apontaram sítios de interação com os anestésicos em canais procarióticos<sup>63,64</sup>, bem como em eucarióticos<sup>65,66</sup>. Apesar das evidências, as interações com anestésicos ainda são um fenômeno complexo de ser avaliado, já que varia de acordo com o tipo de anestésico, concentração, conformação do canal, além da possibilidade de múltiplos sítios de interação<sup>64,67</sup> e diversos estados de ocupação desses sítios<sup>68,69</sup>.

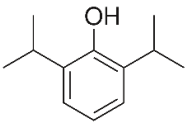
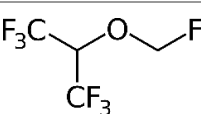
### 1.2.1 Modulação do Kv1.2

Um dos modelos propostos para os canais Kv dentro da teoria direta é o distúrbio conformacional provocado por modulação alostérica. A voltagem controla o equilíbrio entre as conformações abertas e fechadas, aumentando a população de canais abertos em potenciais positivos. O modelo minimalista sugere que os anestésicos, ao se ligarem às proteínas, também seriam capazes de interferir nesse equilíbrio, favorecendo o estado aberto. No momento, o canal Kv1.2 se provou um ótimo exemplar para avaliar tal modelo, devido sua detalhada caracterização estrutural e estudos mostrando flexibilidade de modulação. Essa plasticidade é evidenciada pela resposta do Kv1.2 a sevoflurano e propofol.

O sevoflurano é um anestésico éter fluorado de administração inalatória. Descoberto em 1971, ele é muito usado atualmente na prática cirúrgica para manter o estado anestésico em razão de seu perfil farmacológico de alta potência anestésica e poucos efeitos adversos, como irritação das mucosas<sup>70</sup>.

Já o propofol é um anestésico intravenoso usado para indução e manutenção do estado de anestesia. Ele é adequado para cirurgias de porte pequeno, devido à rápida indução e metabolização, o que leva a uma recuperação rápida. Apesar de potenciais efeitos adversos como depressão cardiovascular e respiratória, o propofol é bastante utilizado desde 1983<sup>71</sup>.

**Tabela 2 Características e propriedades dos anestésicos gerais: sevoflurano e propofol.**

Anestésico	Estrutura Química	Via de administração	Dose para indução de anestesia	Modulação do Kv1.2	Ref.
Propofol		Intravenoso	2 - 2.5mg/kg para adultos	30µM Sem efeito	48,71
Sevoflurano		Inalatório	~ 2.1 (% v/v) *1 para adultos	1mM Aumenta atividade	33,70,72

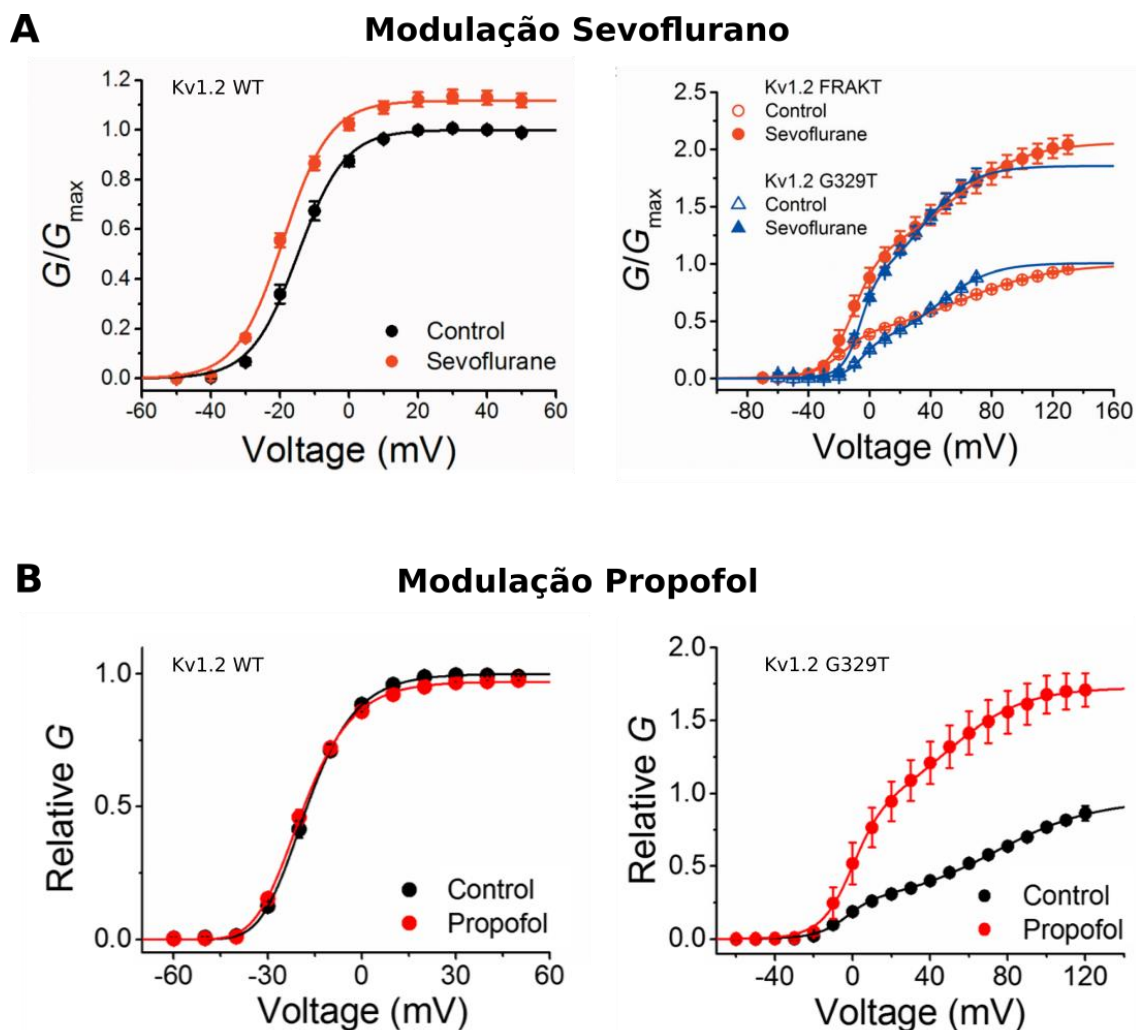
<sup>1</sup> \*Concentração alveolar mínima de anestésico que impede o movimento em 50% dos indivíduos em resposta a um estímulo nocivo.

Em relação à modulação do Kv1.2, 1 mM de sevoflurano potencializa a atividade do canal, tanto aumentando a condutância máxima ( $G_{\text{máx}}$ ) em 13% quanto deslocando a curva da relação G-V para esquerda, ou seja, houve uma diminuição de ~4mV na voltagem necessária para ativar metade da população de canais ( $V_{1/2}$ )<sup>33,58</sup>. Em contraste, observa-se a insensibilidade do canal ao propofol, já que as curvas de condutância do controle e na presença de 30 $\mu$ M de propofol se sobrepõem<sup>48</sup> (Figura 8).

Outro ponto relevante em relação à modulação do Kv1.2 por anestésicos, é que nos estudos já citados foram feitos experimentos mutagênicos que evidenciaram a sensibilidade da região *linker* do canal a anestésicos. A substituição de cinco aminoácidos na sequência do *linker* do Kv1.2 o deixaram igual à sequência do *linker* do canal sensível à voltagem de drosófilas K-Shaw2 (chamado de mutante FRAKT) e, nessas condições, na presença de sevoflurano, o deslocamento para esquerda do  $V_{1/2}$  foi de ~15mV e a  $G_{\text{máx}}$  aumentou em mais de 100% comparado ao controle. Um comportamento semelhante ao mutante FRAKT também é observado na mutação pontual G329T no *linker*<sup>33</sup>, que da mesma forma proporcionou a potencialização da atividade do canal na presença de propofol<sup>48</sup> (Figura 8 - B).

Esses dados apontam a importância da região *linker* para modulação de anestésicos, já que a mutação de apenas um resíduo foi capaz de promover um aumento relativo bastante significativo na presença do sevoflurano, bem como do propofol. Tal disparidade deve ter relação com alguma modificação no acoplamento eletromecânico propiciado pelo *linker*<sup>38,39</sup>.

Ademais, as análises de mutação ainda revelaram que os efeitos de ativação e aumento da corrente máxima do canal são independentes, corroborando para a teoria de múltiplos sítios de interação, em que cada sítio contribui para uma parte da modulação. Essa conclusão surgiu após o mutante K-Shaw T330G, mutação correspondente a G329T no Kv1.2, praticamente abolir o deslocamento da curva G-V provinda do sevoflurano, mas manter o aumento na  $G_{\text{máx}}$ . Portanto, há pelo menos dois sítios que estão envolvidos com a modulação por sevoflurano, sendo um alostericamente acoplado à região eletromecânica que está ligada com o *gating* (ex: *linker*, interface S4-S5, C-terminal da S6) e o outro é independente dessa região e afeta a condutância máxima, provavelmente estabilizando conformações abertas<sup>33</sup>.

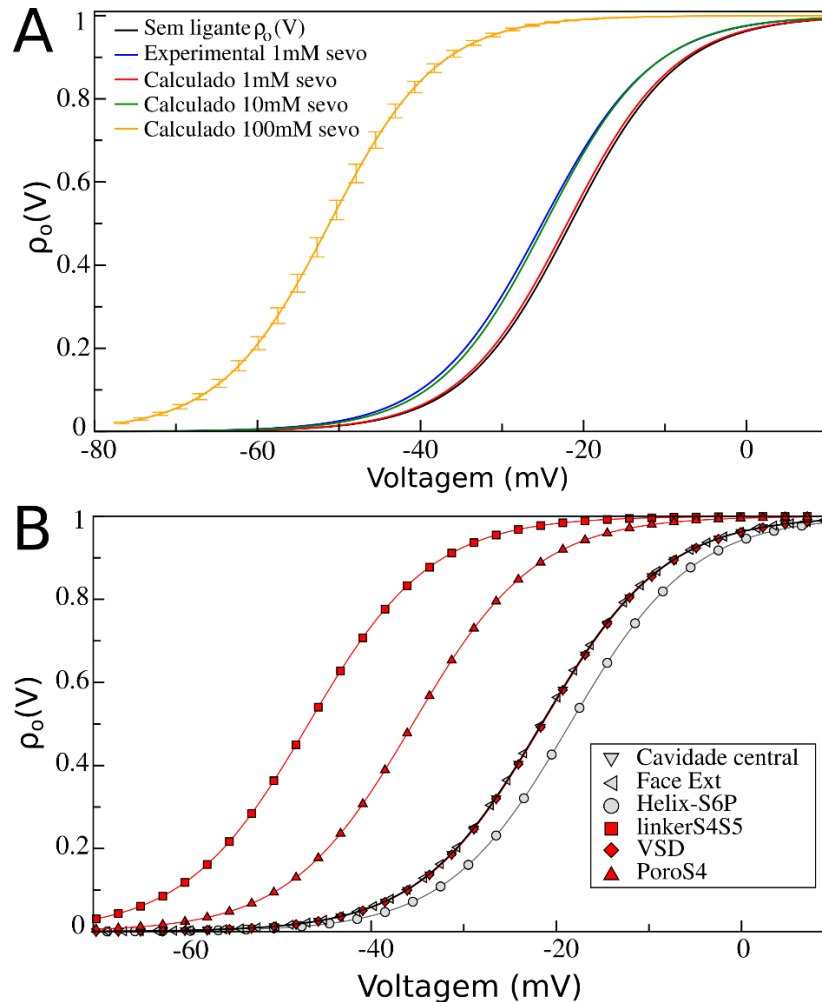


**Figura 8** A modulação do canal Kv1.2 é evidenciada nas curvas da relação G-V, que mostram o aumento do fluxo de íons em função da mudança de voltagem. (A) Gráficos adaptados de Liang *et al.* 2015<sup>33</sup> que mostram aumento de  $G_{max}$  do canal selvagem Kv1.2 (WT) e deslocamento negativo da curva na presença de 1mM de sevoflurano. Esses efeitos são amplificados nos mutantes Kv1.2 FRAKT e Kv1.2 G329T. (B) Gráficos adaptados de Bu *et al.* 2018<sup>48</sup> mostram que na presença de 30 $\mu$ M de propofol não há alteração na relação G-V do canal selvagem, mas o mutante KV1.2 G329T já demonstra sensibilidade à mesma quantidade do anestésico.

Os resultados experimentais que apontam a modulação do canal pelo sevoflurano foram capazes de serem replicados com modelos computacionais, agregando ainda mais indícios do impacto individual de cada sítio na  $\rho_0$  do canal e na estabilidade de uma conformação<sup>69</sup>.

A partir das técnicas de *docking* molecular, que prediz a melhor orientação de ligação de uma molécula com seu alvo proteico, e do cálculo da energia de ligação no sítio via *Free energy perturbation* (FEP), sítios putativos de ligação do sevoflurano foram detectados no Kv1.2 nas conformações aberta e fechada e, ao verificar os efeitos da ligação no equilíbrio entre estados, observa-se mais uma vez o deslocamento da curva de probabilidade de abertura (Figura 9 - A), sendo que os

sítios na região do *linker* e na interface S4/poro foram os principais responsáveis pela estabilidade do estado aberto, enquanto o sítio na hélice S6 favoreceu mais a estabilidade do estado fechado (Figura 9 - B).



**Figura 9** Curvas de probabilidade de abertura do Kv1.2 adaptado de Stock et al. 2018<sup>69</sup>.  $\rho_o(V)$  do canal para diferentes valores de voltagem. A curva preta mostra o controle experimental, sem ligante, que só é afetado pela voltagem. Em azul temos a referência experimental para 1mM de sevoflurano<sup>33</sup>, enquanto as demais curvas correspondem às  $\rho_o(V)$  estimadas para as concentrações de 1mM(vermelho), 10mM(verde) e 100mM(amarelo) usando modelo *in silico*. (B) Análise de decomposição por sítio para a concentração de 100mM.

## 2. Justificativa e Objetivos

### 2.1 Justificativa

Nas últimas décadas, o campo da biologia molecular passou por vários avanços e descobertas, como o desenvolvimento, em 2012, da maquinaria de edição de material genético pelo complexo CRISPR/Cas9 que foi originado do sistema de defesa bacteriano, e mais recentemente, temos o exemplo da startup *DeepMind* que, no final do ano de 2020, conseguiu prever o enovelamento de proteínas a partir de sua sequência de aminoácidos usando o algoritmo de *deep learning AlphaFold*. Contudo, apesar dos progressos, o funcionamento de vários mecanismos moleculares permanece desconhecido e a ação dos anestésicos gerais é, sem dúvida, um dos mais desafiadores.

O uso de drogas para gerar o estado de anestesia data de mais de dois séculos, mas ainda não se sabe ao certo como esses fármacos causam tal estado. O desafio reside na diversidade de moléculas da classe anestésica que não compartilham um padrão estrutural que justificaria um efeito sistêmico resultante de um mecanismo comum a todos. Entre as várias teorias sobre a ação desses fármacos, as teorias direta e indireta são as que mais cresceram nos últimos anos, e com várias evidências a favor e contra, dão força à hipótese de que a ação dessas moléculas é, muito provavelmente, o resultado de dois ou mais mecanismos moleculares.

Nesse cenário, vários estudos evidenciaram a relação direta de interação de anestésicos gerais com canais iônicos, em baixas concentrações, em múltiplos sítios e em múltipla ocupância<sup>68,69</sup>, dando suporte à ligação direta como um dos mecanismos envolvidos na anestesia. Dentro desse mecanismo surgiu uma vertente que explora a perturbação do equilíbrio entre estados da proteína decorrente da ligação do anestésico. Como essa hipótese implica um equilíbrio químico, é possível inferir um ciclo termodinâmico, em que há transição entre diversos estados, e a probabilidade de ocorrência de cada conformação depende da energia de ligação do anestésico com cada estado.

Para estudar esse modelo, o canal Kv1.2 fornece não apenas seus estados aberto e fechado bem definidos, mas também sensibilidade variada a anestésicos gerais. Assim, é possível avaliar o distúrbio no equilíbrio de estados causado por um

anestésico (sevoflurano) com ação comprovada no canal<sup>33</sup>, bem como usar um anestésico sem efeito na atividade do canal (propofol)<sup>48</sup> como controle negativo para as análises.

Desse modo, as propriedades termodinâmicas desse sistema (canal-anestésico) foram avaliadas usando um arcabouço teórico que retira dados diretamente de simulações de dinâmica molecular de *flooding* (fld-MD). Nesse tipo de simulação, o canal é equilibrado na presença de um meio saturado de ligantes que migram de forma espontânea para múltiplas regiões degeneradas da proteína a taxas reversíveis e finitas.

Quando esse sistema chega ao equilíbrio, é possível averiguar o número médio de ligantes na interface proteica ao longo da trajetória e, conseqüentemente, a probabilidade de ocupância e, assim, calcular a função de partição de cada estado<sup>68</sup>. Com essas grandezas estimadas, é possível reconstruir o equilíbrio entre a conformação aberta e fechada em diferentes valores de voltagem<sup>69</sup> e, desse modo, obter a probabilidade de ocorrência de um estado.

A vantagem desse tipo de averiguação do sistema é que a interação com a proteína não é enviesada e não é baseada apenas em critérios físicos, como os utilizados por algoritmos de *docking*. Além disso, as análises são simplificadas, já que todas as constantes são obtidas diretamente das simulações sem precisar de técnicas adicionais para calcular variáveis como energia de ligação. Todavia, a metodologia trabalha com valores absolutos de ordem de grandeza alta, por isso, optou-se por usar um *toy model* com valores relativos das propriedades dos sistemas para as análises.

Ademais, propriedades da membrana que podem ser afetadas pela presença do anestésico também foram avaliadas para verificar se os efeitos observados, dentro de um sistema reducionista, são provindos somente da modulação alostérica.

Por fim, esse estudo busca gerar evidências que estejam de acordo com os dados já conhecidos na literatura que favorecem a hipótese de os anestésicos interferirem diretamente no equilíbrio de estados das proteínas e, conseqüentemente, na resposta neuronal. Diante disso, esse tipo de estudo é o ponto de partida de pesquisas que visam diminuir efeitos colaterais ao modificar ou desenvolver novos fármacos para serem mais seletivos e eficazes.



## 2.2 Objetivos gerais

Esse estudo visa investigar o impacto nas propriedades de um sistema reducionista, decorrentes da interação dos anestésicos com tal sistema, usando técnicas otimizadas envolvendo simulações atomísticas de dinâmica molecular tipo *flooding* e, assim, verificar a influência do mecanismo alostérico no equilíbrio entre estados de um canal iônico.

## 2.3 Objetivos específicos

- ❖ **Replicar os resultados já existentes na literatura do impacto do sevoflurano no equilíbrio de dois estados do Kv1.2 analisando simulações de *flooding***

Trabalhos anteriores do grupo conseguiram replicar resultados experimentais do desvio do equilíbrio entre estados causado pelo sevoflurano no canal Kv1.2 usando técnicas de *docking* e cálculo de energia via FEP. O estudo atual visa, mais uma vez, repetir esses resultados e avaliar o modelo de alosteria usando um delineamento experimental mais simples ao empregar a metodologia de simulação de dinâmica molecular tipo *flooding* em altas concentrações.

- ❖ **Uso da técnica com controle negativo**

As técnicas de análise das simulações do *flooding* também vão ser usadas em um sistema com propofol em altas concentrações para servir como controle negativo, já que, experimentalmente, foi provada a insensibilidade do Kv1.2 a esse anestésico.

- ❖ **Verificar influência dos anestésicos nas propriedades da membrana**

Também será avaliado o efeito indireto do particionamento dos ligantes na membrana a partir das propriedades da membrana relacionadas com sua fluidez e que podem ser calculadas computacionalmente, como área por lipídio e o parâmetro de ordem dos lipídios.

## 3. Métodos

Para alcançar os objetivos deste estudo, foi traçado um fluxograma de trabalho composto de: (i) averiguação da estabilidade dos sistemas (ii) obtenção da distribuição de ligantes na interface proteica via simulações de dinâmica molecular tipo *flooding* (iii) cálculo da probabilidade de ocupância diretamente da trajetória (iv) comparação das probabilidades com curvas geradas via *toy model* (v) investigação do impacto conformacional proporcionado pela ligação dos anestésicos.

### 3.1 Metodologia Computacional

Há muitos anos, a teoria e os experimentos de bancada andam lado a lado para avaliar as hipóteses científicas, um complementando o outro. Com o avanço da tecnologia, técnicas computacionais surgiram e foram capazes de recriar procedimentos de bancada chegando perto do resultado experimental e, conseqüentemente, acabaram aumentando a demanda por modelos teóricos mais acurados. Os experimentos computacionais permitem o controle e o ajuste total dos parâmetros experimentais, logo, é possível testar cenários com condições inviáveis (ex.: temperaturas extremas) ou com custos muito altos (ex.: pressão alta). Ademais, os testes *in silico* podem utilizar resoluções espaciais e temporais impraticáveis de serem alcançadas com outras metodologias.

Métodos computacionais foram empregados nessa pesquisa por serem capazes de trabalhar na escala espacial de  $10^{-10}$  m e temporal de  $10^{-9}$  s exigidos para o estudo da interação entre receptor e ligante. Dessa forma, é possível observar a nível atômico os vários graus de complexidade da modulação de proteínas por pequenos ligantes, mas, infelizmente, o ganho na escala ainda é restringido a um sistema reducionista, perdendo a complexidade de interação com uma membrana eucariótica e sinalização celular. Não obstante, nesse projeto foram usadas técnicas computacionais de dinâmica molecular, aliadas a modelos teóricos para descrever as propriedades provindas da interação dos anestésicos em um sistema com membrana e o canal Kv1.2.

### 3.1.1 Simulações de dinâmica molecular

Para observar a interação dos ligantes com canais iônicos usamos a técnica computacional de dinâmica molecular, que descreve o comportamento molecular de um conjunto de átomos ao avaliar a evolução temporal desse sistema regido por suas interações. As interações intra e intermoleculares são as responsáveis pela movimentação dos átomos e, dadas as posições e velocidades iniciais das partículas, a evolução temporal subsequente é completamente determinada a partir do cálculo de potenciais e integração das equações de Newton em um certo intervalo de tempo, chamado de passo de integração.

Uma vez que se tem a trajetória do sistema é possível retirar as informações das propriedades físicas (ex.: temperatura, pressão, energia livre). Como o sistema simulado é considerado ergódico, as propriedades são obtidas a partir da média temporal, e devem coincidir com a média do conjunto de microestados possíveis amostrados durante a simulação. O princípio da mecânica estatística é adotado aqui, pois, em virtude do número de átomos, seria inviável amostrar todos os microestados para obter sua média. Por isso, para uma trajetória bastante longa temos:

$$\lim_{t \rightarrow \infty} \bar{A}(t) = \langle A \rangle \quad 3.1$$

em que, a média da propriedade termodinâmica  $A$  tende para a média de todos os estados possíveis  $\langle A \rangle$ .

### 3.1.2 Campo de força

O comportamento do sistema é regido pela função de energia potencial  $U(\vec{r})$ , que depende das coordenadas cartesianas  $\vec{r}$  do sistema. A acurácia da simulação está atrelada à capacidade do potencial de reproduzir o comportamento do sistema nas condições em que a simulação é executada. A descrição de interações intra e intermoleculares para cada par atômico está configurado nos campos de força como o CHARMM<sup>73</sup>, AMBER<sup>74</sup> e GROMOS<sup>75</sup>. Os parâmetros das funções de energia desses campos foram obtidos a partir de trabalhos experimentais e/ou cálculos de mecânica quântica<sup>76</sup> e a energia potencial é estimada pela soma de termos que representam as contribuições de interações ligadas e não-ligadas em função das coordenadas atômicas.

$$U(\vec{r}) = U_{\text{ligado}} + U_{\text{não-ligado}} \quad 3.2$$

Nesse trabalho foi empregado o campo de força CHARMM por ser compatível para pequenos ligantes<sup>73</sup>. Nesse campo, as interações não ligadas dependem apenas da distância entre átomos, independente de qual molécula pertencem, enquanto as interações ligadas são calculadas somente para átomos da mesma molécula.

### Interações Intramoleculares

$$\sum_{\text{ligação}} k_L (r_{ij} - r_0)^2 + \sum_{\text{ângulo}} k_\theta (\theta_{ij} - \theta_0)^2 + \sum_{\text{diedro}} k_d [1 + \cos(n\varphi - \gamma)] + \sum_{\text{improprio}} k_i (\omega - \omega_0)^2 \quad 3.3$$

A porção intramolecular da energia potencial inclui, para todos os pares de átomos ij ligados, termos de ligação, ângulo ( $\theta$ ), ângulos diedros ( $\varphi$ ) e ângulos diedros impróprios ( $\omega$ ). Os parâmetros  $k_L$ ,  $k_\theta$ ,  $k_d$ ,  $k_i$  são as respectivas constantes de força; e as variáveis  $n$  e  $\gamma$  são a periodicidade e fase do ângulo diedro; e  $r_0$ ,  $\theta_0$ ,  $\omega_0$  são a distância e os ângulos de equilíbrio.

- ❖ **Energia de ligação:** potencial harmônico relativo à distância entre dois átomos que realizam uma ligação covalente;
- ❖ **Energia de ângulo:** referente ao ângulo entre três átomos ligados covalentemente;
- ❖ **Energia de diedro:** associado ao ângulo entre dois planos formados pela torção entre quatro átomos ligados;
- ❖ **Impróprio:** potencial harmônico artificial do campo de força para manter átomos no mesmo plano.

### Interações Intermoleculares

$$\sum_{\text{não-ligado}} \frac{q_i q_j}{4\pi\epsilon r_{ij}} + \epsilon_{ij} \left[ \left( \frac{r_0}{r_{ij}} \right)^{12} - 2 \left( \frac{r_0}{r_{ij}} \right)^6 \right] \quad 3.4$$

Os termos referentes às interações intermoleculares incluem interações eletrostáticas e de Van der Waals, em que  $q_i$  e  $q_j$  são as cargas parciais dos átomos,

e  $\epsilon$  é a constante dielétrica. As variáveis  $\epsilon_{ij}$  e  $r_0$  correspondem ao módulo do potencial mínimo e à distância de equilíbrio, respectivamente.

- ❖ **Energia eletrostática:** referente à lei de Coulomb;
- ❖ **Energia de Van der Waals:** relacionado a repulsão de nuvens eletrônicas e as forças de dispersão. Interações tratadas pelo potencial de Lennard-Jones 12-6. Os termos elevados remetem à grandeza da força de repulsão que aumenta com a aproximação do par de átomos e de atração que diminui à medida que a distância aumenta, remetendo à falta de interações.

### 3.1.3 Integração das equações de movimento

Para começar qualquer tipo de simulação é necessário saber os parâmetros do campo de força, a posição de todos os átomos do sistema e as velocidades, que no momento inicial são distribuídas aleatoriamente. Além disso, é essencial definir as características do sistema, que podem variar desde as configurações padrões de simulação, chamado de *ensemble* microcanônico (número de moléculas, volume e energias constantes - NVE) a *ensembles* que remetem a condições experimentais como um sistema canônico (número de moléculas, temperatura e volume constantes - NVT) ou um sistema isotérmico-isobárico (número de moléculas, temperatura e pressão constantes – NPT).

Uma vez que as condições iniciais da amostra estão definidas, o programa de dinâmica molecular gera uma trajetória dos átomos do sistema. Para tal, é empregado um esquema de integrações de equações de movimento para obter a evolução temporal do sistema. Esse esquema é resolvido por algoritmos, e o escolhido para esse estudo foi o de *Verlet*<sup>77</sup>, empregado pelo programa *Nanoscale Molecular Dynamics* (NAMD<sup>78</sup>). O algoritmo adotado utiliza a posição atual das moléculas ( $\vec{r}(t)$ ) e velocidades ( $\vec{v}(t)$ ) em um dado instante  $t$ , então a posição no instante subsequente ( $t + \delta t$ ) é dada pela expansão de Taylor das posições em  $(t + \delta t)$  e  $(t - \delta t)$ , de modo que:

$$\vec{r}(t + \delta t) = 2\vec{r}(t) - \vec{r}(t - \delta t) + \frac{\vec{F}(t)}{m} \delta t^2 + O(\delta t^4) \quad 3.5$$

onde  $\vec{r}(t + \delta t)$  é a posição a ser determinada para o próximo instante e  $\vec{r}(t - \delta t)$  é a posição no instante anterior,  $m$  é a massa e o erro associado é na ordem de  $O(\delta t^4)$ .

Ademais,  $\vec{F}$  é a força que movimenta os átomos calculada pela energia potencial estimada  $U(\vec{r})$  :

$$\vec{F} = -\frac{dU(\vec{r})}{dr} \vec{n} \quad 3.6$$

onde  $\vec{n} = \vec{r}/r$  é o vetor unitário do vetor distância. Por último, as velocidades também são inferidas por uma expansão de Taylor, e são utilizadas para o cálculo da energia cinética:

$$\vec{v}(t + \delta t) = \frac{\vec{r}(t + \delta t) - \vec{r}(t - \delta t)}{2\delta t} + O(\delta t^2) \quad 3.7$$

A escolha do intervalo de tempo para o cálculo das forças (passo de integração -  $\delta t$ ) é crucial para a performance da simulação. Por um lado, passos de integração pequenos geram trajetórias mais precisas, assegurando a conservação de energia, todavia, o custo computacional é maior nessas circunstâncias. Por outro lado, quanto maior for o passo de integração, maior é o erro agregado, já que não é possível amostrar interações rápidas e o cálculo das forças acaba enviesado, aplicando forças por mais tempo do que elas estariam de fato agindo no átomo. Portanto, o passo de integração adotado é da ordem de 2 femtosegundos ( $10^{-15}$ s), que permite a amostragem de eventos de vibração rápidos dos átomos.

#### 3.1.4 Interações de longa distância

O potencial adotado de Leonard-Jones 12-6 tem alcance infinito e como a quantidade de interações intermoleculares aumenta na ordem de  $N^2$ , calcular todas exigiria muito processamento computacional. Ademais, para pares muito afastados, o potencial tende a zero e, por isso, é delimitado um raio  $R_c$ , onde cálculos de interação entre pares de átomos separados por uma distância maior que esse *cutoff* são desconsiderados. Essa delimitação diminui os cálculos a serem feitos a cada passo de integração e, conseqüentemente, economiza tempo computacional.

Contudo, esse *cutoff* cria uma descontinuidade abrupta de energia na fronteira do  $R_c$  e, para não prejudicar a conservação de energia do sistema, o potencial é ajustado por uma *switching function* para desaparecer de forma suavizada no raio do *cutoff*, como mostrado abaixo:

$$U_{trunc} = \begin{cases} U(r) - U(Rc) , r \leq Rc \\ 0 , r > Rc \end{cases} \quad 3.8$$

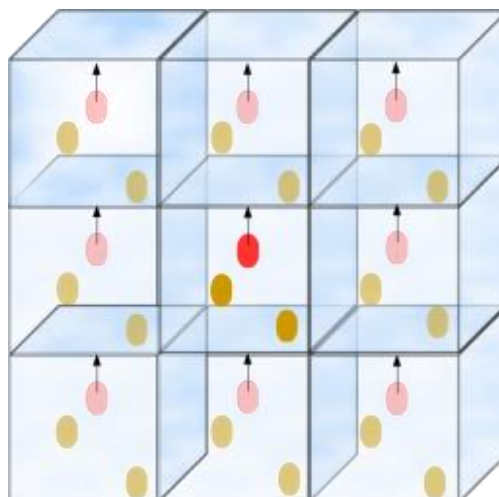
A restrição de distância para o cálculo do potencial atende bem o potencial de van der Waals, já que ele decai na ordem de  $r^{-6}$ , porém, o potencial eletrostático decai na ordem de  $r^{-1}$ , logo, o *cutoff* adotado pode acabar negligenciando valores significativos do termo eletrostático, no caso de distâncias onde o termo de van der Waals já está próximo de zero. Para resolver esse problema é adotado um termo de longo alcance para tratar as interações eletrostáticas, no caso desse trabalho o método PME (*Particle Mesh Ewald* <sup>79</sup>) foi empregado. Essa metodologia define um potencial dependente da densidade de carga  $\rho(k)$ , que leva em consideração átomos distantes. Logo, o potencial eletrostático é reescrito como:

$$U_{eletrostático} = U_{Coulomb}(r) + U_{PME}(\rho(k)) \quad 3.9$$

### 3.1.5 Condição periódica de contorno

Outro problema que surge durante uma simulação são as partículas que se encontram nos limites do sistema que ficariam em contato com o vácuo. Para evitar esse efeito de borda, o sistema é fechado em uma caixa que é replicada infinitamente em todos os eixos cartesianos e os limites de cada célula estão em contato com os limites opostos das células vizinhas. Esse procedimento é chamado de condições periódicas de contorno e, também, replica a movimentação dos átomos da caixa principal em todas as réplicas.

Cada partícula interage com átomos que estão nas imagens próximas e apenas o par mais próximo é considerado para os cálculos para evitar redundância entre réplicas ou entre átomos muito distantes. Essa restrição é conhecida como critério de imagem mínimo e o *cutoff* para o cálculo deve ser menor que  $2R_c$  para garantir que as interações só estão sendo consideradas uma vez com cada átomo.



**Figura 10 Exemplificação da condição periódica de contorno.** A caixa principal, destacada no centro da figura, está rodeada por réplicas no plano tridimensional. No exemplo, quando o átomo em vermelho atravessa o limite da caixa principal e entra na réplica superior, o átomo equivalente à sua imagem na réplica inferior, extremidade oposta, aparece no sistema principal

### 3.1.6 Simulações tipo *flooding*-MD

As simulações de dinâmica molecular tipo *flooding* oferecem uma nova abordagem para o estudo de interações de pequenos ligantes com um alvo proteico<sup>64,80</sup>. Usando os princípios da dinâmica molecular, um sistema contendo um receptor é equilibrado na presença de um meio saturado de ligantes que interagem reversivelmente com a proteína de acordo com sua afinidade.

Vale ressaltar que a dinâmica molecular trabalha com mecânica clássica e não reproduz quebra nem formação de ligações covalentes, portanto, essa técnica só é viável para complexos receptor-ligante que não envolvem ligações covalentes. Outro ponto relevante é que a concentração de ligantes é alta para aumentar a amostragem, todavia, o número de ligantes não pode ser tão grande a ponto de prejudicar os graus de liberdade da proteína.

Uma das vantagens dessa metodologia é que a análise é simples já que ela fornece a probabilidade de densidade espacial  $\rho(\mathbf{R})$  do ligante próximo a proteína, logo, as afinidades de ligação podem ser resolvidas. Além disso, a interação com o canal não é enviesada, já que essa técnica mostra interações no equilíbrio sem depender de nenhum potencial artificial. Por outro lado, a amostragem dos eventos deve ser grande para analisar as propriedades das interações, exigindo um custo computacional alto, além de trabalhar com valores absolutos altos que podem gerar erros numéricos.



## 3.2 Teoria

É possível avaliar a perturbação do equilíbrio entre estados por pequenos ligantes usando princípios da mecânica estatística para determinar a probabilidade de um determinado estado em função da concentração de ligantes<sup>81</sup>.

O modelo teórico apresentado nesse trabalho foi reformulado dos modelos de *Stock et al.* 2017<sup>68</sup> e *Stock et al.* 2018<sup>69</sup>. As referências usaram técnicas computacionais de *docking* molecular e cálculos de energia livre (FEP) para caracterizar o estado de ligação canal-anestésico, considerando múltiplos sítios independentes e com múltipla ocupância. A primeira aborda a descrição da densidade de probabilidade dos estados de ligação a partir de uma constante de ligação, enquanto a segunda discorre sobre a ligação do anestésico sevoflurano com os estados aberto e fechado do canal Kv1.2 para averiguar o equilíbrio entre estados.

Já a versão do modelo empregada nesse estudo foi adaptada para a metodologia de dinâmica molecular tipo *flooding* e considera a interface proteica como um único sítio proteico (dados ainda não publicados).

### 3.2.1 Equilíbrio entre estados

O equilíbrio entre dois estados,  $\mathbf{X} = \{A, F\}$ , de um canal pode ser representado pela reação química de equilíbrio  $F \xrightleftharpoons{K(\chi)} A$ , que é regida por uma constante de equilíbrio  $K$  dependente de uma propriedade intensiva ( $\chi$ ) do sistema, que ao ser alterada influencia a probabilidade de ocorrência de um dos estados. No caso de canais dependentes de voltagem essa propriedade é a voltagem. O equilíbrio também pode ser afetado por ligantes, que ao se ligarem no canal estabilizam uma certa conformação  $\mathbf{X}$ , descrito pela reação de equilíbrio:



em que um número  $n$  de ligantes  $L$  interagem de forma diferencial com as conformações  $F$  e  $A$  e deslocam a constante de equilíbrio  $K(n,V)$  do canal.

Para avaliar esse processo, foi utilizada a simulação de dinâmica molecular de *flooding*. Nela, assume-se um sistema com  $M$  moléculas, composto por uma proteína em uma posição fixa  $\mathbf{R}$  no plano cartesiano, que está em uma conformação definida

**X** e oferece um número  $s$  de sítios de interação. Essa proteína está inserida em uma bicamada lipídica hidratada compondo um volume  $V$ , que abrange todo o sistema, em que há um número  $N$  de ligantes idênticos. Considera-se, ainda, que o sistema está em equilíbrio termodinâmico, ou seja, número de moléculas, temperatura e pressão constantes.

No caso de ligantes hidrofóbicos, como os anestésicos, as moléculas se particionam na membrana e ocupam um volume  $V_r$ , chamado de reservatório, com densidade constante  $\bar{\rho} = N / V_r$ . Ao acessarem o reservatório, os ligantes têm acesso a múltiplas regiões degeneradas da proteína  $j = (1, \dots, s)$ , que abrange um volume total de sítio de ligação  $v$  que pode ser ocupado por  $n = n_1 + \dots + n_s$  ligantes de uma maneira não específica de baixa afinidade.

A probabilidade de densidade espacial  $\rho(\mathbf{R})$  descreve a distribuição do ligante, considerando as coordenadas do centro geométrico da molécula em uma posição  $\mathbf{R}$  do sistema. Como o ligante é encontrado no reservatório ou no volume do sítio proteico  $v$  a densidade espacial é simplificada em:

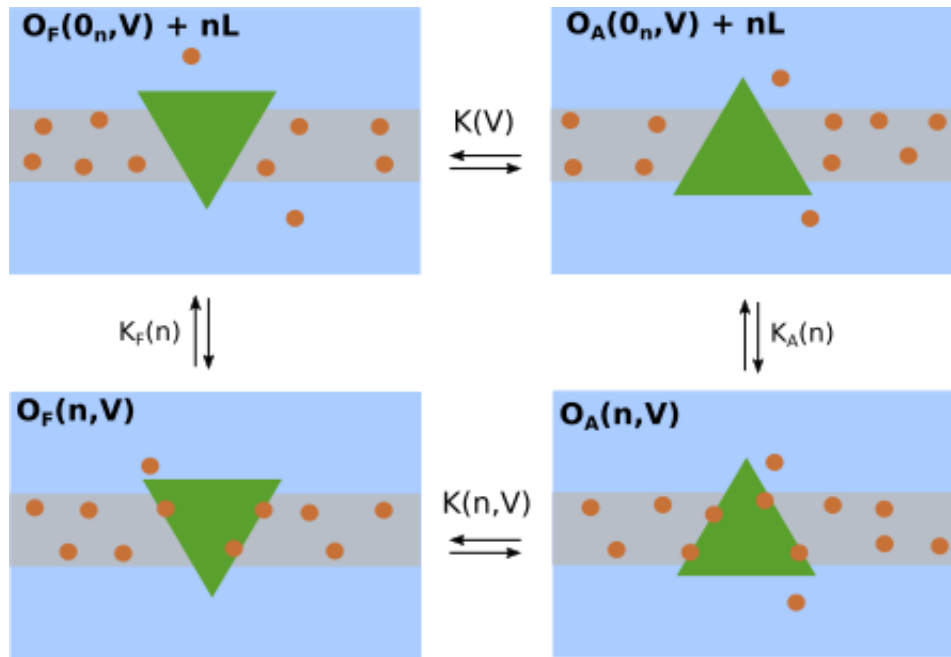
$$\rho(\mathbf{R}) = \begin{cases} \bar{\rho}, & \text{reservatório} \\ \rho_v(\mathbf{R}), & \forall \mathbf{R} \in v \end{cases} \quad 3.11$$

No âmbito das simulações, o volume do sítio de ligação  $v(\mathbf{R})$  é delimitado pelos ligantes a um raio ( $r^*$ ) da proteína que corresponde a distância da proteína em que a densidade espacial local é máxima.

Em termos de reações químicas no equilíbrio, os ligantes  $L$  podem se ligar ao receptor vazio  $O_x(0_1, \dots, 0_s)$ , com uma constante de equilíbrio  $K_x(n_1, \dots, n_s)$  associada, formando um estado específico de ocupância  $O_x(n_1, \dots, n_s)$  com  $n$  moléculas ligadas no sítio de ligação. Portanto, cada estado de ocupância tem um número total de ligantes associado a ele, que corresponde a  $n = (n_1 + \dots + n_s)$  e a reação resultante para o equilíbrio entre todos os estados possíveis de ocupância pode ser resumida em:



Agora a reação 3.10 para ligação concomitante de múltiplos ligantes  $L$  em múltiplas regiões proteicas degeneradas pode ser descrita pelo ciclo termodinâmico a seguir:



**Figura 11** Ciclo termodinâmico entre dois estados,  $X = \{\text{aberto} - A, \text{fechado} - F\}$ , na presença de ligantes. Em que  $O_X(0_n)$  representa o receptor vazio com todos os ligantes  $L$  no banho, e  $O_X(n)$  é um estado de ocupância com  $n$  ligantes interagindo com a interface proteica. A transição entre estados é mediada pela constante de equilíbrio  $K$ .

A reação 3.12 descreve o equilíbrio entre estados considerando todos os estados específicos de ocupância. O cálculo dessa estimativa é simples na ocasião de poucos sítios de interação e de baixa ocupância<sup>68</sup>. Todavia, as análises das simulações de *flooding* em altas concentrações evidenciam múltiplas regiões de interação e amostram um número grande de ligantes na interface proteica, logo, o número de estados de ocupância de uma determinada conformação é escalonado para esse tipo de análise e, conseqüentemente, o custo computacional para calcular a constante de equilíbrio da reação seria insustentável. Para contornar esse problema, o equilíbrio entre estados é avaliado via probabilidades de ocupância que são obtidas diretamente das simulações ao invés de avaliar os estados específicos de ocupância.

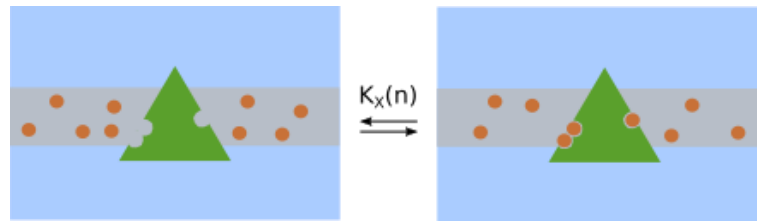
### 3.2.2 Constante de Ligação e Probabilidade de Ocupância

Para entender o equilíbrio entre estados, é preciso analisar as interações dos ligantes com os canais, que podem ser descritas em função de constantes de ligação que fornecem informações das propriedades termodinâmicas do sistema. A ligação pode ser definida pela reação  $P + nL \leftrightarrow PL_n$ , que considera o equilíbrio do receptor  $P$  vazio e ligantes livres com o estado do receptor ocupado. Esse equilíbrio tem uma constante de ligação associada que pode ser decomposta em três fatores: (i) volume

do sítio, (ii) energia de ligação no sítio proteico e (iii) energia de solvatação do ligante no reservatório, sendo que uma ligação só é favorável quando a energia de ligação supera a redução de entropia causada pela remoção de um ligante da solução para o volume do sítio de ligação. Logo, a constante de ligação pode ser definida de modo simplificado como:

$$K_X(n) = \frac{v^n}{n!} \times e^{-\beta W} \quad 3.13$$

em que  $v$  é o volume do sítio de ligação,  $\beta$  corresponde à temperatura fixa do sistema  $\beta = (k_B T)^{-1}$  e  $W$  é um termo de energia que representa a mudança das energias livres associadas com a ligação.



**Figura 12** Interação de ligantes com interface proteica mediada pela constante de ligação  $K_X(n)$ .

Essa constante é utilizada para estimar a probabilidade de ocupância do sítio de ligação  $\rho_X(n)$ , entretanto as simulações de *flooding* em altas concentrações oferecem uma aquisição mais direta dessa estimativa, que é definida como:

$$\rho_X(n) = \frac{K_X(n) \bar{\rho}^n}{Z_X} \quad 3.14$$

em que,  $\bar{\rho}^n = \bar{\rho}^{(n^1 + \dots + n^{máx})}$  corresponde à densidade da solução, e  $Z_X$  é a função de partição que corresponde à soma de todas as disposições possíveis no sítio proteico para o estado  $X$ , dado por:

$$Z_X = \sum_n K_X(n) \bar{\rho}^n \quad 3.15$$

### 3.2.3 Probabilidade de abertura

Para avaliar o ciclo termodinâmico da Figura 11 e, conseqüentemente, constatar dependência conformacional associada à ligação, é preciso separar a constante de equilíbrio  $K(n, V)$  em função da voltagem e dos ligantes<sup>69</sup>.

### 3.2.3.1 Impacto da voltagem

Primeiramente, o equilíbrio entre estados é impactado por um certo intervalo de voltagem quando o sistema é submetido a um potencial de Nernst induzido pela diferença de eletrólitos entre as faces da membrana. Nesse caso, a probabilidade de abertura pode ser escrita em termos de um estado de referência:

$$\rho_o(V) = \frac{\rho_A(V)}{\rho_A(V) + \rho_F(V)} \quad 3.16$$

$$\rho_o(V) = \frac{e^{-\beta E_A(V)}}{e^{-\beta E_A(V)} + e^{-\beta E_F(V)}} \quad 3.17$$

em que,  $\rho_o(V)$  é a probabilidade de abertura do canal, e  $E_x(V)$  é a energia livre da proteína em uma conformação X submetida a um potencial de membrana V, representando a energia potencial do canal relacionada com seu ambiente. Essa variável é composta pela energia química independente de voltagem  $E_x(V=0)$  e a carga efetiva da proteína  $Q_x$  na conformação X,  $E_x(V) = E_x(V=0) + Q_x V$ . Usando essa definição, a eq. 3.17 pode ser simplificada para uma equação de dois estados de Boltzmann, em que uma distribuição fornece a probabilidade de um sistema estar em um determinado estado em função da energia desse estado e da temperatura do sistema, temos:

$$\rho_o(V) = [1 + e^{+\beta \Delta Q [V_{1/2} - V]}]^{-1} \quad 3.18$$

considerando:

$$\Delta Q = - \frac{\Delta E_A(V) - \Delta E_F(V)}{V} \quad 3.19$$

em que,  $\Delta Q = Q_A - Q_F$  é a *gating charge* resultante da mudança de conformação da proteína e,

$$V_{1/2} = \frac{E_A(V=0) - E_F(V=0)}{\Delta Q} \quad 3.20$$

sendo  $V_{1/2}$  uma voltagem específica em que  $\rho_A(V) = \rho_F(V)$ . Por fim, a constante de equilíbrio  $K(V)$  em função da voltagem da reação  $F \xrightleftharpoons{K(V)} A$  é:

$$K(V) = \frac{\rho_A(V)}{\rho_F(V)} = e^{-\beta \Delta Q [V_{1/2} - V]} \quad 3.21$$

### 3.2.3.2 Impacto do ligante

Por intermédio das equações 3.14 e 3.18 que mostram, respectivamente, a probabilidade de um estado ligado e a probabilidade da conformação aberta dada uma voltagem, e levando em consideração todos os estados possíveis do receptor, seja ele com ou sem ligante representados no ciclo termodinâmico da Figura 11, a probabilidade de abertura dependente de voltagem do canal pode ser expressa em termos de funções de partição ( $Z$ ):

$$\rho_o(V) = \frac{K(V)Z_A}{Z_F + K(V)Z_F} \quad 3.22$$

essa probabilidade pode ser simplificada para uma equação de dois estados de Boltzmann, em que as contribuições energéticas da ligação são expressas pela razão das funções de partição das duas conformações:

$$\rho_o(V) = \left[ 1 + \frac{Z_F}{Z_A} e^{+\beta\Delta Q[V_{1/2}-V]} \right]^{-1} \quad 3.23$$

A razão das funções de partição mostra o impacto do ligante na  $\rho_o(V)$ , se ela for igual a 1 a ligação não tem dependência conformacional, logo, a probabilidade de abertura não muda, se ela for maior que 1 a preferência do ligante é pelo estado fechado e se ela for menor que 1 o estado aberto é estabilizado.

## 3.3 Protocolos

### 3.3.1 Simulações MD

Todas as simulações de dinâmica molecular foram realizadas usando o programa NAMD 2.12<sup>78</sup>, e os parâmetros do CHARMM36<sup>82</sup> foram utilizados para os cálculos envolvendo lipídios, proteínas, água e íons. As simulações foram conduzidas no estado NPT (número de moléculas, pressão e temperatura constantes) a 1 atm e 300K, e para manutenção desse estado NPT foi usado o pistão de Langevin. Também foram aplicadas condições periódicas de contorno nos eixos  $x$ ,  $y$  e  $z$  para eliminar efeitos de borda, 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. No caso das simulações de *flooding*, foi adotado o mesmo protocolo, salvo a adição dos parâmetros do campo de força para o sevoflurano<sup>83</sup> e para o propofol<sup>84</sup>.

### 3.3.2 Sistemas

#### ❖ Sistemas sem ligantes

Os sistemas puros (sem ligantes) são essenciais para as construções dos sistemas de *flooding*. Esses sistemas são criados, originalmente, a partir de uma bicamada lipídica de 1-palmitoil-2-oleil-sn-glicero-3-fosfatidicolina (POPC) que é solvatada por moléculas de água do modelo TIP3<sup>85</sup> e ionizada com solução salina de 0,15M de *KCl*. Então, as estruturas proteicas, aberta e fechada, são inseridas em uma bicamada com a construção descrita acima e esses sistemas são por fim submetidos à simulação, gerando vários microestados que levam em conta a flexibilidade da proteína.

As simulações de equilíbrio do canal Kv1.2 foram cedidas por colaboradores que já trabalharam com esses sistemas. O modelo do canal na conformação aberta foi obtido de Treptow *et al.*<sup>86</sup> e o da conformação fechada de um estudo que visava caracterizar os estados intermediários do canal<sup>34</sup>.

**Tabela 3 Característica dos sistemas sem ligantes.**

Sistema	Número de Lipídios	Tempo simulação
Membrana pura	232	50ns
Kv1.2 - estado aberto	426	250ns
Kv1.2 - estado fechado	426	13ns <sup>(2)</sup>

#### ❖ Sistemas ligante-membrana

Para averiguar o particionamento dos anestésicos na membrana e, posteriormente, seus efeitos indiretos, foram simulados três sistemas com somente membrana e anestésicos. Eles foram criados a partir de uma membrana pura, e os ligantes foram inseridos aleatoriamente na solução aquosa até atingir a concentração desejada. Os parâmetros para as simulações foram os mesmos descritos na seção anterior.

---

<sup>2</sup> A simulação (que deu origem aos *floodings*) foi feita em outro trabalho, mas dos dados originais só foram resgatados 13ns

**Tabela 4 Características dos sistemas ligante-membrana.**

Sistema	Número de Lipídios	Número de ligantes	Fração molar	Tempo simulação
Membrana + sevoflurano	232	94	0,29	276 ns
Membrana + sevoflurano	232	28	0,11	100 ns
Membrana + propofol	232	28	0,11	250 ns

#### ❖ Sistemas ligante-canal

Os sistemas da simulação de *flooding* tiveram como condição inicial a estrutura do final da trajetória das simulações sem ligante. Os anestésicos foram inseridos aleatoriamente na água até atingir as concentrações desejadas nos sistemas. Para essas simulações, também foi empregado o protocolo de dinâmica descrito na seção 3.3.1.

As simulações de *flooding* foram cedidas por um dos membros do laboratório de biologia teórica e computacional da Universidade de Brasília (LBTC), e estão sendo usadas, concomitantemente, como base para validação do arcabouço teórico de análises de interações ligante-receptor via simulações de *flooding* (dados a serem publicados).

**Tabela 5 Características dos sistemas ligante-canal.**

Sistema	Número de Lipídios	Número de ligantes	Concentração inicial	Tempo simulação
Kv1.2 aberto + sevoflurano	426	174	150 mM	300 ns
Kv1.2 fechado + sevoflurano	426	161	150 mM	300 ns
Kv1.2 aberto + sevoflurano	426	58	50 mM	300 ns
Kv1.2 fechado + sevoflurano	426	54	50 mM	300 ns



Kv1.2 aberto + propofol	426	57	50 mM	475 ns
Kv1.2 fechado + propofol	426	54	50 mM	475 ns

### 3.4 Análises

As figuras dos sistemas moleculares foram feitas com o programa *Visual Molecular Dynamics* (VMD<sup>87</sup>), enquanto os gráficos foram plotados com o programa *Matplotlib*<sup>88</sup>.

#### 3.4.1 Análise de estabilidade e equilíbrio

Devido às múltiplas interações que ocorrem entre os átomos do sistema durante a trajetória, é natural observar movimentação das estruturas ao longo do tempo. Contudo, a variação entre microestados deve alcançar o equilíbrio para que o sistema seja considerado apto para análises. Se o sistema estiver com algum parâmetro desregulado, ou se as estruturas foram modeladas de maneira errônea, o sistema não consegue alcançar o equilíbrio. Para verificar se o sistema se manteve relativamente estável ao longo da trajetória foram avaliados:

**RMSD:** cálculo do desvio da raiz quadrática média (RMSD) compara a posição dos átomos em cada frame da trajetória e é definido como:

$$RMSD = \sqrt{\frac{1}{N} \sum_{i=1}^N |r_i - r_0|^2} \quad 3.24$$

em que, N é o número de átomos da estrutura,  $r_0$  é a coordenada do átomo i na posição de referência e  $r_i$  é a posição atual desse mesmo átomo no momento do cálculo;

**Movimentação da hélice S4:** foi calculada a distância entre os carbonos alfa da arginina R1 da S4 e da fenilalanina da hélice S2 ao longo da trajetória;

**Abertura do poro:** analisado pelo perfil de hidratação do poro que projeta a média de moléculas de água nas coordenadas do eixo Z relativas ao poro.

#### 3.4.2 Análise das distribuições

A seguir foi analisada a distribuição de ligantes no sistema que serve de *input* para as equações discutidas na seção 3.2. Todas as análises envolvendo interação ligante-proteína foram calculadas durante o equilíbrio, intervalo de tempo em que a maior parte dos ligantes se encontra em equilíbrio no reservatório e, conseqüentemente, em contato com a proteína:

**Distribuição:** a posição dos ligantes no sistema é mapeada a cada quadro da trajetória, e é classificada como próximo à proteína, dentro da membrana ou dentro da solução aquosa;

**Interface Proteica:** delimitada considerando os centros geométricos dos ligantes a uma distância  $r^*$  da proteína. Esse raio equivale ao maior valor de densidade obtida considerando todos os  $r$  de distância do canal.

**Número médio:** o número médio  $\langle n \rangle$  de ligantes em dada região do sistema foi calculado como a soma de todos os resultados possíveis do sistema, ponderando cada resultado por sua probabilidade correspondente:

$$\langle n \rangle = \sum p(n) \times n \quad 3.25$$

**Densidades tridimensionais:** as densidades tridimensionais dos ligantes ( $\rho(\mathbf{R})$ ) foram obtidas por meio de mapas de densidade gerados pela ferramenta do VMD *VolMapTool*. Esse *plugin* divide o sistema em *grids* (cubos) de  $1\text{\AA}^3$ , que foram analisados pelo pacote *GridDataFormats*<sup>89</sup>. Para observar o perfil de densidade no eixo transmembrânico Z foi calculado para cada *grid*:

$$\rho(z) = \sum_x \sum_y \rho_{xyz} \quad 3.26$$

em que,  $\rho_{xyz}$  corresponde aos índices de cada cubo em x, y e z;

### 3.4.3 Análise do equilíbrio entre estados

Para calcular as funções de partição de cada estado e avaliar o impacto no equilíbrio entre estados na presença dos ligantes, é preciso obter as constantes de ligação  $K(n)$  calculadas a partir das probabilidades de ocupância  $p(n)$ . Todavia, as  $K(n)$  estimadas possuem valores absolutos elevados, portanto, para evitar erros numéricos e para evitar possíveis problemas de amostragem, optou-se por avaliar o impacto do equilíbrio entre estados por meio de um *toy model*. Com esse tipo de

modelo, obtém-se uma resposta mais robusta já que ele trabalha com valores relativos.

**Probabilidade de ocupância:** dentro do volume do sítio de interação, foi calculado a fração de tempo em que o sítio estava ocupado durante a simulação por  $n$  ligantes, obtendo, assim, a probabilidade de ocupação do sítio  $p(n)$  para um ou mais ligantes. Os erros de amostragem foram tratados com pseudocontagem, em que uma fração  $\lambda=0,05$  é adicionada igualmente entre todos os estados na hora de calcular a probabilidade;

**Toy model:** valores relativos retirados dos sistemas foram usados nas equações 3.13 e 3.14 para gerar curvas de probabilidade de ocupância. O parâmetro de energia foi ajustado de forma que as curvas se sobrepusessem da melhor maneira possível às  $p(n)$  retiradas das simulações;

**Função de partição:** constantes de ligação obtidas no tópico anterior foram usadas na equação 3.15;

**Projeção de  $\rho_o(V)$ :** as projeções da probabilidade de abertura do canal foram feitas usando a equação 3.23 para o intervalo de -200 a 20mV. Os valores de  $V_{1/2}$  e  $\Delta Q$  para o equilíbrio sem ligantes são de -21.9mV e  $3.85e_o^{33}$ , respectivamente.

#### 3.4.4 Análise das propriedades da membrana

Por fim, os efeitos dos anestésicos na membrana foram analisados em sistemas com e sem canal na membrana. No caso de sistemas com proteína, as análises foram divididas em duas regiões, uma afastada do canal (distância  $> r^* = 5\text{\AA}$ ) e a outra na interface membrana-proteína (raio de  $5\text{\AA}$  da proteína).

**Parâmetro de ordem do lipídio:** o critério de parâmetro de ordem do lipídio ( $S_{CH}$ ) oferece informações sobre a ordenação dos lipídios e é descrito pela equação:

$$S_{CH} = \left\langle \frac{3\cos^2\theta - 1}{2} \right\rangle \quad 3.27$$

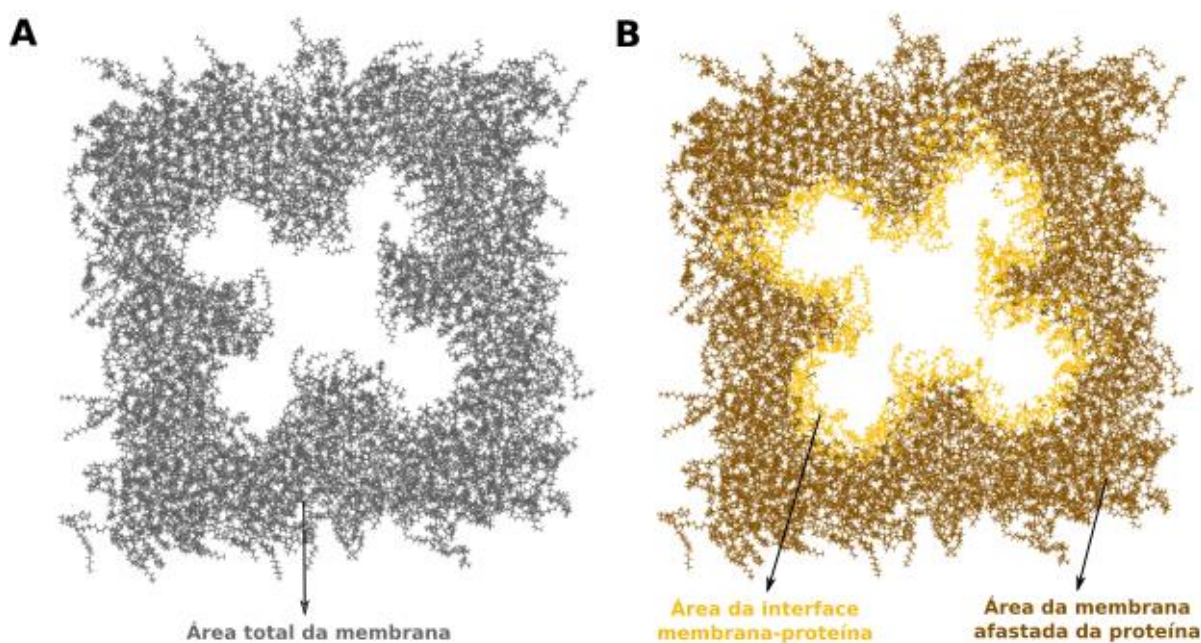
que mostra a orientação do vetor (ângulo  $\theta$ ) das ligações C-H das cadeias alifáticas do fosfolipídio em relação a um eixo da bicamada, nesse caso o eixo Z, considerando a média de todos os lipídios, para todo o tempo de amostragem<sup>90</sup>. Valores de  $S_{CH}$  variam de -0.5 a 1, sendo que valores próximos a 1 representam nível de organização maior, e valores menores estão relacionados a graus mais desorganizados de lipídios.

**Área por lipídio:** parâmetro foi calculado nas simulações como:

$$A_L = \frac{A_{membrana}}{N_{Lipidios}}$$

3.28

Como a inserção do canal deixa o formato da membrana desuniforme, a  $A_{membrana}$  das regiões da interface e afastada da proteína foram obtidas através de um *grid* tridimensional gerado pela ferramenta *volmap* do VMD que levou em conta o posicionamento dos lipídios ao longo do equilíbrio. Os valores do *grid* em x e y foram então somados para obter a  $A_{membrana}$  e prosseguir para o cálculo da  $A_L$ .



**Figura 13 Área da membrana.** (A) Área total da membrana (em cinza) dos sistemas com proteína. Os lipídios próximos à proteína possuem um potencial diferente dos demais por conta da interação direta com o canal. Portanto, para calcular as propriedades dessa membrana com mais acuracidade, ela é dividida em duas regiões: (B) interface membrana-proteína (em amarelo) e região afastada da proteína (em marrom).

## 4. Resultados e discussão

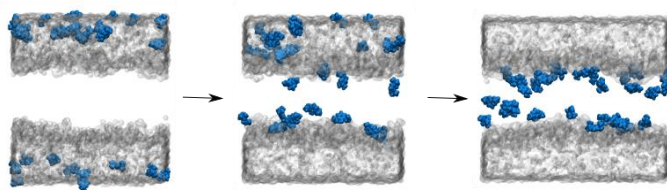
Como descrito na metodologia, as simulações de dinâmica molecular permitem a avaliação de interações intermoleculares microscópicas que, apesar de não possuírem escala para reproduzir respostas complexas, como cascatas de sinalização, esclarecem o comportamento de estruturas com o seu arredor e evidenciam regiões de interação. Essas evidências podem ser corroboradas com dados experimentais e, conseqüentemente, auxiliar a elucidação de mecanismos de ação tão complexos como o de pequenos ligantes.

### 4.1 Propriedades da membrana

Como o objetivo principal do trabalho é avaliar a ação direta de anestésicos com os canais Kv1.2, é primordial avaliar o comportamento dos fármacos na membrana para descartar modificações da proteína via efeitos indiretos.

O estudo de Arcario *et al.* 2014<sup>84</sup> mostrou que a presença dos anestésicos não parece perturbar a integridade estrutural de uma membrana tipo POPC, considerando densidade atômica, parâmetro de ordem, área por lipídio, potencial elétrico e perfil de estresse lateral.

Além disso, essa pesquisa e a de Hansen *et al.* 2013<sup>91</sup> identificaram que tanto o sevoflurano quanto o propofol se posicionam na interface entre o grupo fosfato e as caudas apolares do lipídio. Essa região fornece tanto um ambiente hidrofóbico, como grupos polares que podem interagir com o grupo éter do sevoflurano e o grupo hidroxila do propofol. O comportamento das simulações usadas nesse trabalho foi similar: após o particionamento na membrana, os anestésicos se mantiveram próximos à interface do grupo fosfato (Figura 14).



**Figura 14 Particionamento de ligantes na membrana.** As 3 etapas mostram o sistema inicial, metade do tempo de simulação e equilíbrio (sevoflurano em azul, solução aquosa na representação *QuickSurf* e membrana oculta para melhor visualização).

Nesse trabalho foram observadas as propriedades da membrana relacionadas com a fluidez e simulações de *flooding* na membrana foram usadas como referência para avaliar os sistemas com o Kv1.2 nas duas conformações. Nessa situação, as propriedades foram calculadas em duas regiões, próximo ao canal e afastado dele para avaliar se a interface com o canal, que já sofre um distúrbio devido à inserção da proteína, é afetada pelos anestésicos ou não.

As propriedades da membrana foram medidas após o particionamento do anestésico na membrana (o tempo variou para cada sistema), e a área por lipídio ( $A_L$ ) foi a primeira a ser calculada. O grau de organização dos lipídios está ligado a essa medida, sendo valores baixos para perfis de lipídios mais rígidos e altos para um grau maior de fluidez.

Considerando toda a região da membrana, tanto os sistemas somente membrana (232 lipídios;  $A_{membrana} = 12063 \text{ \AA}^2$ ) quanto os com canal (426 lipídios;  $A_{membrana} = 22151 \text{ \AA}^2$ ), com e sem anestésico, registraram uma  $A_L$  de  $51.9 \text{ \AA}^2$ . Ao refazer o cálculo separando a membrana em regiões (Tabela 6), percebe-se que os valores de  $A_L$  longe do canal são praticamente equivalentes em todos os sistemas e se aproxima do valor médio mencionado previamente. Já a análise na vizinhança da proteína mostra um desvio maior da área que acontece tanto na presença quanto na ausência dos anestésicos, dando indício de que a disposição de lipídios tende a um perfil desorganizado em virtude da interação com a proteína.

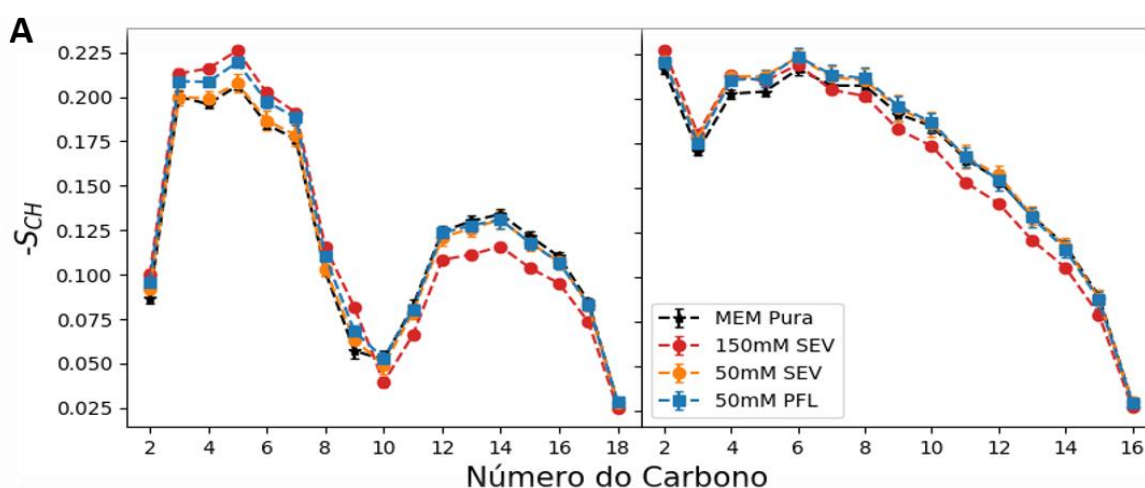
**Tabela 6 Valores da área por lipídio ( $A_L$ ) em  $\text{\AA}^2$ .** Análise foi separada em duas regiões: ‘afastado’ contemplando todos os lipídios a mais de 5 angstroms da proteína; e ‘perto’ para os lipídios dentro de um raio de 5 angstroms da proteína.

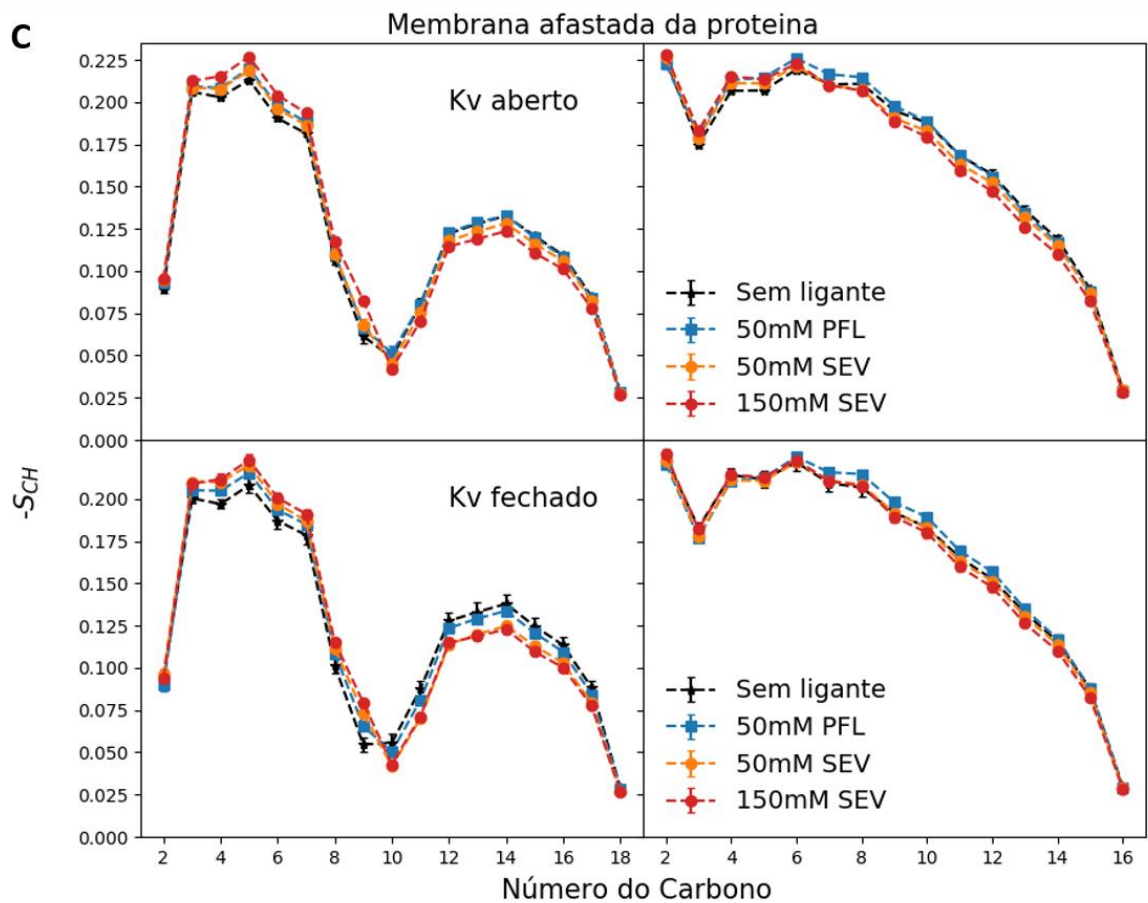
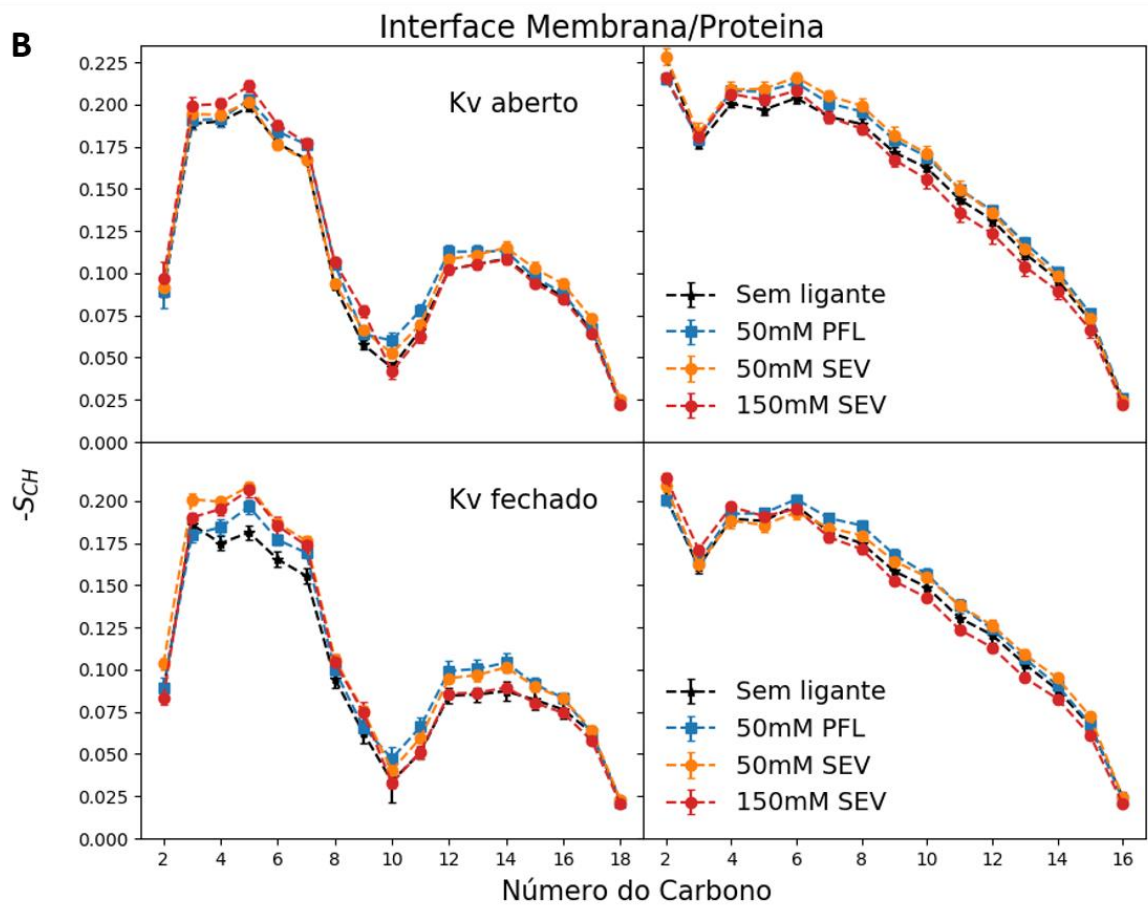
Sistema	Tipo	Região	Nº lipídios	$A_{membrana}$	$A_L$
Kv1.12 aberto	Sem ligante	Afastado	350.9	18320.2	$52.2 \pm 0.7$
		Perto	75.1	3831.5	$51.2 \pm 3.3$
	PFL 50mM	Afastado	351.7	18505.9	$52.6 \pm 0.7$
		Perto	74.2	3670.9	$49.3 \pm 3.0$
	SEV 50mM	Afastado	351.5	18480.9	$52.6 \pm 0.6$
		Perto	74.5	3670.9	$49.4 \pm 2.6$
	SEV 150mM	Afastado	356.7	18865.2	$52.9 \pm 0.7$
		Perto	69.3	3286.5	$47.6 \pm 3.0$

Kv1.12 fechado	Sem ligante	Afastado	350.4	18413.2	52.7±0.5
		Perto	75.6	3738.5	49.5±2.4
	PFL 50mM	Afastado	354.3	18633.2	52.6±0.7
		Perto	71.7	3518.6	49.2±3.0
	SEV 50mM	Afastado	352.3	18425.9	52.3±0.7
		Perto	73.7	3725.9	50.7±3.1
	SEV 150mM	Afastado	359.3	18784.8	52.3±0.6
		Perto	66.7	3366.9	50.7±3.5

Se os anestésicos causam alguma mudança na fluidez da membrana, ela não é aparente observando apenas a área por lipídio dos sistemas. Portanto, outra propriedade foi avaliada: o parâmetro de ordem, que aponta se a estrutura local das cabeças polares ou caudas lipídicas foram afetadas.

Em relação às simulações sem canal, a Figura 15 – A mostra um deslocamento grande dos grupos polar e apolar por 150mM de sevoflurano. Esse resultado, no entanto, é um reflexo da saturação de ligantes em um sistema pequeno, já que o sevoflurano a 50mM não afeta significativamente a estrutura, e observando os gráficos da região afastada (Figura 15 - C), o comportamento a 50mM se repete e para 150mM não há grandes perturbações.







**Figura 15 Parâmetro de ordem ( $-S_{CH}$ ) por carbono da cadeia insaturada (esquerda) e saturada (direita).** (A) Parâmetro retirado das simulações sem canal. Para os demais sistemas, os valores foram registrados considerando duas regiões: afastada (B) e perto do canal (C). Os gráficos apresentam os sistemas com as duas conformações do Kv1.2 sem ligante (em preto) como referência<sup>3</sup>, bem como os respectivos flooding com sevoflurano a 50mM (em laranja) e 150mM (em vermelho), e propofol a 50mM (em azul).

A maior diferença evidenciada por essa análise foi que os lipídios da interface apresentam uma perturbação nos carbonos da porção final da cadeia insaturada com valores de parâmetro de ordem menores em relação ao perfil da membrana pura. No entanto, essa variação ocorre tanto nos sistemas sem ligantes como nos *flooding*, o que, mais uma vez, indica que os lipídios da interface têm um comportamento diferente devido à interação com a proteína e não pela presença dos anestésicos.

Com os dois testes fica evidente que, como já reportado anteriormente<sup>84,91</sup>, a presença dos anestésicos não altera significativamente a fluidez da membrana tipo POPC nas condições avaliadas. Ademais, quando se insere uma proteína nesse tipo de membrana, a interação direta entre proteína e lipídios gera uma zona com lipídios com um perfil mais desorganizado. Em relação ao restante da membrana, as medidas feitas não apontam uma diferença relevante do grau de fluidez desses lipídios entre o grupo controle e o grupo com anestésicos.

## 4.2 Estabilidade das simulações

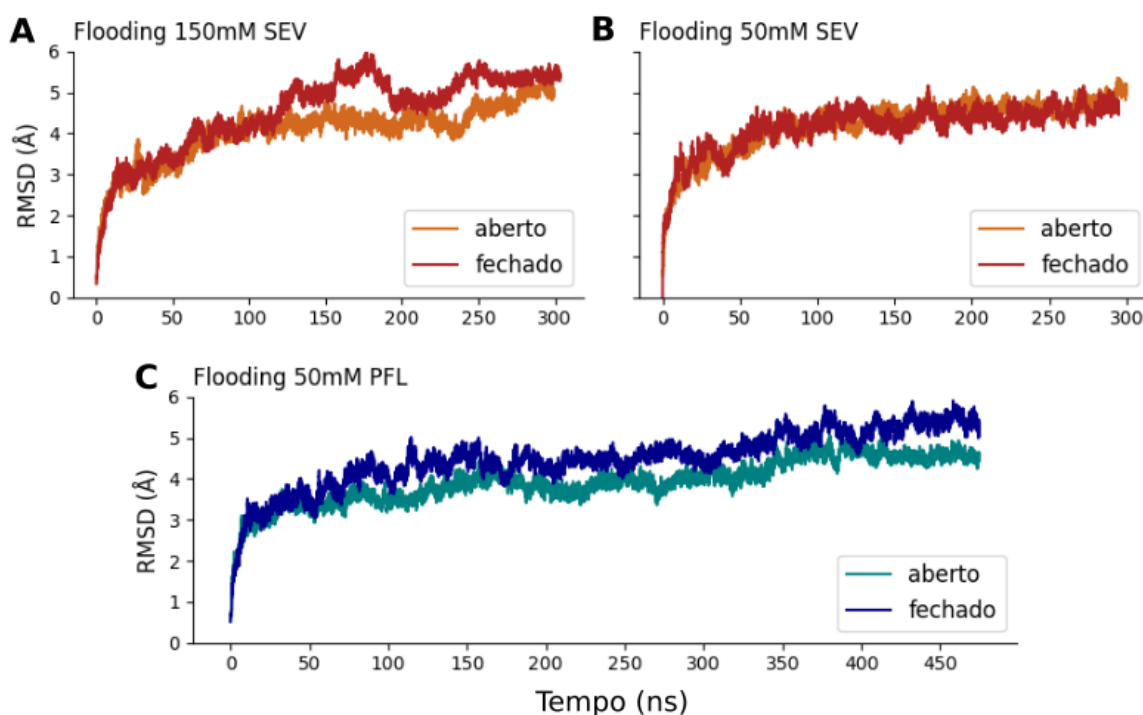
As simulações de *flooding* foram geradas a partir de simulações previamente equilibradas dos canais nas conformações aberta e fechada, mas, mesmo assim, é importante avaliar se há algum tipo de comportamento anormal nos sistemas, já que a adição de ligantes perturba os arredores e a aplicação da teoria nas análises requer que o sistema mantenha suas propriedades e, principalmente, que a conformação da proteína não mude drasticamente.

A primeira característica observada foi a flutuação da estrutura dos canais a partir da análise de RMSD (Figura 16). Após o período de relaxamento inicial do sistema, observa-se que, para os sistemas com 50mM de ligantes, o valor de RMSD da cadeia principal do canal, seja no estado aberto ou no fechado, manteve-se

---

<sup>3</sup> O desvio padrão da referência do canal fechado é maior devido à baixa amostragem da simulação. O gráfico foi apresentado por pertencer ao sistema referência dos *flooding* com canal fechado, mas a comparação foi feita com a referência do canal aberto.

relativamente constante durante a trajetória e não ultrapassou 5Å, configurando um deslocamento condizente com a movimentação esperada da proteína interagindo com seus arredores. Todavia, o sistema com 150mM de sevoflurano apresenta um perfil de RMSD mais perturbado mostrando que o canal tende a se desviar de sua conformação de referência à medida que a concentração de ligantes aumenta no sistema e, portanto, é necessário verificar outras características da estrutura para avaliar se houve mudança na conformação do canal.

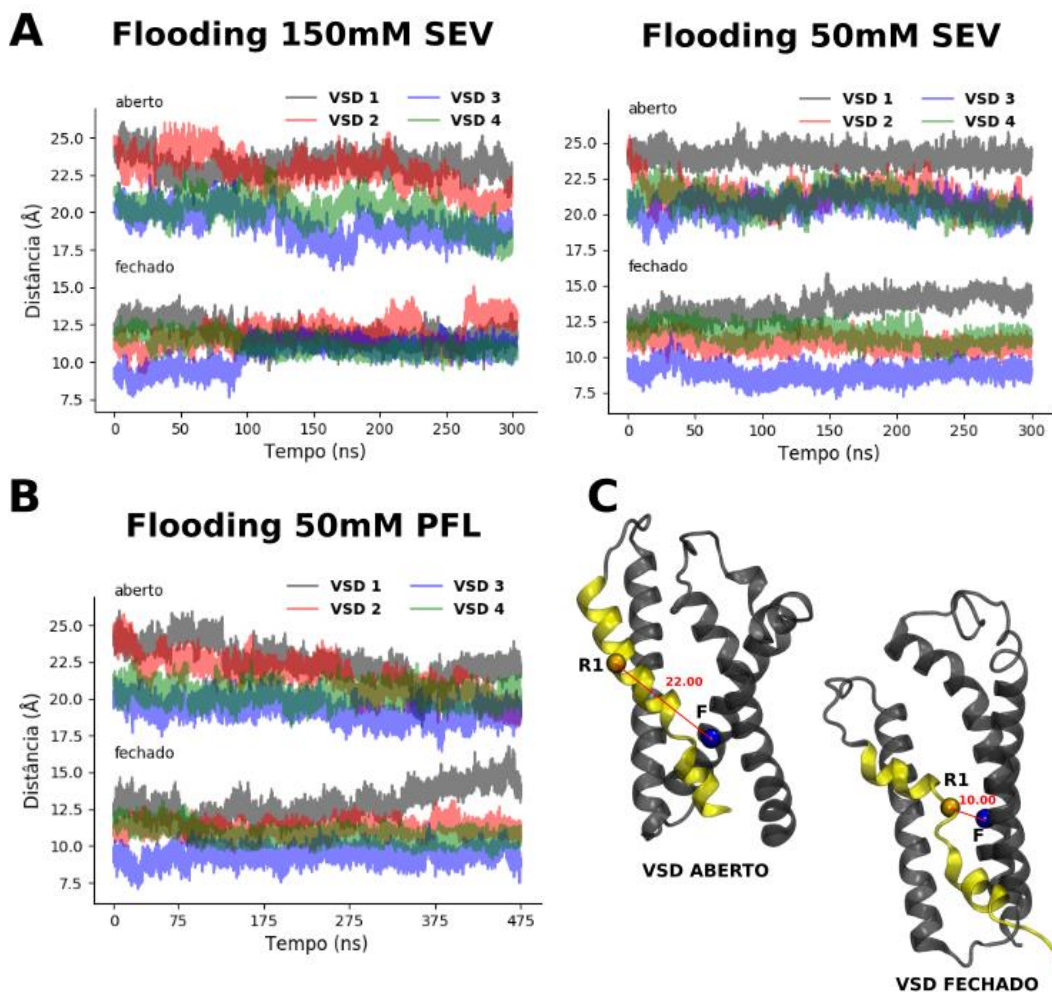


**Figura 16 Perfil de RMSD.** Os cálculos foram feitos para a cadeia principal dos canais das simulações de fld-MD com sevoflurano (SEV), e propofol (PFL) ao longo da trajetória, para os estados aberto e fechado.

Em seguida foram avaliados o deslocamento da S4 e a constricção do poro para determinar se os estados abertos e fechados sofreram algum tipo de mudança de conformação resultante da presença dos ligantes. Como explicado na seção 1.1.3.1, o estado aberto é configurado quando todas as hélices S4 estão no estado ativo, ou seja, elas estão posicionadas mais próximas a região externa com um distanciamento maior entre a primeira arginina da hélice S4 (R1) e o resíduo do centro catalisador (F233), enquanto o estado inativo da S4 é justamente o contrário, a hélice está mais voltada para a região interna e o distanciamento entre os resíduos é menor. Já em relação ao poro, o canal aberto tem uma abertura maior da cavidade, permitindo

a solvatação da região, enquanto o canal fechado possui a cavidade do poro obstruído pelo *gate* hidrofóbico.

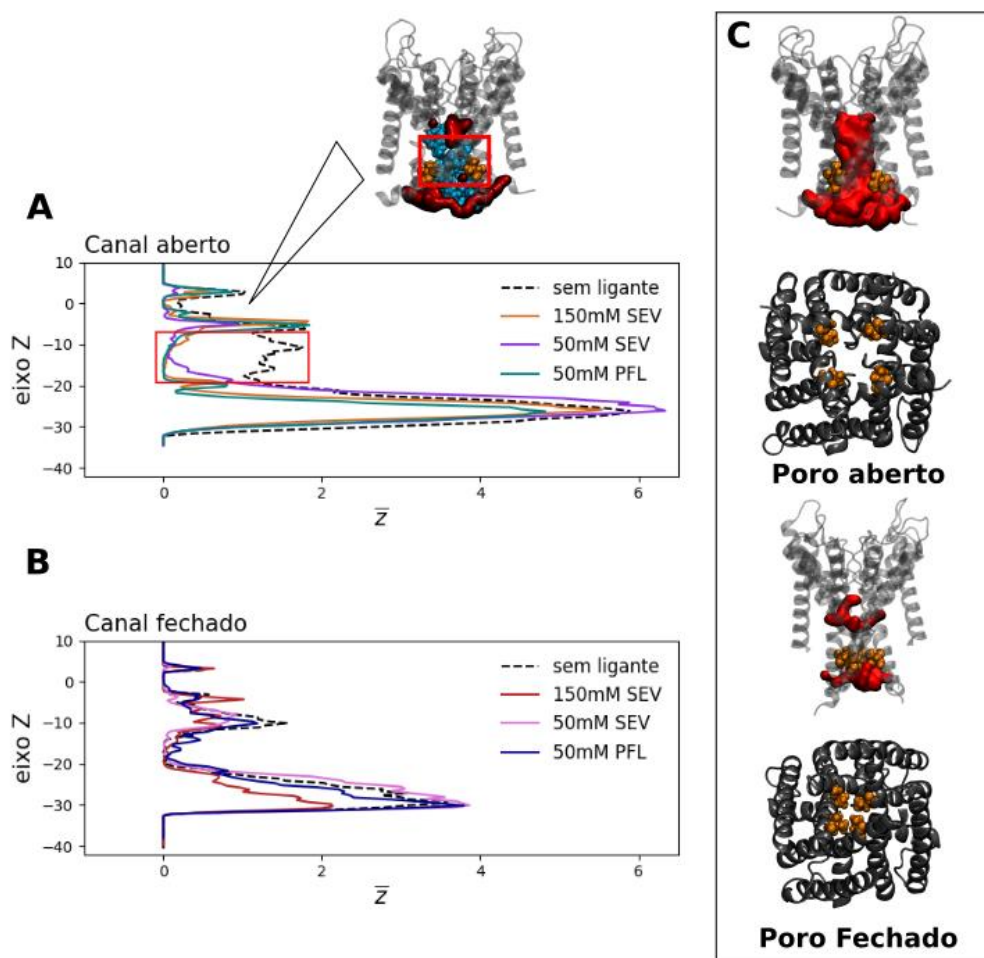
O cálculo da distância entre o resíduo R1 e F233 para as 4 hélices dos canais nos sistemas com SEV mostrou que, mesmo com flutuações, tanto o canal fechado quanto o aberto mantiveram o estado de ativação de seus VSDs ao longo do *flooding*-MD (Figura 17 - A). No caso do sistema com propofol e canal fechado (Figura 17 - B), houve um acúmulo de ligantes tanto ao redor como acima de um dos domínios, o que acarretou em um maior distanciamento da fenilalanina e arginina. Entretanto, a média da distância para essa hélice foi de  $12.8 \pm 1.07$  enquanto, para o canal aberto, o domínio com a menor média foi de  $19.26 \pm 0.66$ . De qualquer modo, não se pode considerar que houve uma mudança de conformação do canal, já que essa alteração de estado também depende da abertura do poro e de que os outros três domínios fossem ativados.



**Figura 17 Estado dos domínios VSDs dos canais nas simulações tipo flooding.** A distância entre a arginina R1 da hélice S4 e a fenilalanina da hélice S2 foram calculadas para os 4 VSDs do Kv1.2.

Para os canais abertos, a média de distância foi de 22 Å, enquanto para o fechado foi de 10 Å. A estrutura média de um VSD no estado ativado e no estado desativado estão exemplificadas em (C).

A integridade dos estados também se manteve ao averiguar o perfil de hidratação do poro. O canal fechado continuou com a passagem bloqueada pelo *gate* da S6 impedindo a passagem de moléculas para o poro. Já o aberto permaneceu com a cavidade aberta, mas no caso das *fld*-MD, a região do poro acabou sendo entupida por moléculas de ligantes. No entanto, esse comportamento não deve ser entendido como um sítio de interação de alta afinidade, e sim como um evento hidrofóbico relacionado à alta concentração inicial do ligante no meio aquoso. Em baixas concentrações, a presença de uma molécula de sevoflurano na cavidade central não impede a condução de íons potássio, já que a constante de afinidade do potássio é superior a do ligante nessa região e o anestésico acaba sendo deslocado, dando preferência à passagem dos íons<sup>69</sup>. Portanto, as moléculas que se encontrarem nessa região não serão contabilizadas nas análises de interação com a proteína.



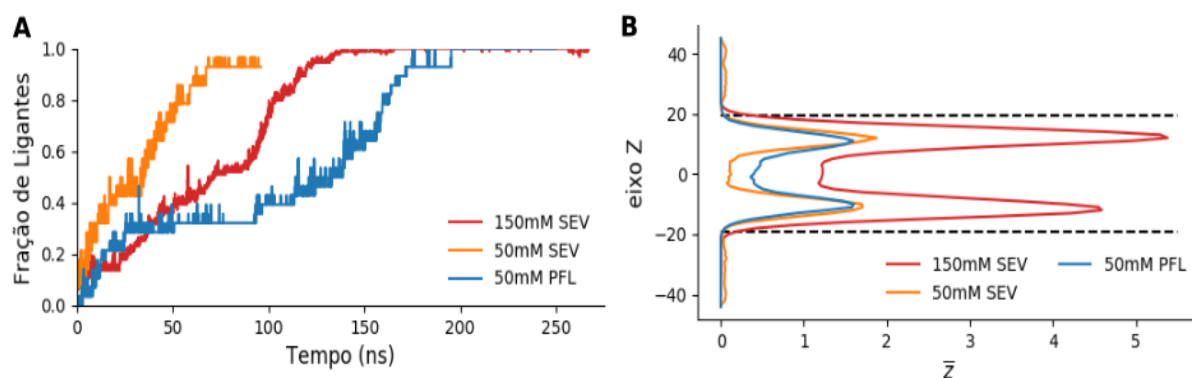
**Figura 18 Perfil de hidratação médio ( $\bar{z}$ ) no eixo Z do poro do canal.** No canal aberto (A), foi observado um entupimento do poro pelos anestésicos (evidenciado em vermelho), principalmente o

propofol que tem uma tendência maior de se agregar. Já no canal fechado (B), o poro hidrofóbico se manteve fechado, impedindo a entrada de água e anestésicos na cavidade. As simulações sem anestésicos foram usadas como controle. (C) Exemplificação da cavidade do poro (em preto) aberta e fechada. Moléculas de água estão representadas em forma de densidade (em vermelho) e os aminoácidos que tampam a cavidade estão evidenciados em laranja.

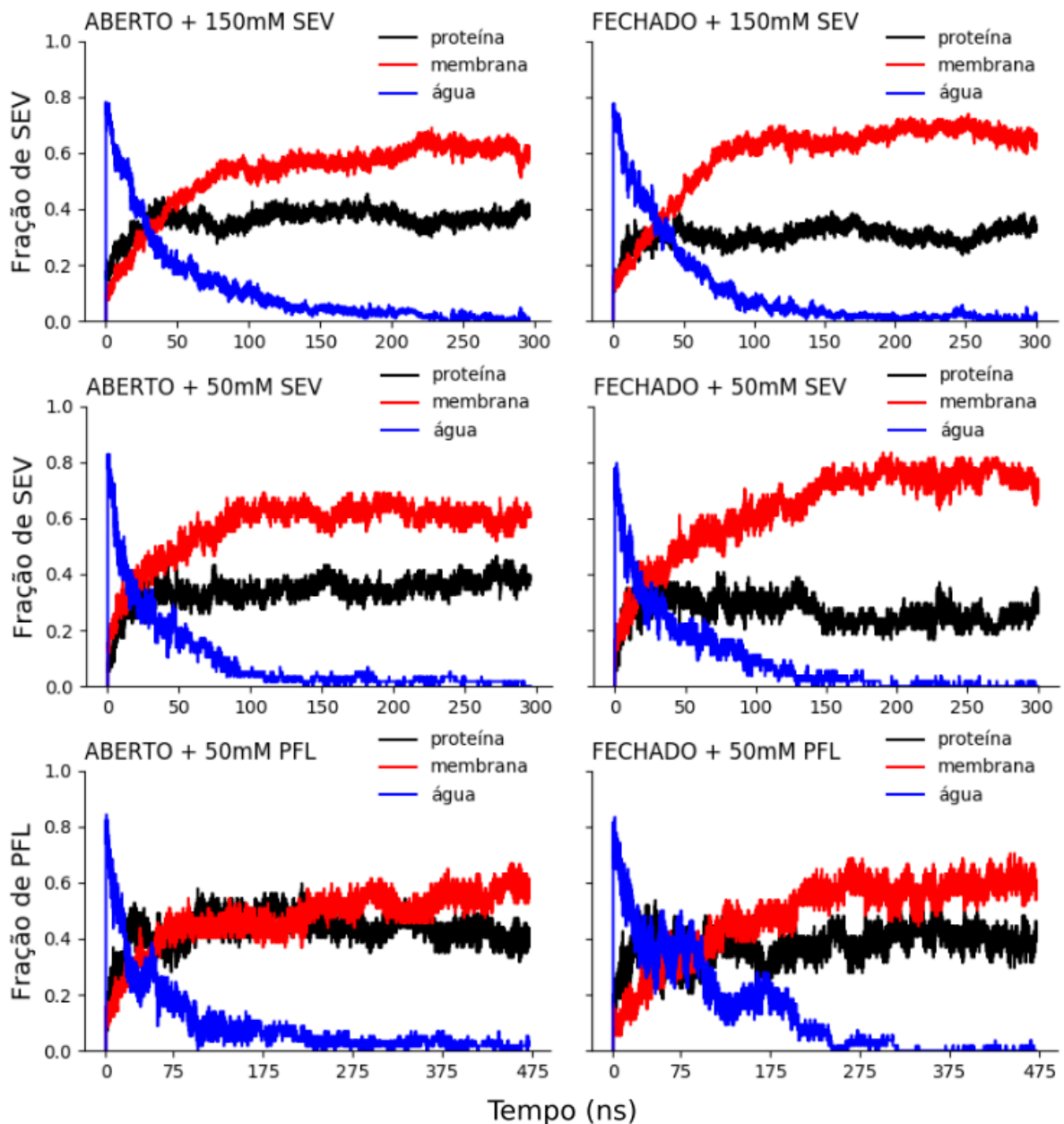
Apesar da perturbação dos canais em alta concentração de ligantes, os estados mantiveram suas características principais, canais fechados continuaram com poro fechado e domínios VSDs desativados e canais abertos preservaram o poro aberto e hélices S4 no estado ativado. Portanto, as estruturas foram consideradas aceitáveis para avaliar o impacto no equilíbrio entre dois estados.

### 4.3 Distribuição dos ligantes

Uma vez que as estruturas foram julgadas estáveis, o próximo passo foi avaliar a distribuição dos ligantes por todo o sistema. Analisando visualmente as simulações contendo somente membrana e anestésicos, repara-se que após o início da simulação, as moléculas eventualmente se deslocaram da fase aquosa para a membrana permanecendo, preferencialmente, abaixo da interface membrana/água (Figura 19 – B), como citado na seção 4.1. Eventos de agregação foram observados tanto na simulação com propofol quanto na de sevoflurano, contudo, o propofol é uma molécula muito lipofílica<sup>91</sup>, logo, as micelas formadas não só foram maiores como demoraram mais para se desfazerem, consequentemente, o tempo para partição total do propofol na membrana foi maior que o do sevoflurano (Figura 19 – A).



**Figura 19** Particionamento de ligantes na membrana dos sistemas sem canal. (A) Fração de ligantes na membrana ao longo do tempo. (B) Média de ligantes ( $\bar{z}$ ) no eixo Z.

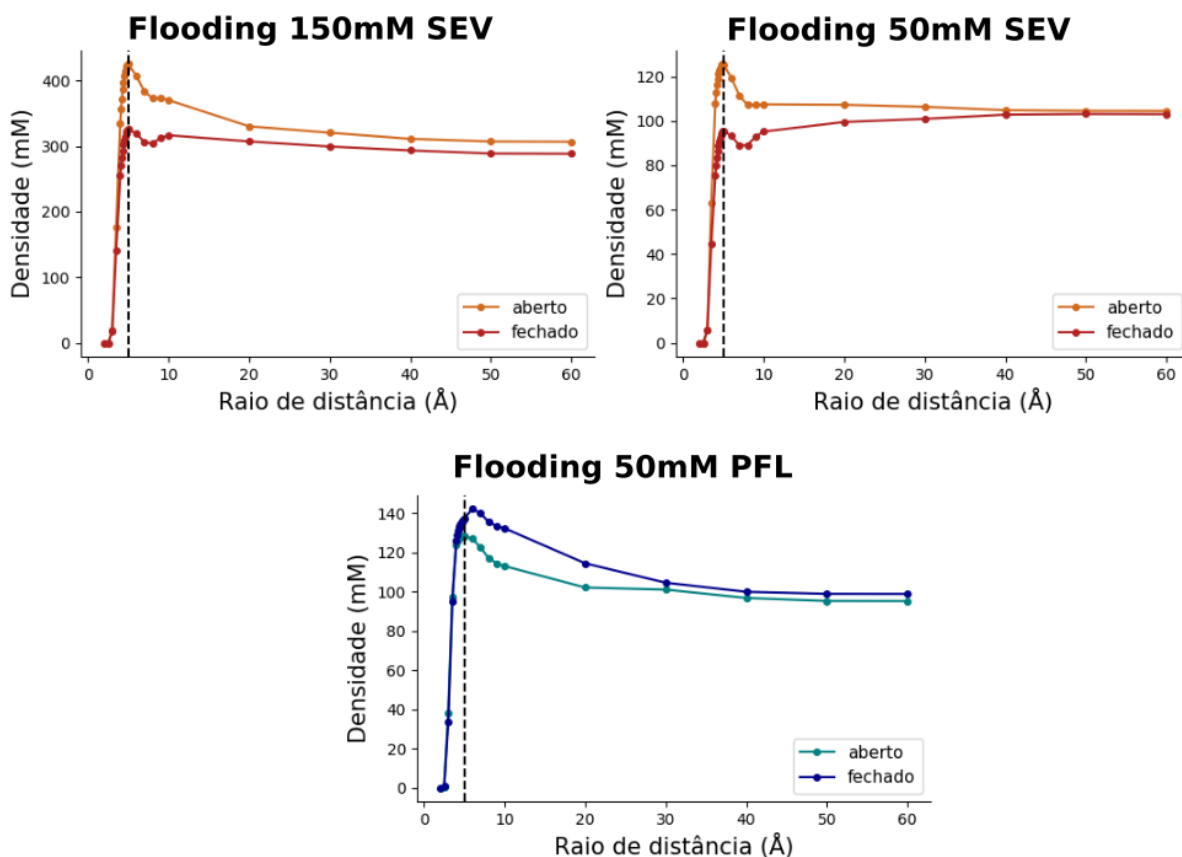


**Figura 20 Distribuição dos anestésicos no sistema.** Fração de sevoflurano (SEV) e propofol (PFL) na solução aquosa (azul), membrana (vermelho) e próximo à proteína (preto) ao longo da trajetória.

O comportamento de partição dos ligantes nas simulações com canal foi similar, sendo que, nesse caso, parte das moléculas passaram a interagir com a proteína de maneira reversível. Mais uma vez foi observada a tendência de agregação do propofol, caso bem visível na simulação com canal fechado que precisou de bem mais tempo que os outros sistemas para que as moléculas saíssem da fase aquosa (Figura 20) e, conseqüentemente, as simulações de propofol foram estendidas.

A fim de comparar os dois estados, o tempo de amostragem deve ser o mesmo e corresponder a um intervalo no qual a distribuição dos ligantes se mantém relativamente constante, sendo que a maior parte dos anestésicos já tenha saído da fase aquosa. O intervalo de amostragem avaliado das simulações com sevoflurano e propofol inicia-se aos 100ns e 250ns, respectivamente. Somente os dados a partir desse período serão considerados para as próximas análises.

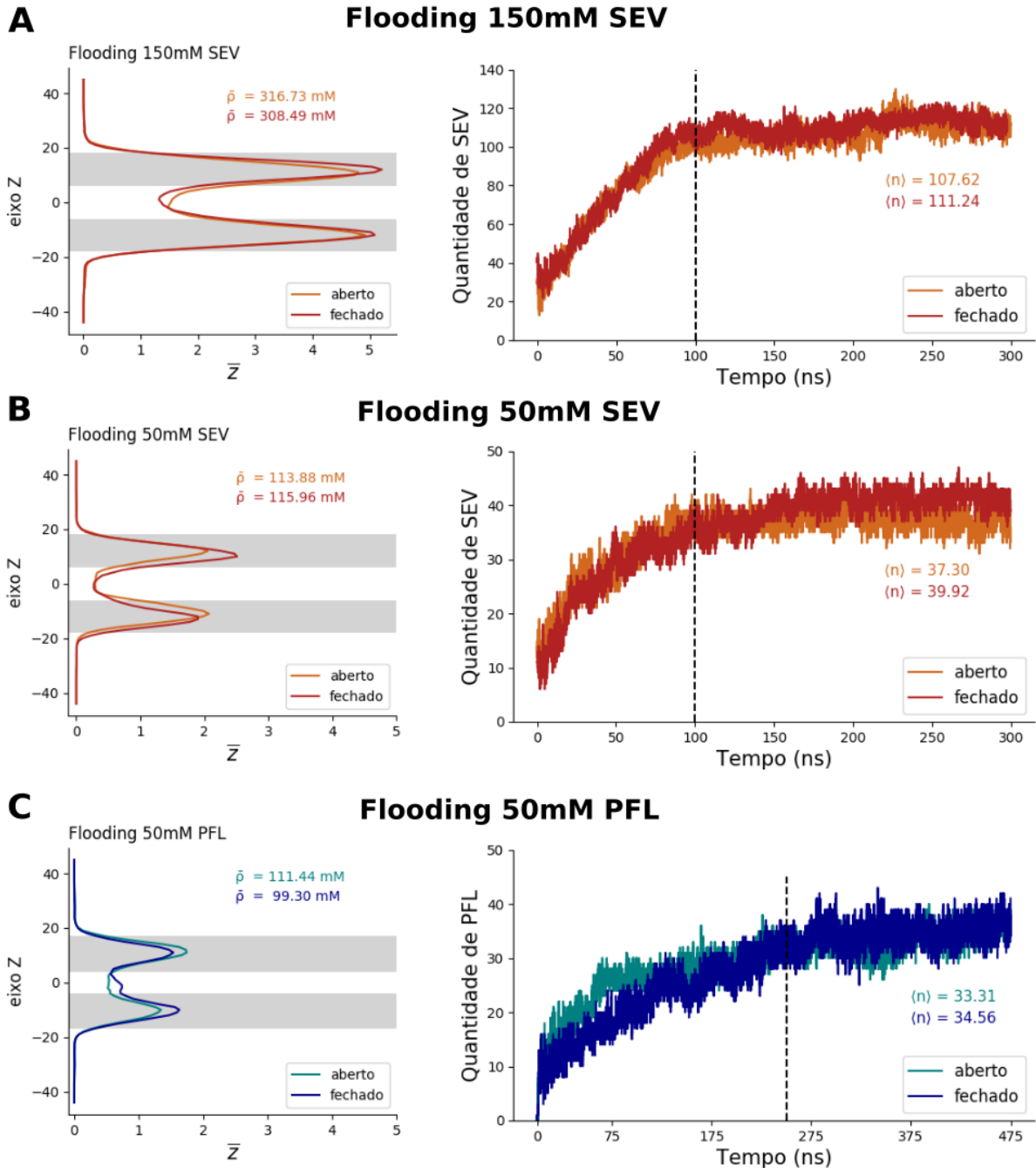
A seguir, a distância de interação com a proteína foi calculada para definir os limites de interação com o canal e, por conseguinte, com a membrana. Avaliando a densidade de ligantes, fica evidente que, para todos os sistemas, a distância de interação mais favorável entre os anestésicos e a proteína é de  $5\text{\AA}$ , destacado por picos de densidade na Figura 21.



**Figura 21 Distância de interação com a proteína.** Densidade de ligantes em função do raio de distância ( $r$ ) da proteína. A linha tracejada aponta o  $r^* = 5\text{\AA}$  onde há um pico de densidade, demarcando a distância em que a ligação dos ligantes com a proteína é mais favorável.

Em seguida, as características do reservatório dos sistemas foram examinadas (Figura 22). A média de ligantes no eixo Z na membrana, ratificada visualmente, evidencia a preferência das moléculas pela região logo abaixo da

interface membrana-água, que condiz com as simulações só membrana-anestésico e dados da literatura<sup>84,91</sup>. Os valores do volume da membrana, número médio de ligantes e densidade estão apresentados na Tabela 7.



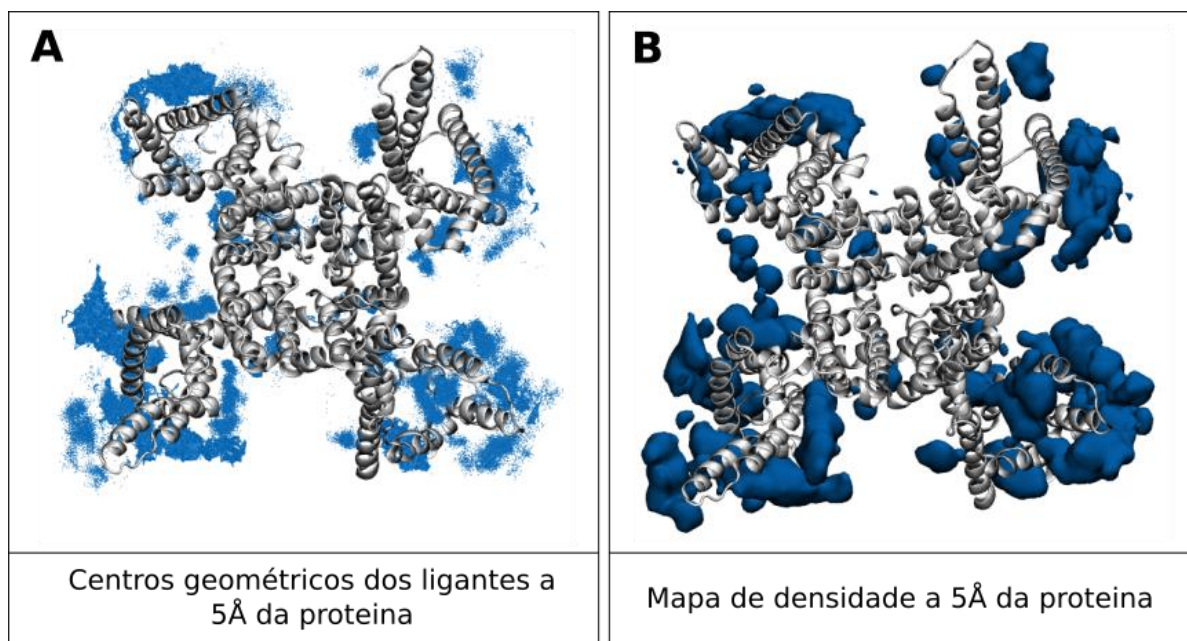
**Figura 22 Distribuição dos ligantes no reservatório.** Gráficos à esquerda mostram a média de ligantes no eixo Z e a densidade de ligantes  $\bar{\rho}$  na membrana no equilíbrio. Em cinza foram traçados os limites do reservatório (região na membrana mais energeticamente favorável para os ligantes). Gráficos à direita apresentam o número de ligantes ao longo do tempo, bem como o número médio de ligantes  $\langle n \rangle$  no equilíbrio (linha preta tracejada demarca o começo do equilíbrio na simulação).



**Tabela 7 Características da distribuição de ligantes na membrana.** Número total de ligantes nos sistemas e número médio  $\langle n \rangle$  no equilíbrio, volume médio da membrana e densidade média de ligantes no volume da membrana no equilíbrio.

Sistema	n total	$\langle n \rangle$	Volume ( $\text{\AA}^3$ )	densidade (mM)
Kv1.2 aberto + 50 mM PFL	57	33.3	585555.2	111.4
Kv1.2 fechado + 50 mM PFL	54	34.6	594570.6	99.3
Kv1.2 aberto + 50 mM SEV	58	37.3	587513.8	113.9
Kv1.2 fechado + 50 mM SEV	54	39.9	585846.4	115.9
Kv1.2 aberto + 150 mM SEV	174	107.6	611234.1	316.7
Kv1.2 fechado + 150 mM SEV	161	111.2	620139.7	308.5

O próximo passo foi usar o registro dos arranjos de ligantes a 5Å da proteína para computar o mapa de densidade espacial de ligantes nessa zona de interação a partir da ferramenta *Volmap* do *VMD* (Figura 23).



**Figura 23 Mapa de densidade na interface proteica.** (A) O centro geométrico dos ligantes próximo à proteína é mapeado a cada quadro da trajetória. (B) Essa informação é usada para gerar um mapa de densidade na interface proteica que delimita o volume do sítio proteico.

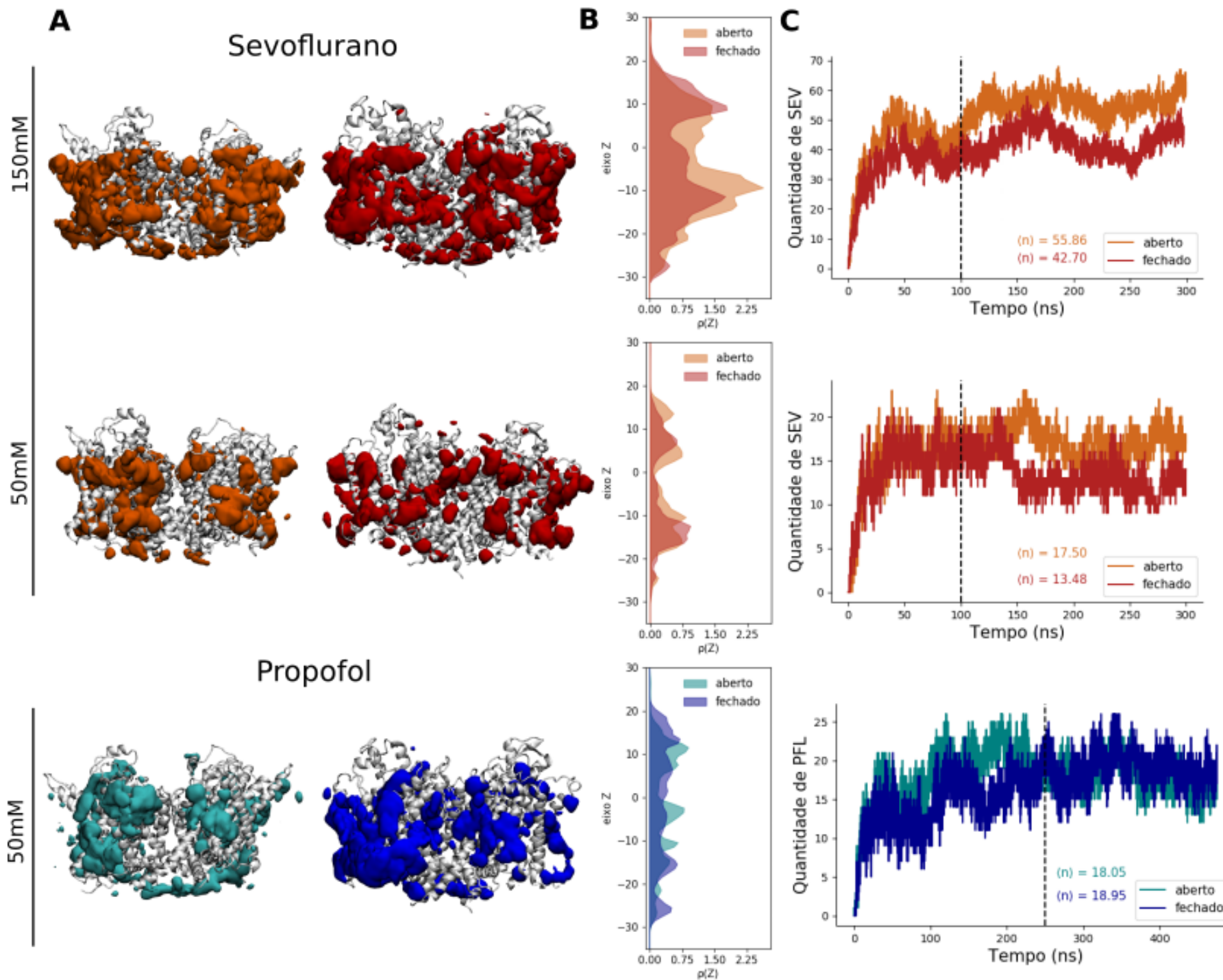
Assim, o mapa de densidade obtido é usado como delimitador do volume do sítio de interação proteico e dentro dele foram calculados o número médio, densidade (Tabela 8) e, posteriormente, as probabilidades de ocupância.

**Tabela 8 Características da distribuição de ligantes na interface proteica.** Número total de ligantes nos sistemas e número médio ( $\langle n \rangle$ ) no equilíbrio, volume médio do sítio proteico e densidade média de ligantes no volume da interface no equilíbrio.

Sistema	n total	$\langle n \rangle$	Volume (Å <sup>3</sup> )	densidade (mM)
Kv1.2 aberto + 50 mM PFL	57	18	233915.8	128
Kv1.2 fechado + 50 mM PFL	54	18.9	229097.6	137.3
Kv1.2 aberto + 50 mM SEV	58	17.5	231510.7	125.5
Kv1.2 fechado + 50 mM SEV	54	13.5	234546.6	95.4
Kv1.2 aberto + 150 mM SEV	174	55.9	218038.8	425.3
Kv1.2 fechado + 150 mM SEV	161	42.7	217564.2	325.8

O painel da Figura 24 resume todos os dados referentes à distribuição de ligantes nos sítios proteicos. As densidades tridimensionais não deixam claro quais regiões são mais importantes para a modulação do canal, pois em altas concentrações a interação com múltiplas regiões da proteína é degenerada (Figura 24 – A e B). A nuvem de densidade do propofol com o canal fechado destaca o acúmulo de ligantes em um dos domínios VSDs do canal mencionado previamente na seção 4.2. Esse evento, muito provavelmente, é o motivo das curvas de ocupância do propofol não se sobreporem ainda mais (Figura 25) e mostra que esse anestésico requer um tempo ainda maior de simulação com ambas conformações para obter distribuições mais robustas.

Outro dado é que mesmo sem considerar os ligantes que entupiram o poro, o número médio de ligantes da conformação aberta, para as duas concentrações de sevoflurano, é maior que para a conformação fechada enquanto o número médio de ligantes de propofol é igual para ambos os estados. Esse resultado revela a preferência dos ligantes por cada estado e, por consequência, como o sevoflurano e o propofol impactam de maneira diferente o equilíbrio entre estados do Kv1.2.



**Figura 24**  
**Mapeamento dos anestésicos no sítio proteico para os sistemas com 150mM e 50mM de sevoflurano e com 50mM de propofol.** (A) Estrutura média da proteína e densidades tridimensionais obtidas no equilíbrio (laranja e ciano – sistema com canal aberto, vermelho e azul – sistema com canal fechado). (B) Perfil da densidade tridimensional no eixo transmembrânico Z. (C) Número de ligantes ao longo da trajetória, bem como o número médio ( $n$ ) no equilíbrio (linha preta tracejada demarca o começo do equilíbrio na simulação).

## 4.4 Impacto no equilíbrio entre estados

Como mostrado anteriormente, apenas o número médio já foi capaz de realçar a diferença da interação dos anestésicos com as conformações aberta e fechada do Kv1.2. Essa distinção é mais uma vez constatada e realçada quando observamos as probabilidades de ocupância para cada estado. Para ambas as concentrações de sevoflurano, a preferência do ligante é pelo estado aberto, enquanto as curvas de probabilidade do propofol estão praticamente sobrepostas (Figura 25). Contudo, as  $\rho(n)$  retiradas das simulações não se mostraram muito eficientes na hora de calcular as constantes de ligação e, conseqüentemente, as funções de partição de cada estado. Isso ocorre porque as  $K(n)$  estimadas em altas concentrações possuem uma ordem de grandeza muito elevada (nos sistemas a 150mM elas chegam na ordem de  $10^{280}$ ), acarretando em erros numéricos na hora de calcular a  $Z_x$ .

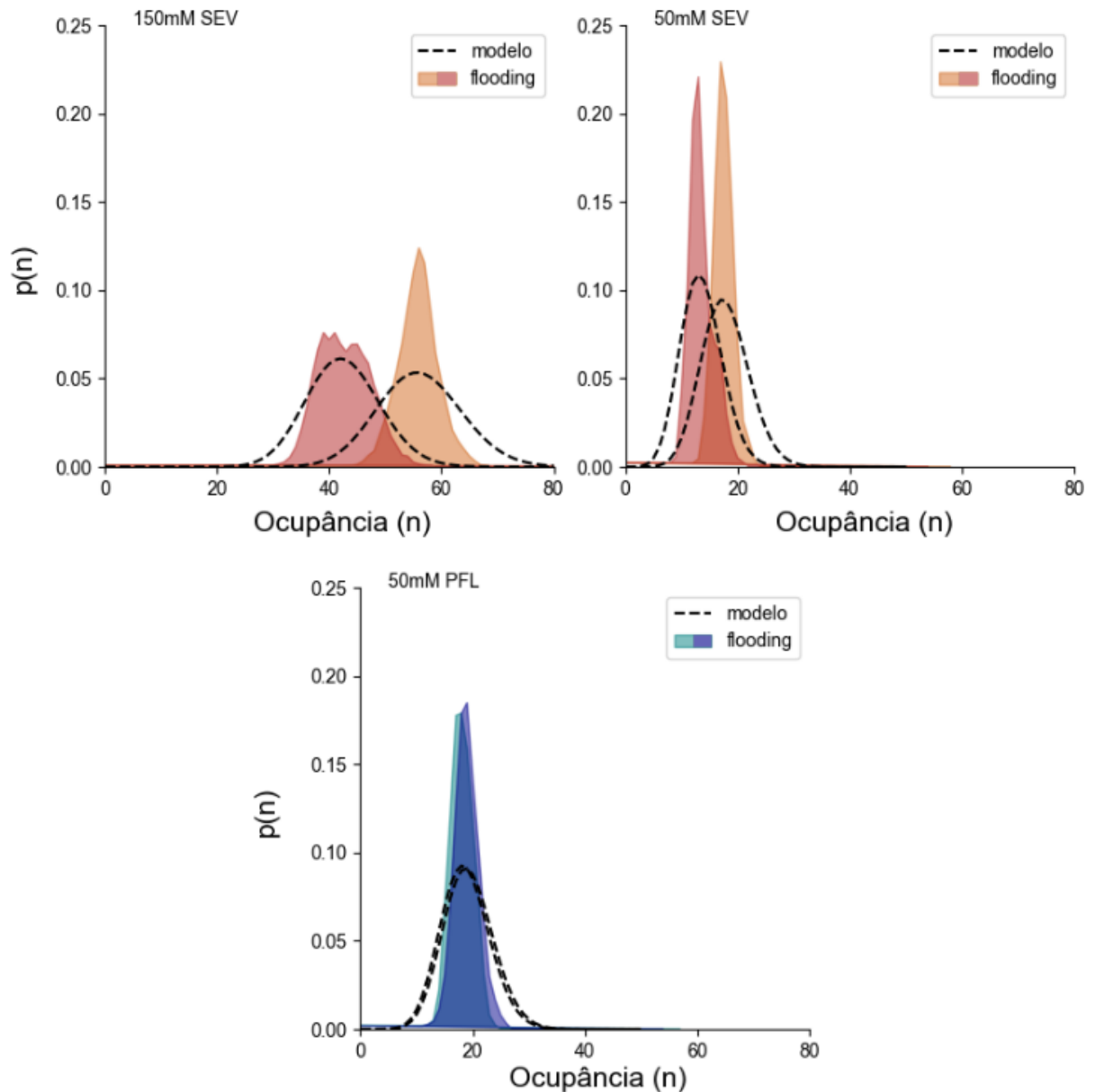
Para contornar esse problema, e como o impacto dos ligantes é um efeito que depende mais da comparação do que da descrição absoluta da interação com o estado aberto e fechado, preferiu-se trabalhar com valores relativos dos dados obtidos nas simulações em um *toy model*. Primeiramente, a  $K(n)$  foi calculada a partir da equação 3.13 usando valores relativos de volume, número de ligantes e energia. Em seguida, a constante foi passada para as equações 3.14 e 3.15 para calcular a probabilidade de ocupância da interface proteica.

**Tabela 9 Valores relativos usados no toy model para calcular a constante de ligação.**

Sistema	Energia (W)	Ligantes (n)	Volume (v)
Kv1.2 aberto + 50 mM PFL	-1.98	57	2.29
Kv1.2 fechado + 50 mM PFL	-2.15	54	2.29
Kv1.2 aberto + 50 mM SEV	-1.85	58	2.31
Kv1.2 fechado + 50 mM SEV	-1.45	54	2.31
Kv1.2 aberto + 150 mM SEV	-1.95	174	2.18
Kv1.2 fechado + 150 mM SEV	-1.55	161	2.18

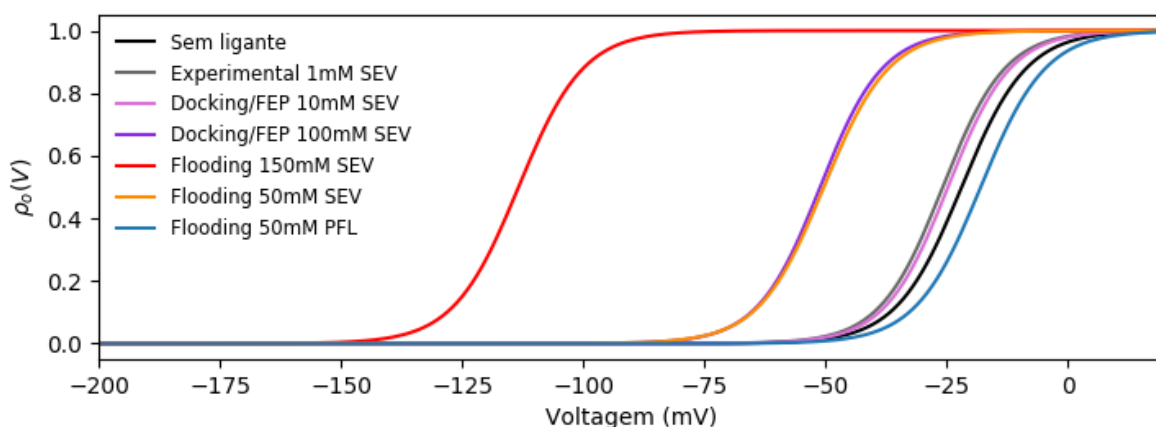
O valor inicial do termo de energia, que representa a energia livre associada com a interação com o sítio proteico, foi de -0.78 (kcal/mol), valor estimado em outro

estudo da ligação do sevoflurano no sistema de 150mM com o canal aberto (dados não publicados), e ele foi alterado até que as curvas de ocupância geradas pelo modelo se sobrepusessem da melhor maneira possível com as  $p(n)$  das simulações. Os valores que produziram os melhores ajustes para as conformações aberta e fechada estão na Tabela 9.



**Figura 25 Probabilidade de ocupância do sítio proteico  $p(n)$ .** As curvas preenchidas correspondem às  $p(n)$  calculadas diretamente das simulações de flooding (laranja e ciano – canal aberto, vermelho e azul – canal fechado). Já as curvas tracejadas equivalem às  $p(n)$  calculadas usando as equações do modelo teórico de forma a sobrepor o máximo possível os gráficos do flooding.

Por fim, o *toy model* calculou a função de partição de cada sistema usando a equação 3.23. A razão das funções de partição foi menor que 1 para os sistemas com sevoflurano e maior que 1 para o sistema com propofol, resultado já esperado em razão das análises anteriores. Por um lado, as simulações conseguiram ratificar que o sevoflurano favorece o estado aberto, por outro, o possível erro de amostragem das simulações de propofol é notado, beneficiando minimamente a energética do ligante com o canal fechado.



**Figura 26** Curvas de probabilidade de abertura dependente de voltagem  $p_o(V)$ , do canal Kv1.2. Probabilidade de abertura do canal para controle experimental sem ligante (em preto), referência experimental com 1mM de sevoflurano (em cinza)<sup>33</sup>, referências *in silico* de *docking* e FEP para 10mM (em rosa) e 100mM (em roxo) de sevoflurano<sup>69</sup>. Por fim, as curvas obtidas usando os dados do flooding com 150mM (em vermelho) e 50mM (em laranja) de sevoflurano e 50mM de propofol (em azul) que apresentaram um deslocamento de -91.4mV, -28.4mV e +3.94mV, respectivamente.

Por último, ao comparar as probabilidades de abertura do Kv1.2 presentes na literatura<sup>33,69</sup> com as estimadas pela metodologia de *flooding* (Figura 26), observa-se, mais uma vez, o deslocamento do  $V_{1/2}$  do canal na presença do anestésico sevoflurano (Tabela 10). É interessante notar que a curva de 50mM-SEV obtida pelo *fld*-MD e a de 100mM-SEV obtida pela metodologia de *docking* e cálculos de energia livre (FEP) se sobrepõem, o que provavelmente indica que a constante diluída estimada na referência é menor que a calculada em altas concentrações. Como a curva 10mM-SEV da metodologia *Docking-FEP* gera quase o mesmo deslocamento que a curva 1mM-SEV obtida por eletrofisiologia, conclui-se que essa metodologia subestimou o valor das constantes, contudo, não se pode afirmar que a predição das constantes em altas concentrações é exata.

**Tabela 10 Deslocamento da  $V_{1/2}$  do Kv1.2 na presença de anestésicos.**

Metodologia	Sistema	$V_{1/2}$ (mV)	Deslocamento
Eletrofisiologia <sup>33</sup>	Sem ligante	- 21.9	---
Eletrofisiologia <sup>33</sup>	1mM SEV	- 25.8	- 3.9
Docking/FEP <sup>69</sup>	10mM SEV	- 24.7	- 2.8
Docking/FEP <sup>69</sup>	100mM SEV	- 51.1	- 29.2
Flooding	150mM SEV	- 113.3	- 91.4
Flooding	50mM SEV	- 50.3	- 28.4
Flooding	50mM PFL	- 17.9	+ 3.94

## 5. Conclusões e Perspectivas

Esse trabalho procurou investigar, usando técnicas computacionais de dinâmica molecular e ferramentas teóricas, como a interação de anestésicos com um sistema reducionista impactam nas propriedades desse sistema e, conseqüentemente, se é possível avaliar a influência de um mecanismo alostérico no equilíbrio entre estados do canal Kv1.2.

Primeiramente foi avaliado se as altas concentrações de ligantes no sistema perturbam a membrana de POPC e o canal, e foi mostrado que de fato, quanto maior a concentração do ligante, maior a perturbação do sistema, mas não a ponto de modificar drasticamente as estruturas. O maior problema encontrado em simular os sistemas com um meio saturado de ligantes foi a formação de aglomerados de moléculas devido o perfil hidrofóbico dos anestésicos. Esse agrupamento resultou no entupimento do poro dos canais no estado aberto, e no caso do propofol, um tempo maior de simulação foi exigido para desfazer esses conglomerados, mas, mesmo assim, houve um erro maior de amostragem para esses sistemas.

Em relação ao equilíbrio entre estados, a literatura já vem apresentando há um bom tempo evidências da modulação direta de anestésicos com canais iônicos. As simulações de dinâmica molecular tipo *flooding* oferecem um modo de avaliar essa interação microscópica e de resolver modelos teóricos de alosteria de forma simples. Tanto o número médio como as curvas de probabilidade retiradas das simulações foram capazes de reproduzir a modulação sugerida do sevoflurano e do propofol com o canal Kv1.2. O sevoflurano possui uma afinidade maior pelo estado aberto e, portanto, favorece a probabilidade de ocorrência dessa conformação. Por outro lado,

o propofol apresenta um perfil similar de interação para o canal aberto e fechado, o que demonstra que a ligação desse anestésico não tem dependência conformacional, todavia como os erros de amostragem geram  $p(n)$  que não são exatamente iguais, o modelo aponta uma preferência sutil pelo estado fechado.

A metodologia de *flooding*-MD em altas concentrações se mostrou eficiente para estudar o modelo alostérico. Ela conseguiu caracterizar bem duas interações diferentes à anestésicos com o canal Kv1.2. Porém, também fica claro que o tratamento dos dados é afetado tanto pela amostragem quanto pela ordem de grandeza das variáveis obtidas pelo método.

Por fim, esse trabalho serve de base para análises mais robustas do modelo alostérico. Seguem alguns pontos que podem dar continuação a esse estudo:

- **Refinamento teórico**

Obter a razão entre funções de partição via constante de ligações é possível, mas ainda não é a abordagem mais simples. Por isso, essa parte do modelo deve ser revisada para adotar uma constante de partição que depende da razão da densidade dos ligantes no sitio com os ligantes fora do sítio que deve facilitar ainda mais a resolução do estado de ligação.

- **Análise para concentrações diluídas**

As concentrações dos anestésicos usadas para gerar anestesia são bem mais baixas do que as apresentadas nesse estudo, logo, é essencial encontrar as constantes de ligações para concentrações fisiologicamente significativas. Para isso, as simulações em altas concentrações podem ser usadas para reconstruir as constantes de afinidade em regimes diluído.

- **Regiões de maior impacto na modulação**

Outro fator a ser considerado é descobrir quais regiões estão contribuindo de fato na dependência conformacional. Para tal, propõem-se transformar os mapas de densidade de altas para baixas concentrações.



- **Outros sistemas canal-anestésico**

Também é de interesse verificar se a metodologia de simulações de dinâmica molecular tipo *flooding* é eficiente para analisar o modelo de alosteria com outros pares de canais e anestésicos.

## 6. Referências Bibliográficas

1. Erkkinen, M. G., Kim, M.-O. & Geschwind, M. D. Clinical Neurology and Epidemiology of the Major Neurodegenerative Diseases. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **10**, (2018).
2. Brown, E. N., Lydic, R. & Schiff, N. D. General anesthesia, sleep, and coma. *N Engl J Med* **363**, 2638–2650 (2010).
3. Alberts, B. *et al. Biologia Molecular da Celula - 5.ed.* (Artmed Editora, 2009).
4. Nelson, D. L. & Cox, M. M. Membranas Biológicas e Transporte. in *Princípios de Bioquímica de Lehninger* (Editora Artmed, 2014).
5. Nelson, D. L. & Cox, M. M. Transporte de Membrana de Pequenas Moléculas e as Propriedades Elétricas das Membranas. in *Princípios de Bioquímica de Lehninger* (Editora Artmed, 2014).
6. Kole, M. H. P. *et al.* Action potential generation requires a high sodium channel density in the axon initial segment. *Nat Neurosci* **11**, 178–186 (2008).
7. Jie Zheng, M. C. T. *Handbook of Ion Channels.* (CRC Press, 2015).
8. 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).
9. Catterall, W. A. Structure and function of voltage-gated ion channels. *Annu Rev Biochem* **64**, 493–531 (1995).
10. Lolicato, M., Riegelhaupt, P. M., Arrigoni, C., Clark, K. A. & Minor, D. L. Transmembrane Helix Straightening and Buckling Underlies Activation of Mechanosensitive and Thermosensitive K2P Channels. *Neuron* **84**, 1198–1212 (2014).
11. Brohawn, S. G., Campbell, E. B. & MacKinnon, R. Physical mechanism for gating and mechanosensitivity of the human TRAAK K<sup>+</sup> channel. *Nature* **516**, 126–130 (2014).
12. Scanziani, M. & Häusser, M. Electrophysiology in the age of light. *Nature* **461**, 930–939 (2009).

13. Sakmann, B. & Neher, E. Patch Clamp Techniques for Studying Ionic Channels in Excitable Membranes. *Annual Review of Physiology* **46**, 455–472 (1984).
14. Armstrong, C. M. & Bezanilla, F. Currents related to movement of the gating particles of the sodium channels. *Nature* **242**, 459–461 (1973).
15. Aggarwal, S. K. & MacKinnon, R. Contribution of the S4 segment to gating charge in the Shaker K<sup>+</sup> channel. *Neuron* **16**, 1169–1177 (1996).
16. Seoh, S.-A., Sigg, D., Papazian, D. M. & Bezanilla, F. Voltage-Sensing Residues in the S2 and S4 Segments of the Shaker K<sup>+</sup> Channel. *Neuron* **16**, 1159–1167 (1996).
17. Pathak, M. M. *et al.* Closing In on the Resting State of the Shaker K<sup>+</sup> Channel. *Neuron* **56**, 124–140 (2007).
18. Guy, H. R. & Seetharamulu, P. Molecular model of the action potential sodium channel. *Proc Natl Acad Sci U S A* **83**, 508–512 (1986).
19. Posson, D. J., Ge, P., Miller, C., Bezanilla, F. & Selvin, P. R. Small vertical movement of a K<sup>+</sup> channel voltage sensor measured with luminescence energy transfer. *Nature* **436**, 848–851 (2005).
20. Jiang, Y., Ruta, V., Chen, J., Lee, A. & MacKinnon, R. The principle of gating charge movement in a voltage-dependent K<sup>+</sup> channel. *Nature* **423**, 42–48 (2003).
21. Stock, L., Souza, C. & Treptow, W. Structural basis for activation of voltage-gated cation channels. *Biochemistry* **52**, 1501–1513 (2013).
22. Lorincz, A. & Nusser, Z. Cell-Type-Dependent Molecular Composition of the Axon Initial Segment. *J. Neurosci.* **28**, 14329–14340 (2008).
23. Robbins, C. A. & Tempel, B. L. Kv1.1 and Kv1.2: similar channels, different seizure models. *Epilepsia* **53 Suppl 1**, 134–141 (2012).
24. 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).
25. 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).

26. Long, S. B., Campbell, E. B. & MacKinnon, R. Crystal Structure of a Mammalian Voltage-Dependent Shaker Family K<sup>+</sup> Channel. *Science* **309**, 897–903 (2005).
27. Treptow, W. & Tarek, M. K<sup>+</sup> Conduction in the Selectivity Filter of Potassium Channels Is Monitored by the Charge Distribution along Their Sequence. *Biophysical Journal* **91**, L81–L83 (2006).
28. Hackos, D. H., Chang, T.-H. & Swartz, K. J. Scanning the intracellular S6 activation gate in the shaker K<sup>+</sup> channel. *J Gen Physiol* **119**, 521–532 (2002).
29. Webster, S. M., Del Camino, D., Dekker, J. P. & Yellen, G. Intracellular gate opening in Shaker K<sup>+</sup> channels defined by high-affinity metal bridges. *Nature* **428**, 864–868 (2004).
30. Souza, C. S., Amaral, C. & Treptow, W. Electric fingerprint of voltage sensor domains. *Proc Natl Acad Sci U S A* **111**, 17510–17515 (2014).
31. Kobertz, W. R. & Miller, C. K<sup>+</sup> channels lacking the ‘tetramerization’ domain: implications for pore structure. *Nat Struct Biol* **6**, 1122–1125 (1999).
32. Bjelkmar, P., Niemelä, P. S., Vattulainen, I. & Lindahl, E. Conformational Changes and Slow Dynamics through Microsecond Polarized Atomistic Molecular Simulation of an Integral Kv1.2 Ion Channel. *PLOS Computational Biology* **5**, e1000289 (2009).
33. 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).
34. 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).
35. Jensen, M. Ø. *et al.* Mechanism of voltage gating in potassium channels. *Science* **336**, 229–233 (2012).
36. 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).

37. Tao, X., Lee, A., Limapichat, W., Dougherty, D. A. & MacKinnon, R. A Gating Charge Transfer Center in Voltage Sensors. *Science* **328**, 67–73 (2010).
38. Blunck, R. & Batulan, Z. Mechanism of electromechanical coupling in voltage-gated potassium channels. *Front Pharmacol* **3**, 166 (2012).
39. Chowdhury, S., Haehnel, B. M. & Chanda, B. Interfacial gating triad is crucial for electromechanical transduction in voltage-activated potassium channels. *J Gen Physiol* **144**, 457–467 (2014).
40. Rang, H.P; Dale, M.M. *Farmacologia*. (Editora Elsevier, 2016).
41. Brown, E. N., Purdon, P. L. & Van Dort, C. J. General anesthesia and altered states of arousal: a systems neuroscience analysis. *Annu Rev Neurosci* **34**, 601–628 (2011).
42. Zur Theorie der Alkoholnarkose | SpringerLink. [https://link.springer.com/article/10.1007%2F978-3-642-01978-0\\_64](https://link.springer.com/article/10.1007%2F978-3-642-01978-0_64).
43. Little, H. J. How has molecular pharmacology contributed to our understanding of the mechanism(s) of general anesthesia? *Pharmacol Ther* **69**, 37–58 (1996).
44. Miller, K. W., Paton, W. D. M., Smith, R. A. & Smith, E. B. The Pressure Reversal of General Anesthesia and the Critical Volume Hypothesis. *Mol Pharmacol* **9**, 131–143 (1973).
45. 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).
46. Lever, M. J., Miller, K. W., Paton, W. D. & Smith, E. B. Pressure reversal of anaesthesia. *Nature* **231**, 368–371 (1971).
47. Patel, A. J. *et al.* Inhalational anesthetics activate two-pore-domain background K<sup>+</sup> channels. *Nature Neuroscience* **2**, 422–426 (1999).
48. Bu, W. *et al.* Sites and Functional Consequence of Alkylphenol Anesthetic Binding to Kv1.2 Channels. *Mol Neurobiol* **55**, 1692–1702 (2018).
49. Franks, N. P. & Lieb, W. R. Stereospecific effects of inhalational general anesthetic optical isomers on nerve ion channels. *Science* **254**, 427–430 (1991).

50. Pringle, M. J., Brown, K. B. & Miller, K. W. Can the lipid theories of anesthesia account for the cutoff in anesthetic potency in homologous series of alcohols? *Mol Pharmacol* **19**, 49–55 (1981).
51. 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).
52. Franks, N. P. Molecular targets underlying general anaesthesia. *Br J Pharmacol* **147 Suppl 1**, S72-81 (2006).
53. Herold, K. F., Sanford, R. L., Lee, W., Andersen, O. S. & Hemmings, H. C. Clinical concentrations of chemically diverse general anesthetics minimally affect lipid bilayer properties. *Proc Natl Acad Sci U S A* **114**, 3109–3114 (2017).
54. Pavel, M. A., Petersen, E. N., Wang, H., Lerner, R. A. & Hansen, S. B. Studies on the mechanism of general anesthesia. *Proc Natl Acad Sci U S A* **117**, 13757–13766 (2020).
55. Franks, N. P. & Lieb, W. R. Molecular and cellular mechanisms of general anaesthesia. *Nature* **367**, 607–614 (1994).
56. Tanelian, D. L., Kosek, P., Mody, I. & MacIver, M. B. The role of the GABAA receptor/chloride channel complex in anesthesia. *Anesthesiology* **78**, 757–776 (1993).
57. Krasowski, M. D. & Harrison, N. L. General anaesthetic actions on ligand-gated ion channels. *Cell Mol Life Sci* **55**, 1278–1303 (1999).
58. Barber, A. F., Liang, Q. & Covarrubias, M. Novel activation of voltage-gated K(+) channels by sevoflurane. *J Biol Chem* **287**, 40425–40432 (2012).
59. Herold, K. F. & Hemmings, H. C. Sodium channels as targets for volatile anesthetics. *Front Pharmacol* **3**, 50 (2012).
60. 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).

61. Lioudyno, M. I. *et al.* Shaker-related potassium channels in the central medial nucleus of the thalamus are important molecular targets for arousal suppression by volatile general anesthetics. *J Neurosci* **33**, 16310–16322 (2013).
62. Heurteaux, C. *et al.* TREK-1, a K<sup>+</sup> channel involved in neuroprotection and general anesthesia. *EMBO J* **23**, 2684–2695 (2004).
63. 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).
64. Raju, S. G., Barber, A. F., LeBard, D. N., Klein, M. L. & Carnevale, V. Exploring Volatile General Anesthetic Binding to a Closed Membrane-Bound Bacterial Voltage-Gated Sodium Channel via Computation. *PLoS Comput Biol* **9**, e1003090 (2013).
65. 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).
66. 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).
67. Nury, H. *et al.* X-ray structures of general anaesthetics bound to a pentameric ligand-gated ion channel. *Nature* **469**, 428–431 (2011).
68. Stock, L., Hosoume, J. & Treptow, W. Concentration-Dependent Binding of Small Ligands to Multiple Saturable Sites in Membrane Proteins. *Sci Rep* **7**, 5734 (2017).
69. Stock, L., Hosoume, J., Cirqueira, L. & Treptow, W. Binding of the general anesthetic sevoflurane to ion channels. *PLoS Comput Biol* **14**, e1006605 (2018).
70. Edgington, T. L., Muco, E. & Maani, C. V. Sevoflurane. in *StatPearls* (StatPearls Publishing, 2020).
71. Bryson, H. M., Fulton, B. R. & Faulds, D. Propofol. An update of its use in anaesthesia and conscious sedation. *Drugs* **50**, 513–559 (1995).

72. Brown, B. Sevoflurane: introduction and overview. *Anesth Analg* **81**, S1-3 (1995).
73. Vanommeslaeghe, K. *et al.* CHARMM general force field: A force field for drug-like molecules compatible with the CHARMM all-atom additive biological force fields. *J. Comput. Chem.* **31**, 671–690 (2010).
74. 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).
75. Schuler, L. D., Daura, X. & Gunsteren, W. F. van. An improved GROMOS96 force field for aliphatic hydrocarbons in the condensed phase. *Journal of Computational Chemistry* **22**, 1205–1218 (2001).
76. Kiametis, A. S., Stock, L., Cirqueira, L. & Treptow, W. Atomistic Model for Simulations of the Sedative Hypnotic Drug 2,2,2-Trichloroethanol. *ACS Omega* **3**, 15916–15923 (2018).
77. Verlet, L. Computer ‘experiments’ on classical fluids. I. Thermodynamical properties of Lennard-Jones molecules. *Physical Review* **159**, undefined-undefined (1967).
78. Phillips, J. C. *et al.* Scalable molecular dynamics with NAMD. *Journal of Computational Chemistry* **26**, 1781–1802 (2005).
79. Darden, T., York, D. & Pedersen, L. Particle mesh Ewald - An Nlog(N) method for Ewald sums in large systems. *J. Chem. Phys* **98**, 10089–10092 (1993).
80. Barber, A. F., Carnevale, V., Klein, M. L., Eckenhoff, R. G. & Covarrubias, M. Modulation of a voltage-gated Na<sup>+</sup> channel by sevoflurane involves multiple sites and distinct mechanisms. *Proc Natl Acad Sci U S A* **111**, 6726–6731 (2014).
81. Phillips, R. The Allosterician’s Toolkit. in *The Molecular Switch. Signaling and Allostery* (Princeton University Press, 2020).
82. 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).



83. 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).
84. Arcario, M. J., Mayne, C. G. & Tajkhorshid, E. Atomistic models of general anesthetics for use in in silico biological studies. *J Phys Chem B* **118**, 12075–12086 (2014).
85. 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).
86. Treptow, W. & Tarek, M. K<sup>+</sup> conduction in the selectivity filter of potassium channels is monitored by the charge distribution along their sequence. *Biophys J* **91**, L81-83 (2006).
87. Humphrey, W., Dalke, A. & Schulten, K. VMD: Visual molecular dynamics. *Journal of Molecular Graphics* **14**, 33–38 (1996).
88. Hunter, J. D. Matplotlib: A 2D Graphics Environment. *Computing in Science & Engineering* **9**, 90–95 (2007).
89. Oliver Beckstein *et al.* *MDAnalysis/GridDataFormats: release 0.4.1*. (Zenodo, 2019). doi:10.5281/zenodo.2631429.
90. Piggot, T. J., Allison, J. R., Sessions, R. B. & Essex, J. W. On the Calculation of Acyl Chain Order Parameters from Lipid Simulations. *J. Chem. Theory Comput.* **13**, 5683–5696 (2017).
91. Hansen, A. H. *et al.* Propofol modulates the lipid phase transition and localizes near the headgroup of membranes. *Chem Phys Lipids* **175–176**, 84–91 (2013).