



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de São José do Rio Preto

Mirian Elisa Rodrigues Guerra

Investigação do modo de ação independente de receptores do endocanabinóide
anandamida por dinâmica molecular

São José do Rio Preto

2019

Mirian Elisa Rodrigues Guerra

Investigação do modo de ação independente de receptores do endocanabinóide
anandamida por dinâmica molecular

Tese apresentada como parte dos requisitos para
obtenção do título de Doutora em Biofísica Molecular,
junto ao Programa de Pós-Graduação em Biofísica
Molecular do Instituto de Biociências, Letras e Ciências
Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de
Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto.

Financiadora: CNPQ

Orientador: Prof. Dr. José Roberto Ruggiero

Co-orientador: Prof. Dr. Jorge Chahine

São José do Rio Preto
2019

G934i

Guerra, Mirian Elisa Rodrigues

Investigação do modo de ação independente de receptores do endocanabinóide anandamida por dinâmica molecular / Mirian Elisa

Rodrigues Guerra. -- São José do Rio Preto, 2019

138 p. : il., tabs.

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Araraquara, São José do Rio Preto

Orientador: José Roberto Ruggiero

Coorientador: Jorge Chahine

1. Biofísica Molecular. 2. Anandamida. 3. Dinamica Molecular. 4. Perfil de Pressão Lateral. 5. Umbrella Sampling. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Araraquara. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

Mirian Elisa Rodrigues Guerra

**Investigação do modo de ação independente de receptores do
endocanabinóide anandamida por dinâmica molecular**

Tese apresentada como parte dos requisitos para
obtenção do título de Doutora em Biofísica Molecular,
junto ao Programa de Pós-Graduação em Biofísica
Molecular do Instituto de Biociências, Letras e Ciências
Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de
Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto.

Financiadora: CNPQ

Comissão Examinadora

Prof. Dr. José Roberto Ruggiero
UNESP – São José do Rio Preto
Orientador

Prof. Dr. Manoel de Arcísio Miranda Filho
UNIFESP – São Paulo

Prof. Dr. Pedro Pascutti.
UFRJ – Rio de Janeiro

Prof. Dr. Ronaldo Junio de Oliveira
UFTM – Uberaba

Prof. Dr. Alexandre Sumán de Araújo
UNESP – São José do Rio Preto

São José do Rio Preto

15 de março de 2019

Agradecimentos

Ao meu querido professor, orientador e amigo Prof. Dr. José Ruggiero, que desde 2006 está presente em minha vida transmitindo seus conhecimentos com muita dedicação e carinho. Ao meu igualmente querido co-orientador Prof. Dr. Jorge Chahine pelos conhecimentos e pelo ombro amigo oferecido sempre que precisei.

A Dr. Marcia Perez dos Santos Cabrera que me acompanhou desde o mestrado até o início do doutorado, a qual tenho muita gratidão, foi quem me iniciou no caminho da pesquisa com muita paciência e dedicação.

Aos meus amigos e também técnicos do departamento de física: Barbosa, Bruno e Marcelino (in memoriam).

Aos amigos da Unilago e da Unesp, que me ouviram e me aconselharam durante estes quatro anos.

A minha família que me forneceu o suporte emocional necessário para vencer essa batalha, em especial ao meu amado pai Lucas, que mesmo não estando mais ao meu lado, me ajudou sempre que necessitei, sinto sua falta.

A Cnpq pelo suporte financeiro.

Resumo

A anandamida é uma molécula anfipática que tem papel fundamental nas funções neurofisiológicas, sendo o agonista endógeno dos receptores canabinóides conhecidos como CB1 e CB2, os mesmos receptores dos compostos psicoativos da *Cannabis sativa*. Estudos mostram que a anandamida é capaz de realizar suas funções neurofisiológicas mesmo com seus receptores inativos, sugerindo uma atuação independente de receptores. Essa hipótese aliada com a teoria dos lipídios sugere que a anandamida interaja com os fosfolipídios alterando suas propriedades elásticas que levam a uma abertura ou fechamento das proteínas de membrana que são responsáveis por seu efeito biológico. As propriedades elásticas de uma bicamada lipídica podem ser associadas com seu perfil de pressão lateral, dessa forma, para obtermos informações a respeito do modo de ação independente de receptor investigamos como a anandamida particiona em uma bicamada de DOPC e quais propriedades estruturais e elásticas são alteradas por ela. Os resultados mostraram que a preferência do AEA é particionar na bicamada com seus grupos hidrofílicos voltados para a fase aquosa, na posição próxima ao grupo fosfato e éster e mantendo uma estrutura preferencial estendida, onde sua cauda acíclica fica protegida das moléculas de água no núcleo hidrofóbico da bicamada. A crescente concentração de AEA não é capaz de alterar significativamente propriedades da membrana como, espessura, área por lipídio e parâmetro de ordem, porém altera significativamente o perfil de pressão lateral e seus parâmetros elásticos, representados pelos momentos da pressão lateral. Para compreender se a crescente concentração de AEA é suficiente para fazer uma proteína transitar do seu estado ativo para o inativo, e vice versa, dois modelos foram utilizados, a inclinação cooperativa e Hélice dobrada. Os resultados em ambos modelos mostram que a AEA tem capacidade de ativação das proteínas de membrana, sendo que na concentração aproximada de 1,7 mol% de AEA é capaz de ativar todas as proteínas.

Palavras-Chave: biofísica molecular, anandamida, pressão lateral, dinâmica molecular, umbrella sampling.

Abstract

Anandamide is an amphipathic molecule that plays a fundamental role in neurophysiological functions, being the endogenous agonist of the cannabinoid receptors known as CB1 and CB2, the same receptors of the psychoactive compounds of *Cannabis sativa*. Studies show that anandamide is able to perform its neurophysiological functions even with its inactive receptors, suggesting an independent performance of receptors. This hypothesis allied with the lipid theory suggests that anandamide interacts with the phospholipids by altering its elastic properties that lead to an opening or closing of the membrane proteins that are responsible for its biological effect. The elastic properties of a lipid bilayer can be associated with its lateral pressure profile, so, to obtain information about the receptor-independent mode of action, we investigated how anandamide partitions in a DOPC bilayer and which structural and elastic properties are altered for her. The results showed that the AEA preference is to partition the bilayer with its hydrophilic groups facing the aqueous phase, in the position close to the phosphate and ester group and maintaining an extended preferred structure, where its acrylic tail is protected from the water molecules in the hydrophobic core of the bilayer. The increasing concentration of AEA is not capable of significantly changing membrane properties such as thickness, area by lipid and order parameter, but it significantly alters the lateral pressure profile and its elastic parameters, represented by lateral pressure moments. To understand if the increasing concentration of AEA is sufficient to make a protein transit from its active to inactive state, and vice versa, two models were used, the cooperative slope and folded propeller. The results in both models show that the AEA has the ability to activate the membrane proteins, and in the approximate concentration of 1.7 mol% of AEA is able to activate all proteins.

Keywords: molecular biophysics, anandamide, AEA, lateral pressure, molecular dynamics, umbrella sampling.

Lista de Tabelas

Tabela 1. Especificações das simulações realizadas nesse trabalho.....	61
Tabela 2. Características estruturais da anandamida simuladas em água, Rg é o raio de giro da molécula, AAS é a área acessível ao solvente, d_{N-C} , é a distância média entre o átomo de nitrogênio da AEA ao carbono terminal da cauda, e d_{O-C} é a distância média entre o primeiro átomo de oxigênio da cabeça do AEA com seu carbono terminal.	64
Tabela 3. Nomenclatura dos ângulos diedrais analisados para determinação da estrutura da AEA, estes átomos estão mostrados na figura 15.....	66
Tabela 4. Porcentagens das estruturas encontradas na simulação da anandamida em água. No ambiente aquoso 40,2% das estruturas estão na conformação em U, seguida de 23,4% na estruturação em J, 13,5% na conformação em H e 9% na conformação I. Uma imagem representativa das estruturas estão mostradas na terceira coluna.	67
Tabela 5. Comparação entre os resultados de análise de clusters (uma estrutura típica) obtidos da simulação em água, e os obtidos na referência [172].	68
Tabela 6. Propriedades estruturais da anandamida simuladas em água e da simulação da janela 46 da Umbrella Sampling (janela que representa a posição de mínima energia), onde Rg é o raio de giro da molécula, AAS é a área acessível ao solvente, d_{N-C} , é a distância média entre o átomo de nitrogênio da AEA ao carbono terminal da cauda, e d_{O-C} é a distância média entre o primeiro átomo de oxigênio da cabeça do AEA com seu carbono terminal.	72
Tabela 7. Porcentagens das estruturas encontradas na simulação da janela 46 da US. Nessa janela a molécula de anandamida se encontra completamente inserida dentro da bicamada fosfolipídica, a estrutura mais presente é a estendida, compreendendo 38,4%, seguida da estruturação em J, compreende 27,4%, e 18,1% da estrutura em U e 7,7% da conformação em H. Uma imagem representativa das estruturas estão mostradas na terceira coluna.	73
Tabela 8. Avaliação dos sinais dos pares de ângulos diedrais para as conformações estendida, U, J e J'	75
Tabela 9. Comparação entre os dados obtidos na janela 46 da US e os da referência [174]. Os dados se referem a porcentagem de estruturas encontradas nos 70ns de simulação da janela 46.	76
Tabela 10. Valores médios das mínimas distancias entre os grupos do DOPC, colina (COL), fosfato (FOS), glicerol (GLI) e éster (EST) e água e grupos da anandamida CH ₂ OH e NH, para a janela 46 da US.....	79

Tabela 11. Ligações de hidrogênio entre o DOPC e seus grupos com a água e com a AEA e seus grupos. A primeira parte da tabela mostra o valor absoluto médio de ligações de hidrogênio em cada frame, na parte de baixo da tabela, a porcentagem destas ligações divididas pelos grupos do DOPC e AEA. Em parênteses está mostrado a quantidade média de ligações de hidrogênio feitas por cada molécula de DOPC com a água, ou seja, a razão entre o valor absoluto de ligações de hidrogênio pela quantidade de moléculas de DOPC	79
Tabela 12. Dados de espessura da membrana (d) e área por lipídio (ApL) para a simulação de DOPC e os resultados da literatura.....	86
Tabela 13. Resultados da análise de estruturas para as simulações de equilíbrio, os resultados obtidos na US e pela literatura estão mostrados para facilitar comparações.....	90
Tabela 14. Valores médios de mínima distância entre o grupo CH ₂ OH da anandamida, com os grupos do DOPC, para as diferentes simulações de equilíbrio.....	93
Tabela 15. Ligações de hidrogênio entre o DOPC, AEA e água para as simulações de equilíbrio com diferentes concentrações de anandamida. Os resultados mostrados estão normalizados pela quantidade de moléculas por monocamada.	96
Tabela 16. Porcentagens médias de ligações de hidrogênio por frame para os grupos do DOPC e AEA entre si e com a água. Os valores mostrados na tabela foram obtidos a partir da tabela 15.....	97
Tabela 17. Valores do primeiro e segundo momento, M1 e M2, respectivamente para as simulações com diferentes concentrações de AEA.	104
Tabela 18. Valores do parâmetro alfa para as simulações de equilíbrio com diferentes quantidades de anandamida. Estes resultados foram obtidos para o método Inclinação cooperativa e hélices dobradas. A última coluna se refere a relevância do valor obtido.	106

Lista de Figuras

- Figura 1:** Estrutura química dos principais compostos canabinóides. (modificado de (8)). ... 17
- Figura 2:** Representação da estrutura tridimensional do receptor CB1 inserido no PDB com o código 5TGZ, em azul as hélices, em pink folhas betas e em salmão as voltas..... 18
- Figura 3:** Estrutura química da molécula anandamida e do 2-AG [25] 20
- Figura 4:** Esquema do mecanismo de ação retrogrado da anandamida, modificada da ref. [49]. Em (1) a síntese de endocanabinóide pelo neurônio pós-sináptico, (2) a ligação da anandamida ao receptor canabinóide CB1 no neurônio pré-sináptico – restrição da atividade neuronal, (3) a captação da AEA na fenda sináptica no neurônio pós-sináptico e (4) degradação da AEA pela FAAH. 22
- Figura 5:** Exemplo da pressão lateral em uma bicamada modelo e homogênea, retirada e modificada de [73]. A pressão lateral em uma bicamada não é uniforme, seu comportamento pode ser sintetizado em três regiões. Na região das cabeças fosfolipídicas surge um pico positivo de pressão referente a repulsão eletrostática desses grupos. Na região interfacial entre a região hidrofóbica e aquosa surge um pico negativo de pressão referente a diminuição da área para evitar que moléculas de água passem para o núcleo hidrofóbico. Nas cadeias acílicas surge um pico positivo referente a mobilidade das cadeias e seu volume excluído. 24
- Figura 6:** Ilustração da distribuição de pressão para a bicamada de DOPC medida pelas sondas de pireno (centro) [89] e calculadas em simulações atomísticas (direita) [91]. O desenho mostrando o uso das sondas de pireno foi adaptado da referência (esquerda) [90]. O resultado experimental se refere somente a região das cadeias acílicas, referente a posição aproximada de -1 a 1nm no perfil da PL obtida pela DM. Os resultados são quantitativamente equivalentes, porém restrições do uso da sonda impedem a obtenção de valores de pressão..... 27
- Figura 7:** Curvatura de uma monocamada lipídica com as curvaturas principais $c_1=1/R_1$ e $c_2=1/R_2$. A curvatura média é $c = c_1 + c_2$ e a curvatura gaussiana é dada por $cG2 = c_1c_2$. Ilustração retirada da referência [94]..... 28
- Figura 8:** a) exemplo representativo de como ocorre a pressão lateral em uma bicamada lipídica, a direita da proteína de membrana temos a representação dos fosfolipídios, e a esquerda o comprimento e a direção das setas indicam a magnitude e o sinal da pressão lateral da membrana atuando na proteína. B) O gráfico correspondente da pressão lateral $p(z)$ onde a linha tracejada corresponde a $p=0$. c) Uma fatia da proteína de membrana em dois diferentes estados

aberto (op) e fechado (cl). d) Gráfico da área A da seção transversal da proteína em função da profundidade z.	31
Figura 9: Representação do estiramento da ligação covalente (esquerda), e o potencial de estiramento (direita) para a ligação Nitrogenio-Hidrogenio (N-H).....	35
Figura 10: Princípio da vibração angular (esquerda) e seu respectivo potencial (direita) para os ângulos da ligação N-H.	36
Figura 11: Princípio dos ângulos diedrais próprios à esquerda e o potencial à direita.	37
Figura 12: Estrutura tetraédrica do carbono α (ξ é o angulo entre os planos i,j,k e j,k,l).	37
Figura 13: Esquema bidimensional das Condições Periódicas de Contorno.	39
Figura 14: Geometria e cargas no modelo SPC. (134).....	46
Figura 15: Estrutura dos compostos utilizados nesse trabalho, em a) anandamida, evidenciando no círculo azul o grupo CH ₂ OH e no vermelho o grupo NH, ambos da cabeça e em b) o DOPC.	47
Figura 16: O efeito de Kw no método Umbrella Sampling. Para pequenos valores de Kw ocorre uma amostragem insuficiente dos histogramas, ja para um kw muito grande são necessárias muitas janelas de simulação para obter a sobreposição.....	49
Figura 17: Esquematisação do modelo de inclinação cooperativa, elucidando do raio da proteína e o ângulo de abertura do canal ϕ	56
Figura 18: Esquematisação do modelo das hastes dobradas rígidas, elucidando do raio da proteína e o ângulo de abertura do canal ϕ	57
Figura 19: Configuração inicial da simulação de equilíbrio, em a) imagem lateral e b) vista de topo.	59
Figura 20: Algumas configurações iniciais para as janelas da "Umbrella Sampling", em laranja a representação da janela 1, e em azul da janela 85.	60
Figura 21: Gráficos de Energia Potencial para a simulação em água, em a) para o tempo total de 100ns e b) para o tempo de 50ns, onde a linha vermelha representa o ajuste linear dos dados.	63
Figura 22: Representação do PDB 4AZP, em A) temos o complexo anandamida FABP5 e as moléculas de água em vermelho, em B) somente a estrutura cristalográfica da anandamida e as moléculas de água que a solvatam.....	65
Figura 23: Perfis de energia livre de Gibbs obtidas pela técnica Umbrella Sampling; As diferentes curvas são devido a diferentes tempos de simulações nas janelas, a curva preta, cinza e cinza claro representam o tempo de 10ns, 50ns e 70ns, respectivamente.	71
Figura 24: Histogramas das simulações da Umbrella Sampling para a simulação de 70ns....	72

Figura 25: Gráficos de densidade normalizada, em A) para os DOPC e seus grupos, B) anandamida e o DOPC e C) para a posição relativa dos grupos da AEA e os grupos do DOPC. As cores das curvas representam: em verde o grupo glicina (GLI), em roxo o grupo éster (EST), em cinza o terminal metil (TER), todos referentes ao DOPC, para a AEA temos que a cor rosa representa o grupo CH ₂ OH, amarelo o grupo NH e bordo o carbono terminal (TER).....	77
Figura 26: Visualização da anandamida (rosa) próxima a uma molécula de DOPC (cinza). Os grupos do DOPC estão representados pelas cores: ciano para a colina (COL), laranja para o fosfato (FOS), verde para o glicerol (GLI) e roxo para o éster (EST). Os grupos da anandamida estão representados por pink para o grupo CH ₂ OH e amarelo para o grupo NH. As linhas pontilhadas amarelas representam as ligações de hidrogênio realizadas entre os grupos.	81
Figura 27: Parâmetros de controle para a simulação de DOPC, em A) energia potencial em kJ/mol, e B) Temperatura em K, ambas analisadas nos 100 ns segundos de produção.	84
Figura 28: Perfil de densidade para a simulação de DOPC em água, em A) o DOPC, água e as caudas do DOPC, e em B) os grupos do DOPC.....	85
Figura 29: Densidade de massa normalizada de alguns componentes da simulação para as simulações com diferentes quantidades de AEA. Em preto, resultados para o DOPC, cinza para o núcleo hidrofóbico do DOPC, representado por suas caudas, em azul a água e em rosa hachurado a molécula de anandamida.	88
Figura 30: Parâmetros estruturais da anandamida para as diferentes simulações deste trabalho, em A) valores para o raio de giro (R _g), b) área acessível ao solvente (AAS), C) e D) distancia média entre o nitrogênio e o oxigênio, respectivamente com o carbono terminal da AEA.	89
Figura 31: Densidades normalizadas para os grupos do DOPC e da AEA para as simulações de equilíbrio com diferentes quantidades de AEA. As curvas hachuradas se referem aos grupos da anandamida.	92
Figura 32: Espessura da membrana (d) e área por lipídio (ApL) para as simulações de equilíbrio com diferentes concentrações de AEA.	94
Figura 33: Parâmetro de ordem (SCD) das cadeias acílicas do DOPC para as diferentes concentrações de anandamida.	95
Figura 34: Pressão normal e lateral para as simulações de equilíbrio. A linha inteira representa a pressão lateral, enquanto a tracejada se refere a pressão normal.....	101
Figura 35: Perfil de pressão lateral p(z) para as simulações de equilíbrio com diferentes quantidades de AEA.	103
Figura 36: Momentos da pressão lateral. Em preto os valores para M1, e em azul valores para o M2.....	105

Figura 37: Fração de proteínas ativas por concentração de AEA para os modelos propostos por Cantor, A) Inclinação cooperativa, B) Hélices Dobradas. 107

Lista de Símbolos e Abreviações

$\bar{\kappa}$: modulo de curvatura gaussiana

AAS: área acessível ao solvente

AEA: anandamida

ATB: “Automatic Topology Builder”

c_0 : curvatura espontânea

cAMP: adenosina cíclica monofosfatada

CBD: canabidiol

CG: “Coarse grained”

DAT: proteína transportadora de dopamina

DM: Dinâmica molecular

DOPC: dioleoil fosfatidilcolina

FAAH: enzima amido hidrolase de ácido graxo

gA: gramicidina

GROMACS: “GRONingen MACHine for Chemical Simulation”

GROMOS: “Groningen Molecular Simulation”

M1: Primeiro momento da pressão lateral

M2: Segundo momento da pressão lateral

MscL: canais mecanosensitivos

NAPE: N-araquidonoil fosfatidiletanolamina

PL: Pressão lateral

PME: “Particle Mesh Ewald”

RMSD: “Root Mean Square Deviation”

SNC: Sistema Nervoso Central

SPC: “Simple Point Charge”

TRPV1: receptor transiente vanilloide tipo-1

US: “Umbrella Sampling”

WHAM: “Weighted histogram analysis method”

Δ^9 -THC: delta-9-tetrahydrocannabinol

κ : módulo de curvatura da membrana

Sumário

1. Introdução	16
1.1 Canabinóides	16
1.2 Receptores CB1 e CB2	17
1.3 Endocanabinóides	19
1.3.1 Anandamida (AEA).....	20
1.4 Mecanismo de sinalização entre os receptores CB1 e CB2 e a AEA	21
1.5 Mecanismo de ação independente de receptores	22
1.6 Efeito da pressão lateral nas bicamadas lipídicas.	24
1.6.1 Propriedades Elásticas	28
1.7 Objetivo.....	33
2. Materiais e Métodos	34
2.1 Funções potenciais para as interações entre átomos ligados.....	35
2.2 Funções potenciais para as interações entre átomos não ligados.....	38
2.2.1 Potencial tipo Lennard-Jones	38
2.2.2 Potencial Eletrostático:.....	38
2.3 Condições Periódicas de Contorno	39
2.4 Integração das equações de movimento	40
2.5 Passo do Tempo, SETTLE e LINCS	41
2.6 Minimização de Energia	42
2.7 Restrição de Posição	42
2.8 NVT	43
2.9 NPT	43
2.10 Análises	43
2.11 Topologias.....	46
2.12 Umbrella Sampling	47

2.13 Perfil de Pressão Lateral	50
2.13.1 Inclinação cooperativa.....	55
2.13.2 Hastes Rígidas dobradas.....	57
2.14 Simulações deste Trabalho.....	58
3. Simulação em Água	62
3.1 Conformação AEA.....	63
3.2 Discussão	69
4. Umbrella Sampling.....	70
4.1 Conformações da AEA.....	72
4.2 Posições de Equilíbrio	76
4.3 Interações.....	79
4.4 Discussão.....	81
5. Simulações em Bicamada	83
5.1 DOPC	83
5.1.1 Densidade	85
5.2 BICAMADA + AEAs	87
5.2.1 Densidade	87
5.2.2 Conformação	89
5.2.3 Posição.....	91
5.2.4 Propriedades Globais.....	94
5.2.5 Interações.....	96
5.2.6 Discussão.....	98
6. Pressão Lateral.....	100
6.1 Discussão	108
7. Conclusão	110
Referências	112

APÊNDICE A: Energias Potenciais e Temperatura para as simulações de Equilíbrio.	127
ANEXO A: Protocolo de utilização do software GROMACS-LS	131

1. Introdução

A *Cannabis* é uma planta originária da região central e sul da Ásia, cujo gênero incluem plantas como a subespécie *Cannabis sativa L.*, conhecida como cânhamo, e a *Cannabis sativa*, popularmente conhecida como maconha. O cânhamo não possui efeito psicotrópico e foi uma das primeiras plantas a ser cultivada devido a utilidade de suas fibras, podendo ser utilizado na fabricação de cordas, roupas, papel, calçado, telas de pintura e velas. Já a maconha é mundialmente cultivada devido ao seu efeito psicoativo. [1]

No Brasil, os primeiros resquícios da *Cannabis sativa L.*, vieram nos cordames das embarcações que trouxeram os primeiros portugueses, uma vez que o cânhamo era uma das principais fontes de fibras da época. Já as sementes da maconha surgiram no Brasil por volta de 1549, trazidas pelos primeiros negros escravos da África. Sua utilização recreativa se disseminou entre os negros e índios brasileiros, que inclusive começaram a cultivá-la. [2]

1.1 Canabinóides

Mesmo a maconha (*Cannabis sativa*) sendo uma das drogas mais usadas no mundo, [3,4] seus compostos bioquímicos, chamados de canabinóides, só foram descobertos no final do século 19. O primeiro composto isolado em sua forma pura foi o canabinol [5], sendo erroneamente assumido como responsável pelos efeitos psicoativos da planta [3]. O segundo composto foi extraído em 1963 e foi chamado de canabidiol (CBD) [6] e finalmente em 1964 Gaoni e Mechoulam isolaram o principal composto psicoativo, denominado delta-9-tetrahydrocannabinol (Δ^9 -THC) [7], a estrutura química destes compostos estão mostrados na figura 1.

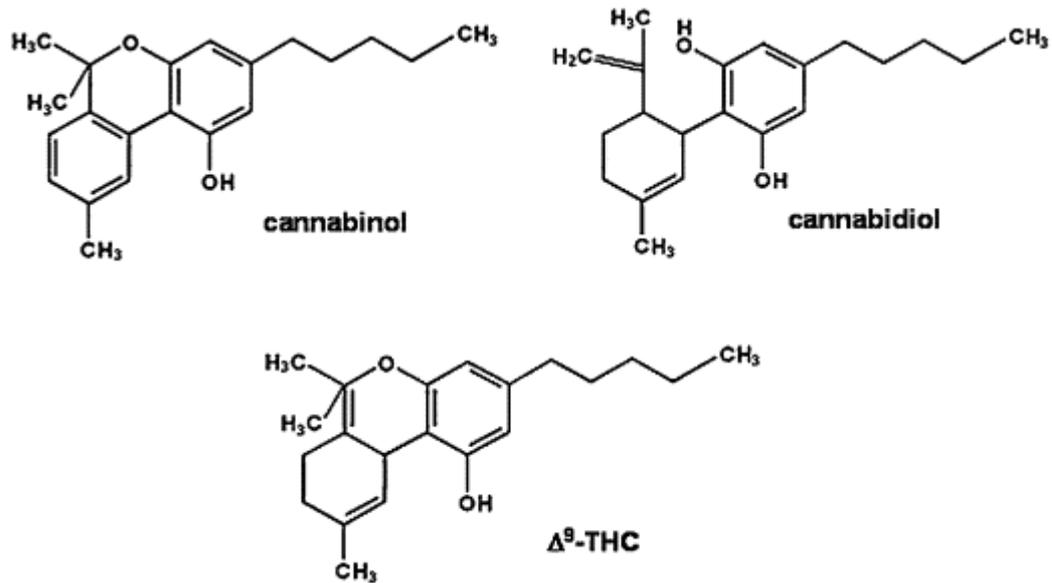


Figura 1: Estrutura química dos principais compostos canabinóides. (modificado de (8)).

Até o momento, são conhecidos mais de 100 fitocanabinóides (canabinóides extraídos da planta *Canabis sativa*), sendo que muitos fármacos foram produzidos baseados nesses componentes [8]. Exemplos desses fármacos são o dronabinol e nabilone, prescritos como antieméticos e estimulantes de apetite para pacientes com AIDS ou submetidos a quimioterapia [3]. O nabilone também é utilizado como uma terapia conjunta para o tratamento de dor crônica associada a fibromialgia e esclerose múltipla [9,10].

1.2 Receptores CB1 e CB2

As investigações moleculares dos compostos canabinóides foram intensificadas após seus receptores serem identificados no começo dos anos 90 [11,12]. Os dois receptores identificados, denominados CB1 e CB2, são encontrados em diferentes tipos celulares, porém são abundantemente expressos em neurônios e células imunes, respectivamente. A figura 2 ilustra a estrutura do receptor CB1.

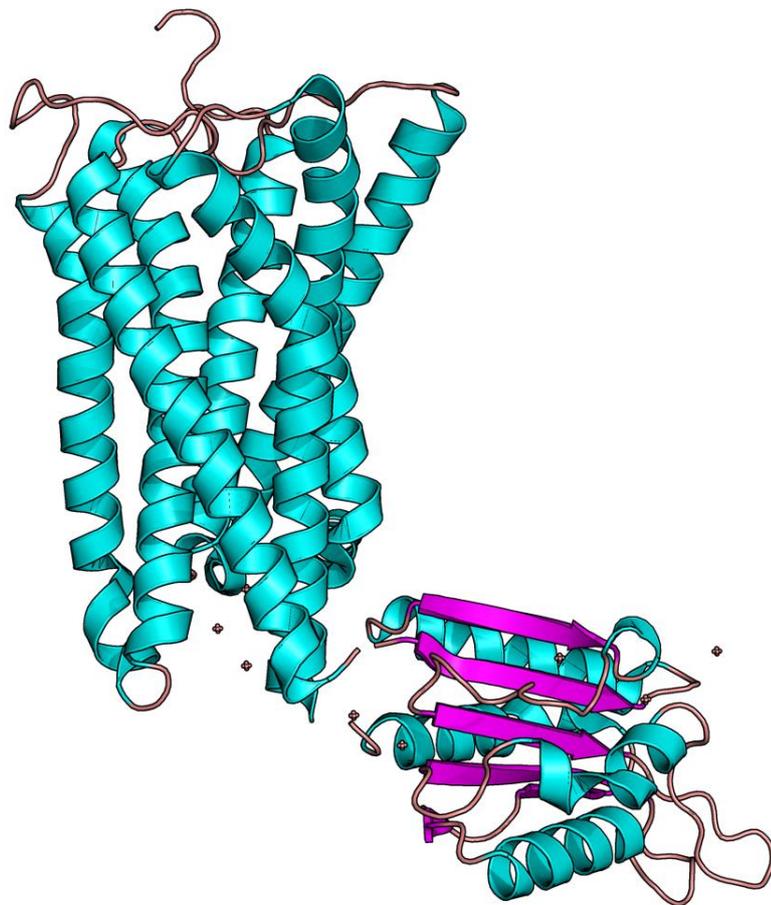


Figura 2: Representação da estrutura tridimensional do receptor CB1 inserido no PDB com o código 5TGZ, em azul as hélices, em pink folhas betas e em salmão as voltas.

Os dois receptores são proteínas-G acopladas e sua ativação leva a inibição da acumulação de adenosina cíclica monofosfatada (cAMP) em células via sua associação a proteínas $G\alpha_{i/o}$ [13,14].

O receptor CB1 é expresso heterogeneamente no sistema nervoso central (SNC). Reporta-se no córtex cerebral, hipocampo, substância nigra e cerebelo, assim como em áreas da medula espinhal, a presença de altos níveis desse receptor. [15]. Um dos efeitos associados a ativação do receptor CB1 é o aumento da ingestão de alimentos, motivo pelo qual a maconha aumenta a apetite em humanos [16]. A ativação do receptor CB1 no SNC também leva à neuroproteção, que é a justificativa para tentativas de explorar a ativação do receptor CB1 terapêuticamente no manejo da doença de Parkinson e esclerose múltipla [17,18].

Quando ativado, o receptor CB1 afeta as ações de neurotransmissores, tais como acetilcolina, norepinefrina, dopamina, 5-hidroxitriptamina, ácido γ -aminobutírico, glutamato e D-aspartato, e modifica os canais de cálcio e potássio.

No entanto, as barreiras ao desenvolvimento de agonistas do receptor CB1 são suas propriedades psicoativas socialmente inaceitáveis, bem como as restrições regulatórias. Por outro lado, o tratamento bem-sucedido da obesidade via bloqueio do receptor CB1 foi clinicamente alcançado com o medicamento rimonabanto. Entretanto, devido a um risco inaceitável de distúrbios psicológicos (depressão e tendências suicidas), o rimonabanto não obteve aprovação pelo Food and Drug Administration para ser distribuído nos Estados Unidos e sua distribuição foi suspensa pela agência de medicamentos europeu. No Brasil seu uso é permitido, porém controlado pela Anvisa.

O receptor CB2 é expresso principalmente nas células imunes como nos linfócitos, macrófagos, mastócitos, entre outras [19]. Sua ativação nas células imunes alteram a migração das células e leva a imunossupressão [20]. Como os agonistas do receptor CB2 são imunossupressores, anti-inflamatórios e não possuem propriedades psicoativas, estão sendo considerados potenciais alvos para a terapia de dor crônica e inflamação, inclusive para inflamações associadas a doenças neurodegenerativas [21]. Porém, para a completa elucidação do complexo papel dos agonistas do receptor CB2 para as respostas imunes demandará ainda significativo esforço.

1.3 Endocanabinóides

Em adição aos canabinóides derivados da maconha e os canabinoides sintéticos, também há os ligantes endógenos dos receptores CB1 e CB2 [22,23] que foram denominados de endocanabinóides.

Após a identificação e clonagem dos receptores canabinóides, houve a descoberta do seu primeiro agonista endógeno, chamado de anandamida, AEA, em 1992 [22]. Os endocanabinóides são moléculas lipofílicas sintetizadas das membranas fosfolipídica. O AEA é uma molécula derivada do ácido araquidônico e consiste em um grupo amida conjugada a uma cadeia araquidonoil (20 carbonos com 4 insaturações) [22]. Também em 1992, o segundo endocanabinóide, denominado 2-AG foi identificado, consistindo em um grupo glicerol associado a uma cadeia araquidonoil [24], estes dois compostos estão representados na figura 3.

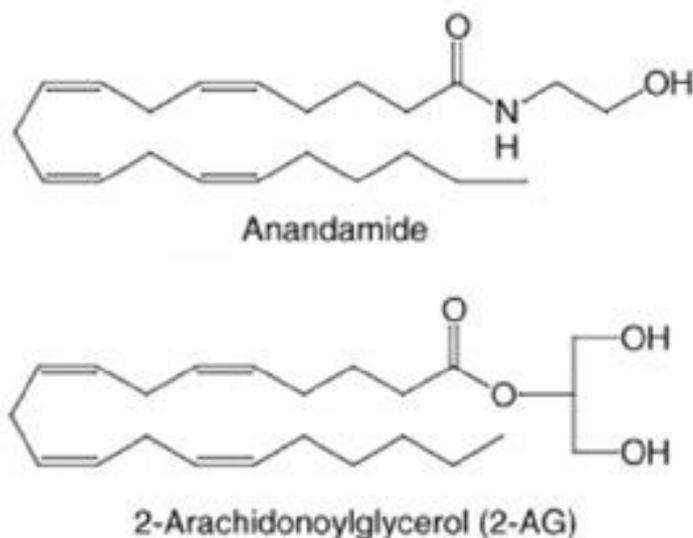


Figura 3: Estrutura química da molécula anandamida e do 2-AG [25]

A maioria dos estudos do sistema endocanabinóide foca nesses dois compostos, AEA e 2-AG, embora recentemente tenham sido descobertos peptídeos que interagem com o receptor CB1, e uma série de derivados de ácido araquidônico que produzem efeitos similares aos dos endocanabinóides [26]. Esses endocanabinóides, AEA e 2-AG, são bem caracterizados na literatura e possuem propriedades distintas, o AEA é um agonista de alta eficiência do CB1 enquanto interage muito pouco com o CB2. Já o 2-AG atua como agonista em ambos receptores, porém com afinidade moderada [27,26]. Esses dois compostos são os endocanabinóides principais, existindo outros compostos semelhantes [28,29,30,31].

1.3.1 Anandamida (AEA)

A molécula de anandamida é produzida em dois passos envolvendo a N-araquidonulação de um componente da membrana fosfolipídica, a fosfatidiletanolamina, para formar o N-araquidonoil fosfatidiletanolamina (NAPE) pela enzima N-aciltransferase, seguida da hidrólise do NAPE por uma fosfolipaseD seletiva para formar N-araquidonoil etanolamina (anandamida). Os níveis de AEA são regulados por sua quebra através da ação da enzima amido hidrolase de ácido graxo (FAAH) [32,33,34].

Nos últimos 25 anos, foi mostrado que a AEA tem papel fundamental nas atividades biológicas, tanto no SNC [35,36,37,38] quanto no periférico [39,40,41,42,43]. Essa habilidade da AEA depende da grande quantidade de receptores com os quais a anandamida interage, além

do CB1 e do CB2, o receptor transiente potencial vanilóide-1 (TRPV1), os receptores G-acoplados 55 (GPR55) e 119 (GPR119) e os receptores proliferadores ativados perissomo (PPARs).

Estudos tem revelado que a interação da anandamida com seus receptores desempenham várias funções dentro do organismo, como a regulação do reflexo peristáltico [44], afeta a capacidade de aprendizado e memorização [45], afeta circuitos neurais intrínsecos do trato gastrointestinal [46], além das propriedades neuroprotetivas e imunossupressoras [47].

1.4 Mecanismo de sinalização entre os receptores CB1 e CB2 e a AEA

O mecanismo de sinalização endocanabinóide no sistema nervoso ocorre via um mecanismo retrogrado, onde a síntese de anandamida ocorre nos neurônios pós-sinápticos após o influxo de cálcio e a subsequente ativação da fosfolipaseD, que converte uma molécula de fosfatidiletanolamina em anandamida. A AEA atinge a fenda sináptica e se acopla ao receptor CB1 pré-sináptico, onde sua ativação inibe a liberação de neurotransmissores através da supressão do influxo de cálcio. Além do CB1, a anandamida é capaz de ativar outros receptores, como por exemplo, o TRPV1, cuja ativação leva a despolarização aumentada das membranas pós-sinápticas [48].

A ativação do CB1 inicializa uma cascata de sinalizações que regula os canais de cálcio e potássio que suprimem a liberação dos neurotransmissores [13]. Nesse modelo a sinalização do endocanabinóide modula a eficiência da transmissão nervosa facilitando a comunicação de neurônio pós-sináptico ao pré-sináptico, como elucidado na Figura 4.

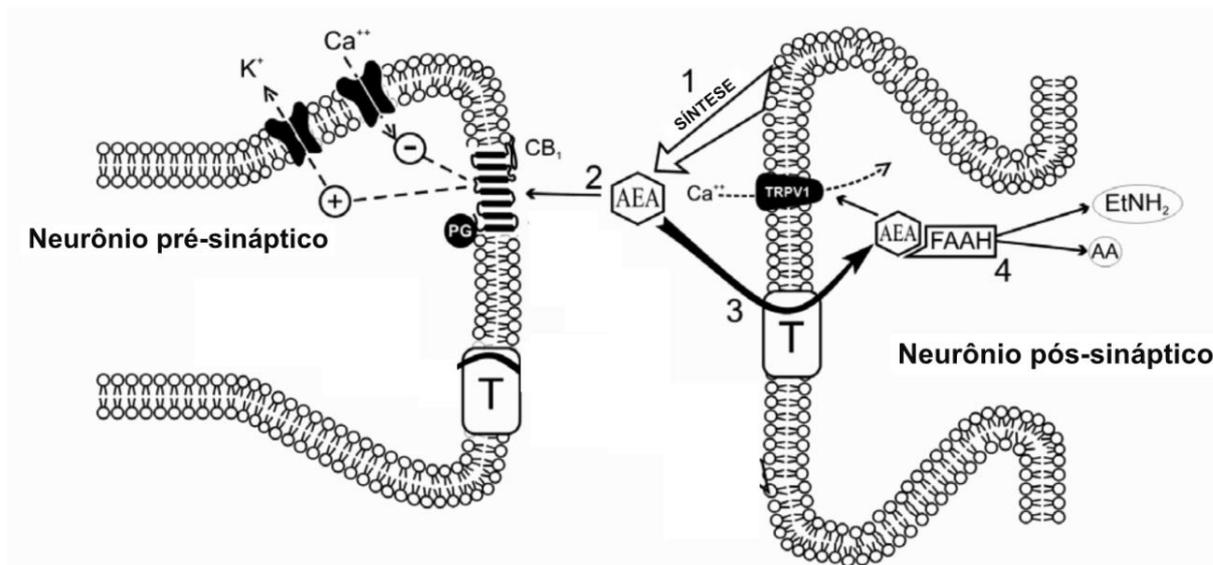


Figura 4: Esquema do mecanismo de ação retrogrado da anandamida, modificada da ref. [49]. Em (1) a síntese de endocanabinóide pelo neurônio pós-sináptico, (2) a ligação da anandamida ao receptor canabinóide CB1 no neurônio pré-sináptico – restrição da atividade neuronal, (3) a captação da AEA na fenda sináptica no neurônio pós-sináptico e (4) degradação da AEA pela FAAH.

Desordens no sistema endocanabinóide estão relacionadas a muitas doenças neuroinflamatórias como Alzheimer, Parkinson, Huntington, Esclerose múltipla e esclerose amiotrófica lateral [48,50,51,52]. Assim como sua hiperatividade está associada com desordens metabólicas e obesidade [53].

1.5 Mecanismo de ação independente de receptores

Embora seja aceito que o caminho para suas atividades seja através da ligação com os receptores endocanabinóides ou canais TRP [54,55], AEA e 2-AG podem produzir efeitos que não são mediados por esses mecanismos [56,57,58,59,60,61,62].

Em 2001 foi verificado que a anandamida inibe as correntes-T independentemente da ativação dos receptores CB1/CB2. A AEA se liga e estabiliza preferencialmente os canais-T no estado inativo e é responsável por uma diminuição significativa das correntes-T associadas com as atividades dos neurônios [56].

Foi mostrado que a anandamida interage com uma variedade de canais de íons neurotransmissores, como exemplo, os receptores NMD-, serotonina (5-HT3) e 7 α nicotínico acetilcolina na ausência do receptor CB1 [63]. Seu efeito é de aumentar a corrente induzida no canal NMDA [64], e inibir as correntes dos canais de serotonina e acetilcolina [65].

Outros efeitos que não são mediados por receptores endocanabinóides foram encontrados, como a modulação das propriedades funcionais de canais de: Ca^{+2} , Na^{+} , vários tipos de canais de K^{+} , canais de íons como a serotonina tipo 3, acetilcolina nicotínica e receptores de glicina. Foram encontrados efeitos modulatórios em proteínas de membrana que transportam íons e nas propriedades funcionais dos receptores das proteínas G acoplados para diferentes tipos de neurotransmissores e neuropeptídeos [66].

As atividades descritas, são tipicamente as obtidas pela ação dos receptores canabinóides, porém foram obtidas na sua ausência, ou mesmo com os receptores bloqueados. Estes efeitos sugerem que a anandamida possui outro alvo de ligação além dos receptores já conhecidos.

Para entender essa possível ação da anandamida sem a interação com os receptores surgiu a hipótese de que a natureza lipofílica da AEA faz com que ela se insira facilmente na membrana celular, onde se encontram os canais de íons. Ao se inserir ela altera as características elásticas da bicamada lipídica, afetando a compressão dos canais, modulando seu efeito. Essa hipótese é conhecida como teoria independente de receptor, e será o alvo das investigações deste trabalho [57].

Esta teoria é utilizada para explicar o modo de ação dos analgésicos, sendo discutida a mais de 20 anos, porém os pesquisadores ainda não chegaram a um consenso sobre sua viabilidade. Recentemente, mostrou-se que a inserção da quetamina em bicamadas lipídicas alteram suas propriedades elásticas e poderiam levar a inativação de proteínas transmembrânicas [87].

Resultados recentes reforçam a teoria independente de receptor. Experimentos mostraram que a incorporação de AEA em bicamadas lipídicas reduz a energia livre necessária para que ocorra a transição da conformação monomérica para a dimérica em canais de gramicidina A (gA), alterando muito pouco as propriedades globais da membrana, como sua espessura, área por lipídeo, entre outras [67].

Estudos mostram também que a AEA estimula diretamente os canais BK_{Ca} , nativamente expressas nas células endoteliais, de maneira independente dos receptores CB, ação essa que é acompanhada do aumento da atividade do canal, sugerindo uma possível abertura [68]. Outro efeito independente é a inibição da função da proteína transportadora de dopamina humana (DAT), a regulação negativa da função DAT está associada a um aumento na expressão de DAT intracelular, sugerindo que as alterações evocadas pela anandamida no tráfico de transportadores modulam em parte a DAT [69].

Associando estes dados com a teoria das deformações elásticas da membrana, é possível inferir que a ação dos endocanabinóides pode envolver ajustes locais na interface hidrofóbica lipídio/proteína que seriam responsáveis por seu efeito sem mediação de um receptor [67].

1.6 Efeito da pressão lateral nas bicamadas lipídicas.

Para tentar entender quais características são alteradas em uma bicamada lipídica, pela inserção de moléculas lipofílicas como o AEA, temos que analisar a alteração de propriedades elásticas da membrana. Estas propriedades elásticas podem ser relacionadas ao perfil de pressão lateral [70,71].

Em bicamadas lipídicas a pressão lateral não é constante em toda sua região. O excesso de energia livre interfacial leva a variações muito grandes no valor da componente transversal da pressão local (pressão lateral) para distâncias relativamente pequenas, sendo, portanto, fortemente dependente da localização e profundidade da região interfacial, como mostrado na figura 5. Com a incorporação de solutos ativos na membrana ocorre um aumento da pressão nesse faixa que é compensada por uma diminuição da pressão na região das caudas [72].

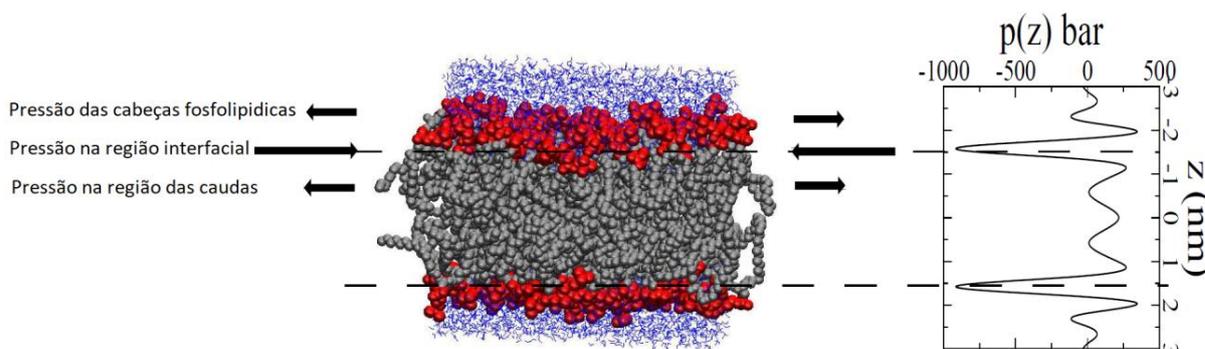


Figura 5: Exemplo da pressão lateral em uma bicamada modelo e homogênea, retirada e modificada de [73]. A pressão lateral em uma bicamada não é uniforme, seu comportamento pode ser sintetizado em três regiões. Na região das cabeças fosfolipídicas surge um pico positivo de pressão referente a repulsão eletrostática desses grupos. Na região interfacial entre a região hidrofóbica e aquosa surge um pico negativo de pressão referente a diminuição da área para evitar que moléculas de água passem para o núcleo hidrofóbico. Nas cadeias acílicas surge um pico positivo referente a mobilidade das cadeias e seu volume excluído.

A figura 5 ilustra uma situação típica em uma membrana lipídica. As diferentes interações dão origem a uma distribuição de pressão através da membrana não homogênea, chamada de perfil de pressão lateral [74,75,76,72,71,77]. Para simplificar, assume-se que o perfil de pressão computado ao longo da direção normal ao plano da bicamada possa ser sintetizado em três regiões distintas, sendo essa suposição válida para membranas homogêneas ou para um domínio em que a composição molecular está homogeneamente distribuída. Na região polar das cabeças dos fosfolipídios podemos notar um pico positivo na pressão lateral causada principalmente pela repulsão eletrostática e conflitos estéricos entre seus grupos. Na região interfacial ocorre uma mudança de sinal da pressão lateral, passando a ter um sinal negativo, pois a região das caudas hidrofóbicas tenta minimizar sua área para evitar entrada de água e dos grupos hidrofílicos da cabeça fosfolipídica gerando, portanto, uma atração responsável por essa mudança de sinal. Na região das caudas dos fosfolipídios aparece um pico positivo devido a mobilidade das cadeias acílicas, que por volume excluído aumentam a pressão nessa região [73].

Na prática, foram encontrados valores de pressão lateral para a região da cabeça dos fosfolipídios na faixa de +500 bar, para a região logo abaixo da cabeça dos fosfolipídios a PL abaixa para cerca de -1000 bar. Finalmente, na região dos hidrocarbonetos, no meio da membrana, a pressão se torna repulsiva com valores próximos a +200 bar.

A mudança na pressão próxima a interface membrana-água (pico positivo) para o pico negativo ocorre em somente 1nm de distância, o que significa que há um gradiente de pressão com valores próximos a 1500 bar/nm, esse grande gradiente de pressão pode ter um papel importante na ativação de proteínas de membranas [78].

A conexão entre o perfil de pressão lateral e a funcionalidade das proteínas de membrana tem sido objeto de estudos a cerca de meio século. Nos primeiros anos da década de 90, Gibson e Brown [75,76] discutiram o papel da tensão de curvatura na atividade da rodopsina. Cantor, no final dos anos 90, formulou modelo coerente e rigoroso conectando a funcionalidade das proteínas de membrana ao perfil de pressão lateral [71,70]. Seus cálculos analíticos para sistemas modelo demonstraram que as variações no perfil da PL podem ser suficientes para vencer a barreira de energia entre os estados inativo e ativo, ou vice-versa, levando à ativação ou inativação de proteínas de membrana que formam canais.

Estas ideias foram usadas por vários outros pesquisadores para interpretar resultados experimentais. Por exemplo, Perozo [79] encontrou que grandes canais mecanosensitivos (MscL) podem ser abertos sem pressão externa, somente adicionando moléculas de lisofosfatidilcolina assimetricamente em apenas uma das folhas da bicamada. Outros trabalhos

favorecem a ideia que o perfil de pressão lateral possa estar envolvido na abertura dos canais MscL [80,81].

Na literatura, foi descrito que a adição de álcoois de cadeia pequena em uma membrana resulta na dissociação do complexo proteína/membrana (KcsA), e estes resultados também foram interpretados como modificações na PL induzidas pelo álcool [82,83]. Outros resultados similares foram obtidos para ativação da rodopsina [76,84], para a modulação do CTP:fosfocolinacitidiltransferase [85,86] e para a interação da quetamina com bicamadas lipídicas [87].

A presença de proteínas de membrana, por exemplo da classe que formam canais tipo MscL, em equilíbrio, pressupõe rearranjos moleculares para a equilibração das pressões locais mutuamente exercidas. Tais rearranjos dependem do tipo de lipídeo, composição química da cabeça polar, do tamanho das caudas acílicas e do seu pareamento com a parte hidrofóbica da proteína (mismatch), da presença de insaturações nas caudas, por exemplo [88]. O perfil de pressão lateral, mais especificamente os seus momentos, são correlacionados aos coeficientes elásticos da membrana. Assim, é interessante conhecer o perfil da PL para os mais variados tipos de composições de fosfolipídios, assim como, dos efeitos da presença de solutos, para poder inferir sobre seus efeitos sobre as propriedades da bicamada. Infelizmente a obtenção experimental desses resultados são difíceis, pois suas medições devem ser realizadas dentro de uma membrana em uma escala menor que 1 nm.

Algumas tentativas de obtenção experimental da PL foram realizadas. Uma delas foi a utilização de sondas de pireno com diferentes tamanhos para indicar a pressão em diferentes regiões da cadeia acílica dos fosfolipídios [89,90], o resultado obtido está mostrado na figura 6.

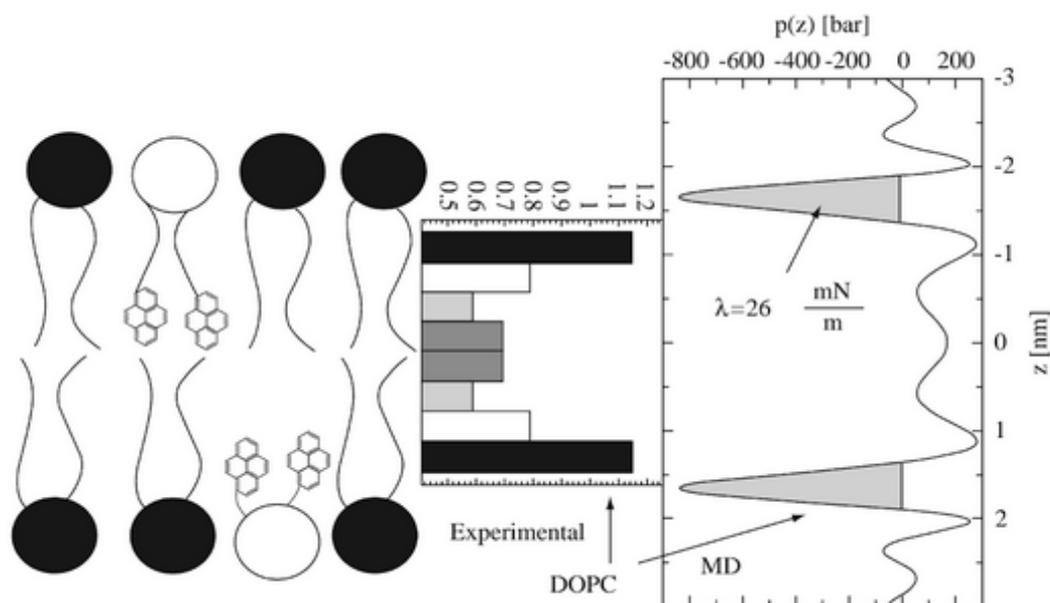


Figura 6: Ilustração da distribuição de pressão para a bicamada de DOPC medida pelas sondas de pireno (centro) [89] e calculadas em simulações atomísticas (direita) [91]. O desenho mostrando o uso das sondas de pireno foi adaptado da referência (esquerda) [90]. O resultado experimental se refere somente a região das cadeias acíclicas, referente a posição aproximada de -1 a 1nm no perfil da PL obtida pela DM. Os resultados são quantitativamente equivalentes, porém restrições do uso da sonda impedem a obtenção de valores de pressão.

Comparando o resultado experimental, representado na figura 6 como o gráfico de barras, e o resultado da DM, nota-se uma coerência entre as características das curvas. Ambas possuem um pico positivo na região das caudas, que diminui conforme aumenta-se a profundidade na bicamada, e no centro da membrana ocorre um pico positivo referente a mobilidade dos carbonos terminais. Embora os resultados teóricos e experimentais estejam em concordância quanto a forma da PL, problemas aparecem ao utilizar a sonda, como por exemplo, a obtenção de pressões relativas, dificultando uma comparação direta entre experimento e teoria. Outro problema é o desconhecimento da interferência dessas sondas na própria medida, uma vez que, foram encontradas em simulações atomísticas que o pireno perturba o empacotamento e a dinâmica dos lipídios que estão próximos as sondas, na escala de poucos nanômetros, porém seus efeitos na PL não foram elucidados [92].

Dadas as dificuldades experimentais para se obter o perfil de pressão lateral, técnicas computacionais e teóricas foram aplicadas para complementar experimentos. De fato, simulações computacionais atomísticas e coarse-grained (CG) são ferramentas para compreender sistemas membranares com detalhamentos nanoscópicos.

Ancorados na dificuldade de obtenção experimental da PL, e conscientes da importância de responder se a anandamida pode ter ação independente de receptor, neste trabalho

investigaremos a AEA através da técnica computacional de dinâmica molecular no nível atômico, e obteremos o perfil de pressão lateral de bicamadas na ausência e presença de soluto, relacionando-as as propriedades elásticas da bicamada e, por meio de modelos para as proteínas, avaliar a possibilidade de ativação ou inativação da mesma.

1.6.1 Propriedades Elásticas

Seguindo Helfrich [93], a energia livre por unidade de área de deformação de uma bicamada pode ser escrita como:

$$g(c_1, c_2) = \frac{1}{2} K_A \left(\frac{\Delta a}{a} \right)^2 + \frac{1}{2} \kappa (c_1 + c_2 - c_0)^2 + \bar{\kappa} c_1 c_2 \quad 1.1$$

onde K_A é o módulo de compressibilidade da área por lipídeo, a , Δa é a variação da área por lipídeo em relação ao valor de equilíbrio, κ é o módulo de curvatura (bending), c_0 é a curvatura espontânea da bicamada, $c_1 (=1/R_1)$ e $c_2 (=1/R_2)$ são as curvaturas principais locais e $\bar{\kappa}$ é o módulo de curvatura gaussiano.

O primeiro termo é a energia livre devido a compressão/descompressão por unidade de área por molécula, enquanto o segundo representa a energia livre elástica para produzir curvatura na bicamada.

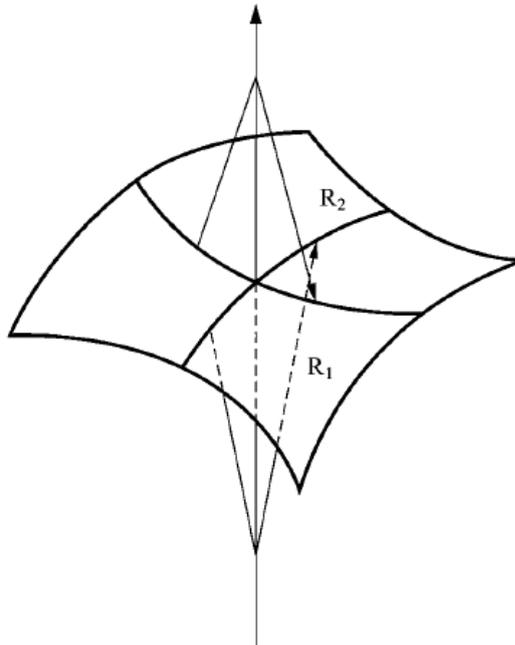


Figura 7: Curvatura de uma monocamada lipídica com as curvaturas principais $c_1=1/R_1$ e $c_2=1/R_2$. A curvatura média é $\bar{c} = c_1 + c_2$ e a curvatura gaussiana é dada por $\bar{c}_G^2 = c_1 c_2$. Ilustração retirada da referência [94].

Em geral, alguns detalhes dos perfis de pressões (como a altura dos picos) podem variar consideravelmente, e estes perfis não são as características mais importantes para a análise das propriedades elásticas da membrana, as grandezas que podem ser comparadas a estas propriedades são os momentos oriundos da PL.

Os momentos, M_1 e M_2 , da pressão lateral são obtidos através da integração da pressão lateral no eixo z , paralelo ao vetor normal a bicamada. O primeiro momento da PL pode ser relacionado com a multiplicação do módulo de curvatura, κ , com a curvatura espontânea, c_0 . Da mesma maneira, o segundo momento é igual ao módulo de curvatura gaussiano $\bar{\kappa}$.

O módulo de curvatura de uma bicamada κ , é considerada como o parâmetro mais importante para descrever a flexibilidade de membranas no nível mesoscópico. É uma constante macroscópica mecânica que descreve a tendência de certos materiais resistir a curvatura, no caso de membranas lipídicas, é definida como a energia requerida para deformar a bicamada de sua c

Curvatura intrínseca para outra curvatura [95]. Devido sua importância, tem papel fundamental em muitas situações biológicas, incluindo na endocitose [96], no tráfico através da membrana [97] e na fusão da membrana [98]. Além de poder ser calculada teoricamente utilizando o momento da pressão lateral, κ pode ser medido utilizando outras técnicas [99,100], sendo que os valores para as bicamadas puras, na fase líquido desordenado, variam entre $6-14 \times 10^{-20} \text{J}$. Embora tenha grande importância, a sua medição não é trivial e muitas medidas foram realizadas nas últimas décadas, porém os valores obtidos geralmente não são consistentes entre si.

A curvatura espontânea de uma bicamada, c_0 , pode ser resumida em duas categorias: assimetria da bicamada e as restrições físicas [97,101,102,103]. A assimetria da bicamada pode ser causada pelo formato assimétrico do fosfolípídio [101] com diferentes grupos cabeça e diferentes quantidades de cadeias acílicas. O formato dos lipídios podem ser sintetizados em cone, cilindro ou cone invertido [104], que corresponde a valores negativos, zero ou positivos de curvatura espontânea, respectivamente. A assimetria da bicamada também pode ser produzida por proteínas que inserem seus resíduos hidrofóbicos em somente uma folha da bicamada [105,106]. As restrições físicas decorrem da fixação de macromoléculas curvadas na membrana, por exemplo, se uma proteína curvada é suficientemente rígida e expõe sua superfície de interação inclinada em relação a bicamada, uma curvatura espontânea é aplicada [102,105,107,108,109].

A definição do módulo de curvatura gaussiana $\bar{\kappa}$, aparece na geometria diferencial como o produto das curvaturas principais c_1 e c_2 , sua medição é difícil e resultados experimentais são raros.

As atividades das proteínas intrínsecas de membrana são geralmente influenciadas pela presença de pequenos solutos solúveis na membrana (hidrofóbicos ou anfifílicos). Essa modulação alostérica geralmente é refletida nas curvas dose resposta: a sensibilidade da atividade das proteínas ao seu afetor principal (agonistas ou concentração de substrato, variação da voltagem da membrana, luz, etc) varia com a concentração aquosa do soluto alostérico. O mecanismo que influencia esse fenômeno pode ser dividido em dois tipos: o paradigma clássico e o independente de receptor.

No clássico, o soluto interage diretamente nos sítios ativos da proteína, agindo em alguns casos como ligantes. A especificidade, isto é, a força, alcance e localização dessa ligação pode variar grandemente [110]. Ligações específicas mais fortes envolvem pontes de hidrogênio ou atração coulombiana, enquanto as ligações não específicas surgem de efeito hidrofóbico ou forças de dispersão. Se a relação entre os ligantes alostéricos e a atividade das proteínas é rapidamente medido, mudanças no efeito da curva dose resposta pode ser interpretada em termos de características de ligação microscópicas.

Em uma segunda classe de mecanismo, chamados de independentes de receptores, solutos modulam a atividade das proteínas indiretamente, ou seja, sem ligação com as mesmas, mesmo que fraca. Considere como um exemplo uma proteína intrinsecamente de membrana cuja função dependa de uma transição conformacional, a solubilização de uma pequena molécula hidrofóbica ou anfifílica pode alterar a termodinâmica e propriedades estruturais da bicamada, ou podem mudar a conformação de equilíbrio da proteína e assim modular sua atividade. Propriedades como o perfil de pressão lateral, curvatura e propriedades elásticas e fluidez da membrana podem variar com a composição bicamada/soluto tendo grande influência na função das proteínas de membrana. Entretanto, em alguns trabalhos nota-se que a maioria das propriedades como espessura e parâmetro de ordem sofrem pequenas mudanças com a alteração da concentração soluto/proteína, porém são suficientes para produzir a modulação das proteínas. Uma propriedade capaz de modular estas interações seria a pressão lateral nas bicamadas, pois é fortemente influenciada pela incorporação de solutos ativos, assim como pela composição fosfolipídica, e está mecanicamente associada em alterar o equilíbrio conformacional de proteínas ou peptídeos [70].

Cantor em seu artigo, mostrou com argumentos termodinâmicos que moléculas que particionam na bicamada são capazes de aumentar a pressão lateral na interface favorecendo

um estado fechado de uma proteína de membrana, porém se há um aumento da área no interior da membrana, esse favorecia o estado aberto da proteína, a figura 8 mostra uma representação desse modelo [70], os analgésicos foram a classe de substâncias mais explorados seguindo esta argumentação [111,112,113,114,72].

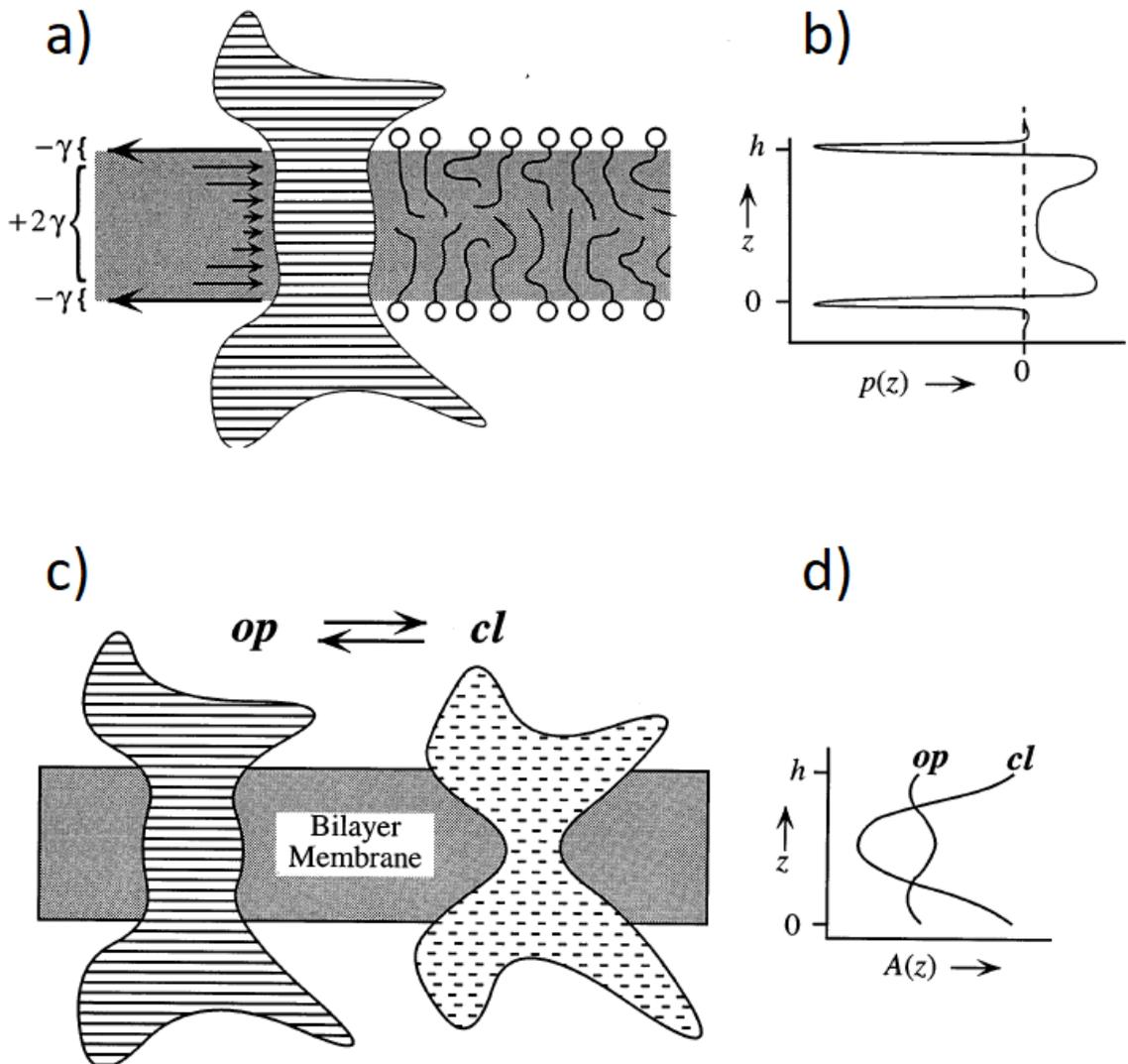


Figura 8: a) exemplo representativo de como ocorre a pressão lateral em uma bicamada lipídica, a direita da proteína de membrana temos a representação dos fosfolípidios, e a esquerda o comprimento e a direção das setas indicam a magnitude e o sinal da pressão lateral da membrana atuando na proteína. B) O gráfico correspondente da pressão lateral $p(z)$ onde a linha tracejada corresponde a $p=0$. c) Uma fatia da proteína de membrana em dois diferentes estados aberto (op) e fechado (cl). d) Gráfico da área A da seção transversal da proteína em função da profundidade z .

Para as proteínas denominadas mecanosensitivas (MscL), uma transição de estado teria associada uma variação da área da proteína, ΔA , que por sua vez dependeria da profundidade dessa proteína na bicamada, associando a espessura da bicamada com o eixo z , teríamos que a variação da área da proteína dependeria do eixo z , logo, $\Delta A(z)$.

Cantor mostrou em seu trabalho que ao conhecer a variação da área, $\Delta A(z)$, e o perfil de pressão lateral sofrida pela bicamada $p(z)$, seria possível associar se a inserção de solutos na bicamada seria capaz de alterar o estado da proteína, abrindo ou fechando um poro na bicamada [72].

O perfil de pressão lateral pode ser obtido através de simulações computacionais, porém há pouca informação sobre a variação da área das proteínas na (in)ativação, dessa maneira, recorre-se a modelos geométricos para obtenção da variação de área, esses modelos foram propostos por Cantor [71,72], e vem sendo utilizados para entendimento de muitos sistemas, como por exemplo a quetamina [87]

Muitas proteínas de membrana possuem domínios que são pacotes de α -hélices, onde as mudanças conformacionais são mais resultantes de orientações destas hélices, como foi reportado para o receptor de nicotina [115]. Através dessa concepção Cantor (1999) propôs dois modelos para representar as proteínas transmembrânicas que alteram sua conformação quando transitam do estado aberto para o fechado, estes modelos foram chamados de inclinação cooperativa e hastes rígidas dobradas.

Através de argumentações geométricas, estes modelos conseguem relacionar a variação da área das proteínas de membranas com parâmetros relativamente simples de serem obtidos, com isso, facilita a investigação da influência do soluto nas propriedades elásticas da bicamada. Essa mesma metodologia foi utilizada para estudar o efeito mediado por membrana no fechamento de canais de íons do anestésico quetamina [87].

Essa mesma metodologia será aplicada nesse trabalho, a partir do perfil de pressão lateral, e utilizando os modelos do Cantor, será investigada a ação de diferentes concentrações de anandamida em um processo de abertura ou fechamento de proteínas transmembrânicas.

1.7 Objetivo

Muitos estudos mostram que diferentes classes de moléculas anfifílicas podem particionar na bicamada lipídica e regular a função das proteínas de membrana somente alterando as propriedades físico-químicas da bicamada [116,117,118]. Dessa maneira, conhecendo a característica anfifílica da AEA e utilizando a teoria de Cantor sobre a pressão lateral e a alteração das propriedades da membrana, investigamos o mecanismo de ação independente de receptores inserindo diferentes concentrações de AEA na bicamada. Essas propriedades elásticas são obtidas através dos momentos da PL, e associados aos modelos geométricos, fornecem as informações estruturais e energéticas que podem ser correlacionadas as já conhecidas atividades da AEA sem receptores.

Dessa forma, para a investigação alvo dessa tese, algumas perguntas foram formuladas a respeito da anandamida, sendo elas:

- A. Qual deve ser sua estruturação em ambientes anfifílicos e anfipáticos para ser capaz de alterar as propriedades da bicamada?
- B. Será que ela particiona em uma bicamada?
- C. Como esta se comporta no interior da membrana?
- D. Quais propriedades ela altera?
- E. Será que ela altera a pressão lateral?
- F. Poderia ela ser capaz de alterar a pressão de tal forma que resultaria em uma abertura ou fechamento de proteínas de membrana, explicando assim seus efeitos sem receptores?

Para responder estas perguntas investigamos o modo de ação da anandamida utilizando simulações por dinâmica molecular. Ao total foram realizadas sete simulações de equilíbrio, sendo uma em água e seis em bicamadas de DOPC. As simulações em bicamada e água responderiam grande parte das perguntas, exceto a partição em uma bicamada, portanto foi realizada a técnica computacional denominada “umbrella sampling” (US) para investigar a partição da AEA na bicamada através do gráfico de energia livre de Gibbs.

Com estas informações discutimos um possível mecanismo de ação da AEA independente de receptores, que poderia ser responsável pela modificação de parâmetros intrínsecos a bicamada (como elasticidade e pressão lateral) sem alterar significativamente suas propriedades globais, como espessura e área por lipídio.

2. Materiais e Métodos

A simulação por dinâmica molecular é uma técnica computacional que gera novas configurações do sistema em estudo por meio da resolução das equações de movimento clássicas (segunda lei de Newton). A força resultante sobre cada partícula é obtida por meio do gradiente da função energia potencial total em relação às coordenadas da partícula sobre a qual se quer a força. Integrando o sistema de equações de movimento usando algum algoritmo numérico, podem-se obter as velocidades e posições de todas as partículas e, portanto, as trajetórias de cada partícula e as configurações do sistema compatíveis com as condições desejadas (“ensemble” estatístico).

A dinâmica molecular é uma técnica computacional muito utilizada em várias esferas do conhecimento [119,120,121,122,123,124], em especial para estudos biológicos tem se mostrado capaz em prever e entender modos de ação de proteínas e compostos químicos [123,124].

Os potenciais clássicos são representados por funções e seus parâmetros são constantes obtidas de dados experimentais ou mesmo por cálculos *ab initio*. Existem vários conjuntos de parâmetros definidos para cada tipo de utilização da DM, chama-se este conjunto de parâmetros de campo de força, e embora cada campo de força utilize parametrizações próprias seus resultados, em geral, são condizentes um com o outro. Nesse trabalho utilizamos o campo de força GROMOS96, utilizando os parâmetros 53A6 [125].

A energia total ou hamiltoniano de um sistema clássico é do tipo:

$$H = E_{cinética} + E_{potencial} \quad 2.1$$

A energia cinética é, normalmente, independente das posições das partículas \mathbf{r}_i , depende somente dos momentos de cada partícula, \mathbf{p}_i , e da massa das N partículas do sistema. A energia potencial pode ser dividida em 3 termos, como mostra a equação 2.2

$$E_{potencial} = E_{ligado} + E_{não\ ligado} + E_{especiais} \quad 2.2$$

onde o termo E_{ligado} se refere aos termos com ligações covalentes, e $E_{não\ ligado}$ são referentes às forças que agem a longa e curta distancias para átomos não ligados

covalentemente, e $E_{especiais}$ se referem às restrições de posições e vínculos em comprimentos e ângulos de ligação.

2.1 Funções potenciais para as interações entre átomos ligados

A ligação covalente entre dois átomos é representada por um potencial quadrático, na forma do tipo:

$$V_{lig}(r_{i,j}) = \frac{1}{4} k_{i,j}^{lig} (r_{i,j}^2 - b_{i,j}^0)^2, \quad 2.3$$

onde $k_{i,j}$ e $b_{i,j}$ são constantes referentes as ligações entre os átomos i e j , $r_{i,j}$ é a distância entre os átomos i e j em cada instante.

A figura 9 representa o estiramento da ligação covalente, e a sua respectiva energia potencial.

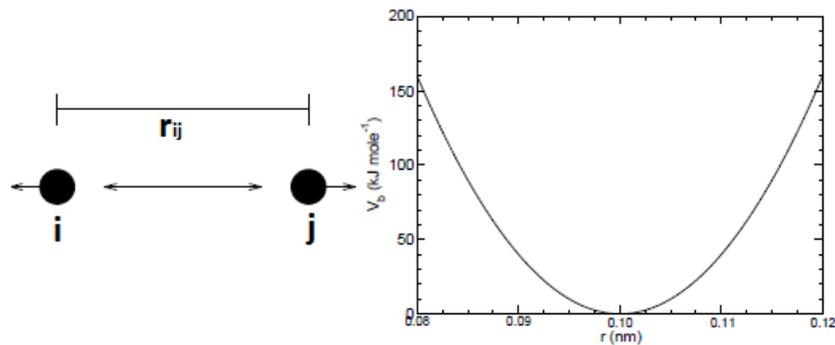


Figura 9: Representação do estiramento da ligação covalente (esquerda), e o potencial de estiramento (direita) para a ligação Nitrogenio-Hidrogenio (N-H).

O termo referente às oscilações do ângulo entre duas ligações (ângulo de valência), envolvendo três átomos i, j e k , sendo um átomo comum as duas ligações, é representado por um potencial harmônico, como mostra a equação:

$$V_{ang}(\theta_{i,j,k}) = \frac{1}{2} k_{i,j,k}^{\theta} (\cos \theta_{i,j,k} - \cos \theta_{i,j,k}^0)^2 \quad 2.4$$

onde $k_{i,j,k}$ é a constante de Hooke para a restituição ao ângulo de equilíbrio, $\theta_{i,j,k}^0$ e $\theta_{i,j,k}$ são, respectivamente, o ângulo de equilíbrio e o ângulo instantâneo. A Figura 10 ilustra esse potencial.

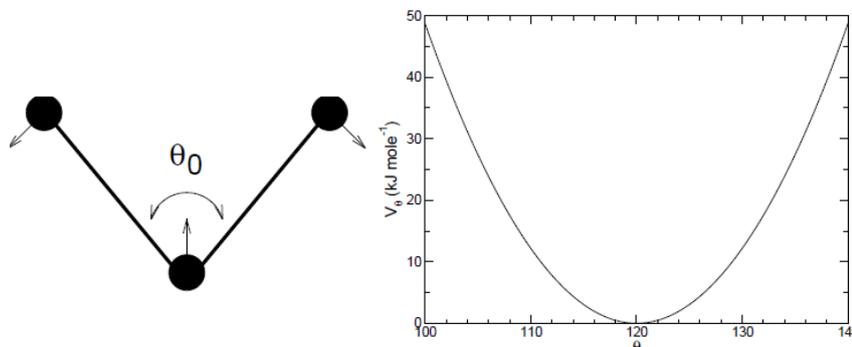


Figura 10: Princípio da vibração angular (esquerda) e seu respectivo potencial (direita) para os ângulos da ligação N-H.

A distribuição eletrônica dos átomos em torno das ligações químicas, além das limitações discutidas anteriormente, tende a inibir (ou penalizar) as rotações relativas de átomos separados por três ligações químicas consecutivas. O ângulo diedral próprio φ é o ângulo que mede a rotação do plano formado pelos átomos j,k,l em relação ao plano formado pelos átomos i,j,k , em torno da reta que une os átomos j e k , como mostrado na figura 11. O termo diedral vem do fato desse ângulo se referir a rotação entre dois planos em torno à linha de intersecção dos dois planos.

A função usualmente utilizada para descrever esse tipo de interação, denominada Potencial torsional próprio, é uma função trigonométrica do tipo:

$$V_t(\phi_{i,j,k,l}) = k_\phi [1 + \cos(\varphi_s) \cos(m_n \phi)] \quad 2.5$$

na qual, k_ϕ é uma medida da barreira de energia para a rotação, φ_s é um ângulo de referência, usualmente assumido como zero quando o átomo i eclipsa o átomo l quando visto ao longo da linha que une os átomos j e k a partir do lado em que está o átomo i e n representa a periodicidade, m_n é a multiplicidade do ângulo torsional diedral e ϕ é o valor do ângulo diedral instantâneo, definido pelos átomos i, j, k e l .

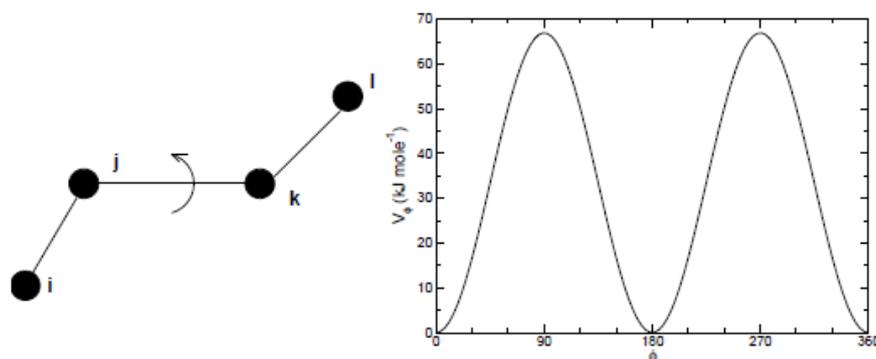


Figura 11: Princípio dos ângulos diédricos próprios à esquerda e o potencial à direita.

Na filosofia do pacote GROMOS trabalha-se com a representação atômica somente para os átomos pesados e os átomos de hidrogênio quimicamente ativos. Assim, os átomos de hidrogênio ligados aos átomos de carbono usualmente não são tratados explicitamente e sim unidos ao átomo de carbono redefinindo-se para estes a massa, carga e demais parâmetros. Para garantir a tetraedricidade do átomo de carbono, contudo, deve-se introduzir um potencial denominado potencial diédrico impróprio. Para isso faz-se uso de uma função quadrática dada pela equação:

$$V_{di}(\xi_{ijkl}) = \frac{1}{2} k_{\xi} (\xi_{ijkl} - \xi_0)^2 \quad 2.6$$

em que $\xi_{i,j,k,l}$ é o ângulo de rotação do plano formado pelos átomos i,j,k com o plano formado pelos átomos j,k,l conforme mostrado na figura 12, ξ_0 é o valor de $\xi_{i,j,k,l}$ que define a tetraedricidade perfeita e k_{ξ} é a constante que calibra a intensidade da interação.

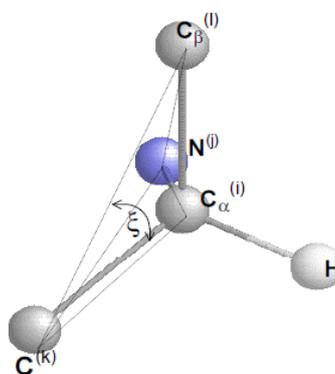


Figura 12: Estrutura tetraédrica do carbono α (ξ é o ângulo entre os planos i,j,k e j,k,l).

2.2 Funções potenciais para as interações entre átomos não ligados

Átomos ditos não ligados são todos os átomos separados por três ou mais ligações químicas, mesmo que pertençam à mesma espécie molecular. As interações entre estes átomos são, em praticamente todos os campos de forças, representadas por dois tipos de potenciais: o tipo Lennard-Jones e o potencial eletrostático de Coulomb.

2.2.1 Potencial tipo Lennard-Jones

São interações efetivas somente no curto alcance e que sempre estão presentes quando dois átomos se aproximam. O termo $-1/r^6$ é atrativo e conhecido como interação de Van der Waals cuja origem, para átomos neutros, vem das flutuações instantâneas na distribuição eletrônica que geram dipolos elétricos instantâneos que induzem nos átomos ou moléculas próximas um dipolo induzido, a interação entre estes dois dipolos pode ser representada por uma função desse tipo. O termo $1/r^{12}$ é repulsivo e representa, nesse contexto, o princípio de exclusão de Pauli.

$$V_{L,J}(r_{ij}) = \frac{C_{ij}^{(12)}}{r_{ij}^{12}} - \frac{C_{ij}^{(6)}}{r_{ij}^6} \quad 2.7$$

Onde os termos $C_{ij}^{(12)}$ e $C_{ij}^{(6)}$ são constantes que dependem dos tipos de pares de átomos envolvidos na interação, e r_{ij} é a distância entre os átomos i e j .

Existem outras funções que podem representar a interação de Van der Waals, porém como o segundo termo é a raiz quadrada do primeiro termo, o cálculo torna-se muito mais fácil para a equação acima, e diminui o tempo computacional.

2.2.2 Potencial Eletrostático:

A interação de Coulomb entre duas partículas é dada por:

$$V_c(r_{ij}) = f \frac{q_i q_j}{\epsilon_r r_{ij}} \quad 2.8$$

Sendof $f = \frac{1}{4\pi\epsilon_0}$, q_i e q_j as cargas dos átomos i e j , e r_{ij} a distância entre os dois átomos e ϵ_r é a permissividade do meio, usualmente o vácuo, para o qual $\epsilon_r = 1$

A equação acima é utilizada para calcular a energia para todos os átomos dentro do raio de corte que é pré-determinado na dinâmica; para os átomos que estão fora desse raio o tratamento eletrostático é feito pelo método PME [126].

O raio de corte utilizado neste trabalho foi de 1.2 nm, tanto para as interações de eletrostáticas como para as de van der Waals.

2.3 Condições Periódicas de Contorno

Considerando que uma simulação eficaz deve incorporar todas as características do sistema de interesse e que o objetivo de realizar uma simulação é entender o comportamento de sistemas reais, os quais possuem da ordem de 10^{23} a 10^{25} partículas, e que nestes sistemas o efeito da interação das partículas com as paredes do recipiente é desprezível, utiliza-se o que é conhecido como “Condições Periódicas de Contorno (CPC)”, que consiste basicamente em replicar várias vezes o sistema em estudo de forma que não haja espaços não preenchidos entre as junções, ou seja, a caixa original é transladada nas três direções espaciais, formando uma rede, por simplicidade mostrada no plano (figura 13).

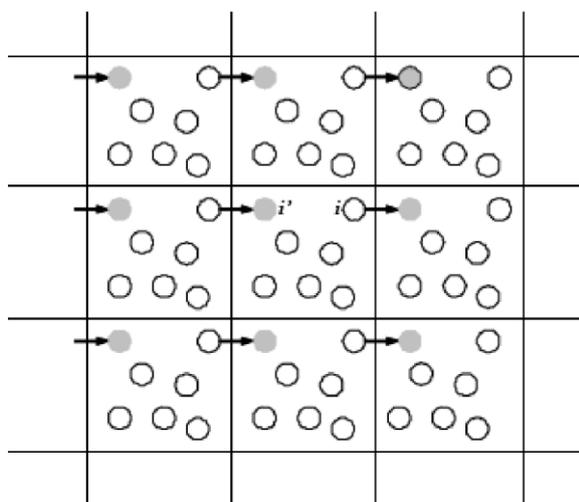


Figura 13: Esquema bidimensional das Condições Periódicas de Contorno.

Nesta técnica, durante a simulação, quando um átomo se move na caixa original suas réplicas se movem igualmente nas caixas imagens. Se certo átomo (i) sai da caixa original, uma de suas imagens (i') entra pela face oposta, mantendo assim constante o número de átomos na caixa original. A utilização das condições periódicas de contorno torna necessário o uso de outra aproximação chamada de raio de corte, pois, as CPC aumentam significativamente o

número de átomos que constituem o sistema em estudo. Conseqüentemente, há um aumento no custo computacional para o cálculo das interações para os átomos não ligados do sistema, devido ao grande número de termos que haveria para que este cálculo fosse feito. Para diminuir este custo, usualmente, define-se uma região na qual, essas interações são calculadas diretamente. Essa região é delimitada por uma esfera de raio r_c , denominado raio de corte, que em geral é utilizado no cálculo das interações de Coulomb e de Van der Waals. Externamente a essa região utiliza-se um tratamento especial para esses cálculos, que no caso deste trabalho é feito utilizando o Particle Mesh Ewald (PME) [127].

O PME (Particle Mesh Ewald), proposto por Tom Darden [126], foi implementado para aumentar o desempenho, diminuindo o tempo de simulação. Nesse método as cargas são atribuídas a uma rede usando interpolação por splines. A rede sofre uma transformada de Fourier com o algoritmo 3D FFT e o termo de energia recíproco é obtido por uma simples soma sobre a rede no espaço. O termo de energia potencial na rede é calculado pela aplicação da transformação de Fourier inversa, e usando os fatores de interpolação encontramos a força coulombiana em cada átomo. Como esse método mostra-se muito eficiente em termos de precisão e velocidade de processamento, está implementado na maioria dos pacotes computacionais de dinâmica molecular [128].

2.4 Integração das equações de movimento

Para obter a evolução temporal do sistema em estudo é necessário realizar a integração das equações de movimento obtidas da Hamiltoniana do sistema. A técnica numérica para integração das equações de movimento utilizada é conhecida como “Leap Frog” [129]

A fórmula do “leapfrog” é obtida a partir da expansão de Taylor da coordenada variável, em torno de $\left(t + \frac{\Delta t}{2}\right)$ e $\left(t - \frac{\Delta t}{2}\right)$,

$$v_i \left(t + \frac{\Delta t}{2} \right) = v_i(t) + \frac{dv_i(t)}{dt} \left(\frac{\Delta t}{2} \right) + \frac{d^2v_i(t)}{dt^2} \left(\frac{\Delta t}{2} \right)^2 \frac{1}{2!} \quad 2.9$$

Fazendo a expansão de $v_i \left(t - \frac{\Delta t}{2} \right)$ e subtraindo-a da equação 2.10, tem-se:

$$v_i \left(t + \frac{\Delta t}{2} \right) = v_i \left(t - \frac{\Delta t}{2} \right) + \frac{dv_i(t)}{dt} \Delta t \quad 2.10$$

Sabe-se que $\frac{dv_i(t)}{dt} = \frac{F_i(x_i)}{m_i}$, e fazendo a devida substituição na equação 2.10:

$$v_i\left(t + \frac{\Delta t}{2}\right) = v_i\left(t - \frac{\Delta t}{2}\right) + \frac{F_i(x_i)}{m_i} \Delta t \quad 2.11$$

Fazendo a expansão de $x_i(t + \Delta t)$

$$x_i(t + \Delta t) = x_i(t) + \frac{dx_i(t)}{dt} \Delta t + \frac{d^2x_i(t)}{dt^2} \frac{(\Delta t)^2}{2!} \quad 2.12$$

E substituindo a equação 2.10 na equação 2.12 e desconsiderando os termos de ordem superior, tem-se:

$$x_i(t + \Delta t) = x_i(t) + v_i\left(t + \frac{\Delta t}{2}\right) \Delta t \quad 2.13$$

Sendo x_i a posição do átomo i no instante t , v_i a velocidade do átomo i no instante t e Δt o incremento de velocidade para o próximo passo.

As equações 2.12 e 2.14 são calculadas de forma iterativa. No entanto, as velocidades e as posições não são calculadas ao mesmo tempo, como consequência, as energias cinética e potencial não podem ser calculadas no mesmo instante. Esse problema pode ser contornado calculando-se a velocidade no instante t como a média das velocidades nos instantes $\left(t + \frac{\Delta t}{2}\right)$ e $\left(t - \frac{\Delta t}{2}\right)$.

2.5 Passo do Tempo, SETTLE e LINCS

É de extrema importância escolher intervalos de tempo adequados para a utilização dos algoritmos de integração, intervalos muito grandes tornam as simulações instáveis e intervalos muito pequenos não amostram o espaço de fase suficientemente, além de aumentar o custo computacional da simulação.

Portanto para acelerar as simulações sem torna-las instáveis, algumas restrições são inseridas no sistema. Alguns valores de tamanho de ligação e ângulos são forçados a se manter constante durante a simulação, retirando assim seus graus de liberdade. Os algoritmos de restrições utilizados nesse trabalho são o SETTLE [130] e o LINCS [131].

Utilizando a restrição podemos utilizar um passo de 2fs para as simulações.

2.6 Minimização de Energia

A função de energia potencial total de um sistema molecular é muito complexa. Ela possui um ponto de mínimo global e vários pontos de mínimos locais, nos quais todas as derivadas da função de energia potencial são zero e todas as segundas derivadas são positivas. Devido ao elevado número de graus de liberdade das macromoléculas biológicas, uma exploração completa da superfície multidimensional de energia é impossível. Uma maneira de explorar esta superfície se dá pelo método de minimização da energia potencial deste sistema, que consiste basicamente em caminhar pela superfície em estudo na direção em que a energia decresce, de maneira que o sistema é levado para um ponto de mínimo local. Este processo é realizado utilizando-se algoritmos de otimização clássicos que consistem na comparação do valor da função de energia potencial em dois vetores posição consecutivos. O vetor posição para o passo seguinte é dado por:

$$\vec{x}_{t+1} = \vec{x}_t + \Delta\vec{x}_t \quad 2.14$$

na qual, t é o passo em análise e $\Delta\vec{x}_t$ é, inicialmente, uma perturbação aleatória nas coordenadas que estão sendo otimizadas. Há várias maneiras de se determinar o incremento $\Delta\vec{x}_t$, uma delas é o emprego da primeira derivada da função de energia potencial. Outra maneira, mais sofisticada, emprega também a segunda derivada da função de energia potencial, que melhora bastante a taxa de convergência.

Nesse trabalho todas as minimizações de energia foram realizadas com o algoritmo de primeira derivada Steepest Descent. Nesse método o incremento $\Delta\vec{x}_t$ é tomado na direção do gradiente negativo, sem considerar os passos anteriores.

2.7 Restrição de Posição

Nas simulações realizadas em água, após a minimização de energia foi realizado um procedimento chamado de “Restrição de Posição”. Neste, as moléculas de soluto que constituem o sistema têm suas posições fixas através da aplicação de constantes de forças muito altas sobre cada um de seus átomos. Tal procedimento é utilizado para relaxação do solvente e para reorientar as moléculas de água.

2.8 NVT

Nessa simulação mantemos o Número de moléculas, Volume e Temperatura constantes durante a simulação. Assim como a minimização de energia e a restrição de posição esse processo é feito para equilibrar o sistema. Todas as simulações realizadas em membranas passaram por esse processo, é importante, pois como simulamos um sistema heterogêneo é nessa fase que as moléculas de água e de fosfolipídios podem se reorientar, seja na direção das cabeças fosfolipídicas, no caso da água, ou os fosfolipídios se orientando ao redor da anandamida.

O acoplamento de temperatura é feito pelo algoritmo V-rescale [132] sem o acoplamento de pressão. O tempo da simulação é de 100 ps.

2.9 NPT

Esse é o ensemble onde a produção da dinâmica molecular acontece, mantendo o número de moléculas, a pressão e a temperatura constantes.

A simulação foi dividida em duas partes, mesmo após a equilibração no sistema NVT, a simulação ainda não está pronta para a coleta de dados, dessa forma simulamos mais alguns nano segundos para obter a fase de produção. O acoplamento de temperatura utilizado foi o Nose-Hoover [133] e o acoplamento de pressão, Parrinello-Rahman [134]. Todas as simulações foram realizadas com a temperatura de 300 K.

2.10 Análises

Os resultados oriundos da dinâmica molecular foram analisados utilizando as ferramentas do pacote computacional Gromacs. Outros algoritmos de análise que não fazem parte do pacote computacional foram utilizados e serão discutidos abaixo.

O raio de giro é realizado pela rotina computacional denominada `g_gyrate` do pacote Gromacs, a equação utilizada é:

$$R_g = \left(\frac{\sum_i |r_i|^2 m_i}{\sum_i m_i} \right)^{1/2} \quad 2.15$$

Onde m_i é a massa do átomo i e r_i é a distância entre o átomo i e o centro de massa.

A área acessível ao solvente é uma medida da exposição de sua molécula ao solvente, foi calculada utilizando o comando `g_sas` [135].

A distância entre os grupos foi calculada através do comando `g_dist`, essa análise calcula a distância entre os centros de massa dos grupos de interesse em cada instante da simulação.

Para obter o desvio entre duas estruturas, ou as flutuações médias dos átomos durante o tempo de simulação utiliza-se o desvio quadrático médio (RMSD); essa ferramenta nos mostra como uma estrutura de proteína varia ao longo do tempo de simulação em relação à estrutura inicial, mostrando a influência do solvente. Ou ainda, permite a comparação de duas estruturas iguais submetidas a diferentes processos. A equação utilizada para o cálculo do RMSD é dada por:

$$RMSD = \left[\frac{1}{N} \sum_{i=1}^N (\vec{x}_i - \vec{x}_i^0)^2 \right]^{1/2} \quad 2.16$$

Sendo \vec{x}_i e \vec{x}_i^0 os vetores de posição atômicos do átomo i em dois instantes distintos.

Essa análise é utilizada para encontrarmos as configurações de anandamida semelhantes durante a simulação e as separarmos em clusters, o comando utilizado é o `g_cluster` [136], utilizamos um valor de RMSD máximo de 0,25 nm.

A densidade de massa também foi realizada pelo pacote computacional Gromacs, sua linha de comando é `g_density`, nela computa-se a densidade parcial dos grupos analisados através da caixa de simulação, nesse trabalho dividimos todas as caixas em 100 fatias e foi calculada a densidade de massa como uma média de todo o tempo de simulação.

As pontes de hidrogênio foram calculadas através do `g_hbond`. Essa análise computa e analisa as ligações de hidrogênio de todos os possíveis doadores D (átomo eletronegativo que está ligado a um hidrogênio) e aceptores A (outro átomo eletronegativo que participa dessa ligação).

Para saber se há ou não uma ligação de hidrogênio dois critérios geométricos são utilizados: a distância r entre os átomos deve ser menor ou igual a 0,35 nm e o ângulo (α) entre eles seja menor ou igual a 30°

$$r \leq 0,35\text{nm} \quad 2.17$$

$$\alpha \leq 30^\circ \quad 2.18$$

O parâmetro de ordem das cadeias de carbono do DOPC e da anandamida foi calculado utilizando a ferramenta *g_order* [137]. O parâmetro de ordem pode ser relacionado à flexibilidade das caudas dos fosfolipídios, sendo obtido de acordo com a equação:

$$S_{CD} = \frac{1}{2} \langle 3 \cos^2 \theta_i - 1 \rangle \quad 2.19$$

Sendo θ_i o ângulo ente o átomo i e o vetor normal à membrana, os colchetes representam a média durante todo o tempo de simulação.

Para encontrar os valores de espessura da membrana e área por lipídio foi utilizado o software *APL@Voro* [138], que utiliza os resultados das simulações do Gromacs para calcular a área por lipídio e a espessura da membrana utilizando o algoritmo de Voronoi.

Para calcular a área por lipídio, as coordenadas de átomos chave são projetadas em um plano, e um diagrama de Voronoi é calculado usando essas coordenadas projetadas. Portanto a área de um lipídio projetado (A) de um lipídio (I) presente na face (L), representada por um átomo chave (pl), é definido como área correspondente a célula de Voronoi (área do polígono $A_{vc}(pl,L)$):

$$A_{vc}(pl,L) = \frac{1}{2} \sum_{i=0}^{N=1} (x_i y_{i+1} - y_i x_{i+1}) \quad 2.20$$

Onde N é o número de vértices da célula Voronoi e (x_i, y_i) são as coordenadas dos vértices da célula. A área total projetada $A(I)$ descrita por N átomos chave é então definida como:

$$A(I) = \sum_{i=0}^N A_{vc}(i,L) \quad 2.21$$

Para calcular a espessura da membrana é medida a distância entre os átomos chave da face superior com a face inferior. Para cada átomo chave selecionado, a espessura local é obtida identificando o vizinho vertical mais próximo. A coordenada chave de uma face da bicamada é projetada em uma triangularização do átomo chave da outra face da bicamada. A espessura local da bicamada é então interpolada entre as coordenadas dos átomos chave do triângulo que as projeções caíam e as coordenadas da projeção do próprio átomo. A equação do plano utilizado para computar a elevação em qualquer ponto do triângulo é definida por três vértices do triângulo projetada do átomo $p_a(x_a, y_a, z_a)$:

$$z = f(x_a, y_a) = -\frac{A}{C}x_a - \frac{B}{C}y_a - \frac{D}{C} \quad 2.22$$

Onde A, B, C e D são computados pelas coordenadas do triângulo $p_0(x_0, y_0, z_0)$, $p_1(x_1, y_1, z_1)$, $p_2(x_2, y_2, z_2)$ e a coordenada do átomo $p_a(x_a, y_a, z_a)$.

Uma simulação pode ser caracterizada como equilibrada quando a curva de energia potencial como função do tempo mostra valores ao redor de um valor constante, ou, seu ajuste linear apresente um coeficiente angular muito pequeno. Essa análise foi realizada para todas as simulações através da rotina computacional denominada `g_energy`. Essa ferramenta permite outras análises como: variação da temperatura, pressão, volume da caixa, potencial eletrostático, potencial de Lennard Jones, entre outros.

2.11 Topologias

Para as simulações computacionais realizadas neste trabalho foi utilizado o modelo para água chamado SPC (Simple Point Charge) [139], que embora seja um modelo simples, é muito eficiente e tem sido muito utilizado desde o seu desenvolvimento [140,141,142]. Esse modelo considera rígida a molécula de água, restringindo assim seus graus de liberdade; o modelo utiliza o mínimo possível de cargas pontuais, que coincidem com as posições dos átomos, evitando assim a reconstrução dos centros de carga e redistribuição de forças e torques [139]. Uma representação da molécula de água e as restrições do modelo está mostrada na figura 14.

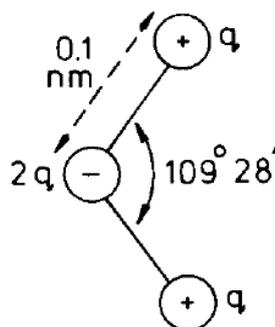


Figura 14: Geometria e cargas no modelo SPC. (134)

A membrana de DOPC pré equilibrada foi obtida das simulações da Siu et al. 2008 [143], o sistema possui 128 moléculas de DOPC sendo 64 em cada face. Uma representação do

fosfolipídio DOPC e de seus grupos que serão analisados neste trabalho está mostrada na figura 15 b)

Para a construção da topologia da anandamida foi utilizado o Automatic Topology Builder, ATB [144]. Uma representação da anandamida, juntamente com os grupos que serão analisados está mostrada na figura 15 a).

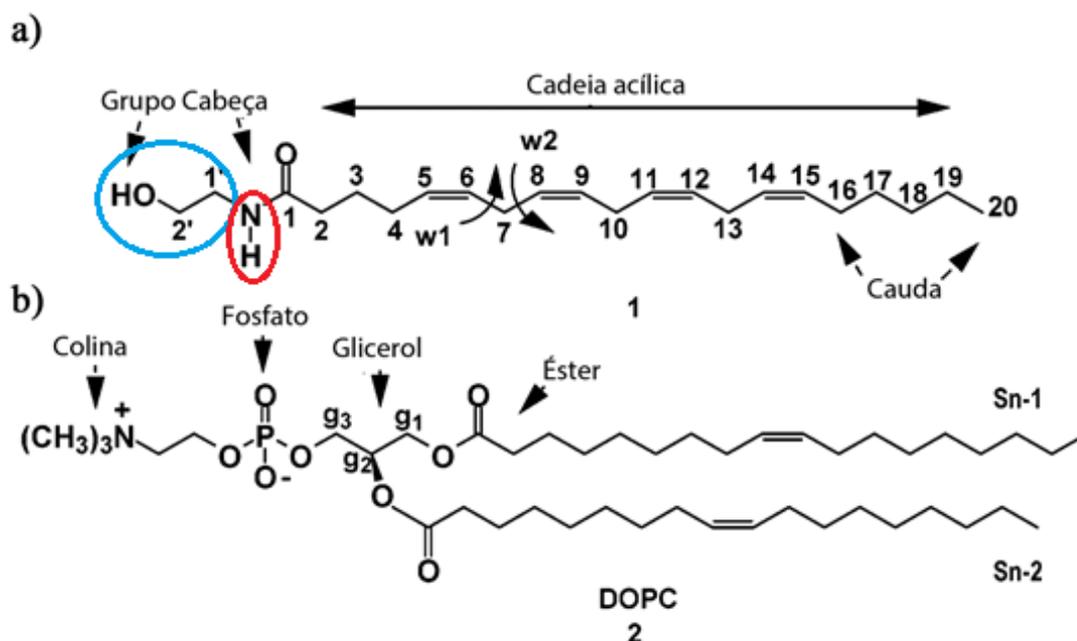


Figura 15: Estrutura dos compostos utilizados nesse trabalho, em a) anandamida, evidenciando no círculo azul o grupo CH₂OH e no vermelho o grupo NH, ambos da cabeça e em b) o DOPC.

As análises realizadas com a anandamida serão em maior parte, divididas na cabeça polar e na cauda ou cadeia acílica. Na cabeça da anandamida as análises serão divididas no grupo CH₂OH, circulado em azul na figura 15, e o grupo NH circulado em vermelho. As análises realizadas no DOPC serão nos grupos identificados na figura 15 b) juntamente com o carbono terminal das caudas acílicas.

2.12 Umbrella Sampling

A energia livre é uma das propriedades termodinâmicas mais importantes, sendo sempre de grande interesse para o estudo de problemas de biofísica [145]. Entretanto encontrar seu valor não é algo imediato para simulações de dinâmica molecular, pois esta não amostra significativamente o espaço de fases. Em sistemas biológicos, muitos mínimos de energia

existem, e estão separados por diferentes barreiras de energia, a DM geralmente não consegue amostrar essas áreas de barreira, tornando impossível obter resultados de energia livre precisas.

Várias técnicas foram desenvolvidas para obter o perfil de energia livre, nesse trabalho vamos utilizar a Umbrella Sampling.

Nessa técnica utiliza-se um termo de potencial externo para restringir os graus de liberdade da molécula, fazendo com que essa amostra suficientemente a superfície de energia potencial. Geralmente é uma função quadrática da forma:

$$W(r) = \frac{1}{2} k_w (r - r_0)^2 \quad 2.23$$

Onde k_w é a constante de força utilizada e r_0 é a posição inicial da molécula.

A energia potencial restritiva pode ser expressa como:

$$U'(r) = U(r) + W(r) \quad 2.24$$

O primeiro passo para a realização dessa técnica computacional é dividir a coordenada de reação em várias ‘janelas’, em que uma constante de força apropriada k_w é escolhida, fixando o soluto na posição da janela e assim garantindo a amostragem do espaço de fases através do caminho da coordenada de reação. A constante k_w deve ser capaz de providenciar uma suficiente sobreposição entre as janelas, sendo esta uma característica requerida para coletar informações precisas.

A distribuição obtida é uma distribuição do tipo não Boltzmann, portanto é preciso gerar um potencial de força médio não restritivo, obtido como uma média de Boltzmann da distribuição não Boltzmann usando a equação 2.25 [146]:

$$\langle G(r) \rangle_{\text{não restrito}} = \frac{\langle G(r) e^{W(r)/k_b T} \rangle}{\langle e^{W(r)/k_b T} \rangle_{\text{restrito}}} \quad 2.25$$

Sendo k_b a constante de Boltzmann e T a temperatura.

O sucesso da umbrella sampling depende fortemente da escolha da constante de força k_w : um k_w muito pequeno usualmente não é suficiente para restringir os graus de liberdade da molécula não amostrando todo o espaço de fases, e um k_w muito grande sempre resulta em uma

distribuição de formato estreita que requer um longo tempo de simulação para convergir, como mostra a figura 16.

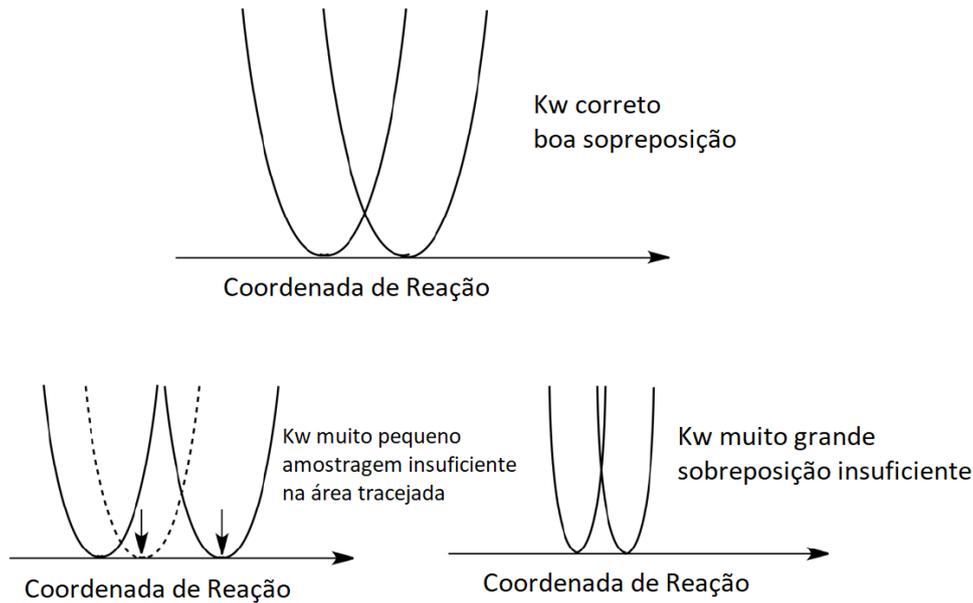


Figura 16: O efeito de K_w no método Umbrella Sampling. Para pequenos valores de K_w ocorre uma amostragem insuficiente dos histogramas, já para um k_w muito grande são necessárias muitas janelas de simulação para obter a sobreposição.

O método Weighted histogram analysis method (WHAM) [147] é uma rotina computacional utilizada para extrair a informação da distribuição não Boltzmann construindo assim o potencial de força média sem restrição. A equação do WHAM é:

$$\langle \rho(r) \rangle = \sum_{i=1}^{N_w} g_i^{-1} \cdot h_i(r) \cdot \left[\sum_{j=1}^{N_w} n_j g_j^{-1} e^{\frac{-[W_j(r)-F_j]}{k_B T}} \right]^{-1} \quad 2.26$$

e

$$e^{-F_i/k_B T} = \int e^{\frac{-W_i(r)}{k_B T}} \langle \rho(r) \rangle dr \quad 2.27$$

Sendo n_j o número total de pontos do histograma h . A ineficiência estatística g_i é dada por $g_i = 1 + 2\tau_i$, sendo τ_i o tempo de autocorrelação integrada para a janela i .

As duas equações 2.26 e 2.27 devem ser resolvidas de forma auto consistente, que é alcançada resolvendo-as iterativamente até as duas serem satisfeitas. Com o objetivo de

encontrar os valores de F_j , e assim obter o perfil de energia livre, coloca-se na equação 2.26 valores arbitrários de F_j , e obtém-se uma densidade de estados aproximada, com esse novo valor de densidade de estados, coloca-se na equação 2.27 e obtém novos valores das energias livres F_j , esse processo é repetido até a convergência dos valores.

Para a obtenção das energias livres, nesse trabalho foi utilizada a constante de força kw de 1000 kJ/mol, e o eixo z (normal ao plano da bicamada) foi dividido em 85 janelas separadas por 0,1 nm cada. A primeira e a última janela se encontram totalmente na fase aquosa, sendo que nas janelas intermediarias temos a molécula de anandamida passando pela bicamada de DOPC.

Para a obtenção das janelas, foi desenvolvido um script em BASH, aumentando em cada janela o valor do eixo z do soluto o valor de 0,1 nm. Para diminuir os conflitos estéricos, uma minimização de energia era realizada, seguida de uma simulação NVT e NPT, para então uma nova simulação de coleta de dados. Os tempos para a DM de coleta variaram de 10ns a 70ns, onde o critério de parada foi a convergência da curva de energia livre.

2.13 Perfil de Pressão Lateral

A pressão para um sistema não homogêneo pode ser representada por um tensor $\mathbf{P}(\mathbf{r})$ que depende da localização \mathbf{r} . Este tensor pode ser escrito como a soma de uma componente cinética, σ_K , e uma componente configuracional, σ_C :

$$\mathbf{P}(\mathbf{r}) = -\sigma_K(\mathbf{r}) - \sigma_C(\mathbf{r}) \quad 2.28$$

A contribuição cinética para o tensor da pressão local σ_K , é definido como [148]:

$$\sigma_K^{\alpha\beta}(\mathbf{r}, t) = - \sum_i m_i v_i^\alpha v_i^\beta \delta(\mathbf{r} - \mathbf{r}_i) \quad 2.29$$

onde m_i , v_i e \mathbf{r}_i são a massa, velocidade e localização do átomo i .

A segunda componente é a parte configuracional do tensor, definida como [149,148]:

$$\sigma_C^{\alpha\beta}(\mathbf{r}, t) = \sum_i \sum_{j<i} \mathbf{F}_{ij} \times \oint_{Cij} dl^\beta \delta(\mathbf{r} - 1) \quad 2.30$$

Onde C_{ij} é o contorno da partícula i até j , e \mathbf{F}_{ij} é a força exercida pela partícula j na i . Para a pressão total essa definição é igual à definição do virial. Porém em um meio não homogêneo, a distribuição da pressão depende do contorno utilizado, cuja correta definição sobre estas condições está ainda sob discussão [148,150,151,152,153];

Tradicionalmente dois contornos são sugeridos: o contorno Irving-Kirkwood, que é uma linha reta entre as duas partículas [154], e o contorno de Harasima [155] que segue o eixo das coordenadas. O pacote computacional utilizado GROMACS-LS [156] utiliza o contorno de Irving-Kirkwood, e portanto, será o contorno utilizado neste trabalho.

As equações 2.28, 2.29 e 2.30 fornecem a distribuição de pressão para um modelo de partículas pontuais que apresentam interações do tipo par aditivo. A dinâmica molecular tradicional fornece a coordenada e velocidade das partículas sendo possível assim calcular o tensor da pressão.

Para calcular a pressão lateral de bicamadas planas divide-se a membrana em fatias perpendiculares ao vetor normal a membrana e calcula-se o tensor da pressão lateral em cada fatia. Para isso modificam-se as equações 2.29 e 2.30, utilizando uma função delta de Dirac em 2.29 e discretiza-se o contorno em 2.30. As forças entre as partículas são calculadas pelos potenciais de interação, e soma-se sobre todos os pares formados [149,156], como mostrado na equação 2.31.

$$\mathbf{P}^{\alpha\beta}(\mathbf{R}, t) = \sum_{i \in \text{fatia}} m_i v_i^\alpha v_i^\beta + \sum_m \frac{1}{m V_{\delta z}} \sum_{\langle j \rangle} \sum_{\langle k,l \rangle} (\nabla_{jk}^\alpha U^m - \nabla_{jt}^\alpha U^m) r_{jkt}^\beta f(z_{jk}, z_{jt}, z_s) \quad 2.31$$

$f(z_{jk}, z_{jt}, z_s) = 0$ se as partículas estiverem no mesmo lado da fatia, $f(z_{jk}, z_{jt}, z_s) = 1$ se as duas partículas estiverem dentro da fatia, $f(z_{jk}, z_{jt}, z_s) = \frac{\delta z}{|z_{jk} - z_{jt}|}$ se as partículas estiverem em lados diferentes da fatia e $f(z_{jk}, z_{jt}, z_s) = \frac{d_z}{|z_{jk} - z_{jt}|}$ se apenas uma partícula estiver na fatia.

Onde d_z é a distância da partícula analisada que está dentro da fatia a parede da fatia que separa as duas partículas, δz e $V_{\delta z}$ são a espessura e o volume da fatia, respectivamente. O símbolo $\langle j \rangle$ representa a soma sobre todos os m -clusters do sistema, e $\langle k,l \rangle$ descreve a soma sobre todas as possíveis partículas dentro de um m -cluster.

A pressão local pode ser representada por um tensor que pode ser calculado por fatias em uma simetria planar. Em bicamadas fluídas as componentes não diagonais são zero em uma geometria planar, e, portanto, o tensor pode ser escrito como [157]:

$$\mathbf{P}(\mathbf{r}) = e_x e_x p_{xx}(\mathbf{r}) + e_y e_y p_{yy}(\mathbf{r}) + e_z e_z p_{zz}(\mathbf{r}) \quad 2.32$$

Definindo z como a direção normal a membrana para uma bicamada planar, a pressão lateral nas bicamadas lipídicas pode ser escrita como:

$$p(z) = p_L(z) - p_{zz}(z) \quad 2.33$$

Pela condição de equilíbrio mecânico $\nabla \cdot \mathbf{P} = 0$, resulta que para a superfície com simetria planar, a pressão normal p_{zz} é constante.

Para o cálculo da pressão lateral, foi utilizado a versão do GROMACS-LS [158,159,160]. Para isso devemos centralizar a bicamada e realizar um re-run da trajetória da simulação tradicional, porém como o tratamento eletrostático PME não é suportado, foi utilizado o cut-off com um raio de corte de 2,0nm. O tutorial disponibilizado pelo programa está no Anexo.

Considerando que a bicamada esteja centrada em $z=0$, o limite de integração varia de $z=-d/2$ até $z=d/2$, ou seja, a integração em toda a bicamada. A relação entre os momentos e as propriedades elásticas são mostradas nas equações 2.34 e 2.35 [161]:

$$\kappa c_0 = \int_{-d/2}^{d/2} z \cdot p(z) dz = M_1 \quad 2.34$$

$$\bar{\kappa} = \int_{-d/2}^{d/2} z^2 \cdot p(z) dz = M_2 \quad 2.35$$

Sendo z a coordenada normal a bicamada, $z=0$ representa o centro da bicamada e d é a espessura da bicamada. c_0 , κ e $\bar{\kappa}$ se referem as propriedades elásticas da bicamada, sendo κ o módulo de curvatura, c_0 a curvatura espontânea e $\bar{\kappa}$ é o modulo de curvatura gaussiana. M_1 e M_2 são o primeiro e segundo momento da PL, respectivamente.

Os modelos utilizados nesta tese, são baseados na análises termodinâmica de Cantor [71]. Nesse modelo de mecanismo indireto, assume-se que a proteína de membrana possa assumir dois estados, ativo (a) ou inativo (i), e essa ativação é associada a uma mudança conformacional da proteína, passando do estado $i \rightarrow a$.

Considerando que a área da seção transversal da proteína no domínio transmembrânico para cada um dos dois estados seja, $A_i(z)$ e $A_a(z)$, e esta irá variar com a posição relativa a membrana, ou seja, o eixo z , define-se a mudança na área que acompanha uma transição como:

$$\Delta A(z) = A_a(z) - A_i(z) \quad 2.36$$

A bicamada é caracterizada por uma densidade de pressão lateral $p(z)$ que depende de sua composição, como discutido na seção anterior. A inserção de pequenos solutos e diferentes composições resultam em uma redistribuição das pressões laterais. Definindo a pressão lateral sem soluto como $p_0(z)$, podemos descrever as mudanças no perfil de pressão lateral quando ocorre a inserção de soluto como:

$$\Delta p(z) = p(z) - p_0(z) \quad 2.37$$

Definindo $[a]_0$ e $[i]_0$ como as concentrações dos estados da proteína na ausência de soluto (ou seja, na configuração standard), a conformação de equilíbrio (K) será a razão entre a concentração no estado ativo pela concentração do estado inativo, mostrado pela equação 2.38.

$$K = \frac{[a]_0}{[i]_0} \quad 2.38$$

Dessa maneira, a fração de proteínas ativas no estado estacionário (F_0), pode ser representado como:

$$F_0 = \frac{1}{(1 + K^{-1})} \quad 2.39$$

Na presença de soluto, as concentrações de proteínas ativas e inativas serão representadas por $[a]$ e $[i]$, respectivamente, e a fração de proteína no estado ativo será denominada F . A

relação entre F e F₀ é obtida igualando os potenciais químicos dos dois estados da proteína, primeiro na ausência de soluto e depois na presença do mesmo. Para uma boa aproximação a dependência do potencial químico com a proteína em cada estado conformacional em sua concentração e distribuição de pressão tem uma forma simples, (cantor 1997 a); para a conformação ativa (a):

$$\frac{\mu_a}{RT} = \frac{\mu_a^0}{RT} + \ln[a] + \frac{1}{k_b T} \int p(z) A_a(z) dz \quad 2.40$$

Onde R é a constante dos gases, k_b é a constante de Boltzmann e T é a temperatura absoluta, uma expressão análoga é obtida para o estado inativo (i). No equilíbrio:

$$\Delta\mu = \mu_a - \mu_i = 0 \quad 2.41$$

$$0 = \frac{\Delta\mu^0}{RT} + \ln \frac{[a]}{[i]} + \frac{1}{k_b T} \int p(z) \Delta A(z) dz \quad 2.42$$

Essa igualdade deve permanecer no estado estacionário (sem soluto) com pressão p₀(z).

$$0 = \frac{\Delta\mu^0}{RT} + \ln \frac{[a]_0}{[i]_0} + \frac{1}{k_b T} \int p_0(z) \Delta A(z) dz \quad 2.43$$

Tirando a diferença das equações 2.43 e 2.42, chegamos a:

$$\frac{[a]}{[i]} = K e^{-\alpha} \quad 2.44$$

$$\alpha = \frac{1}{k_b T} \int \Delta p(z) \Delta A(z) dz \quad 2.45$$

A fração de proteína na conformação ativa será dada por:

$$F = \frac{1}{(1 + K^{-1} e^{\alpha})} \quad 2.46$$

Para a adição de um soluto com a concentração “X”, o efeito do perfil de pressão será aproximadamente linear para baixas concentrações, então podemos definir $\beta = \alpha/X$.

O sinal de β determina se a adição de soluto aumenta ou diminui a fração de proteínas ativas, ou seja, se a proteína se ativa com o soluto, $\beta < 0$; $F_0 < F < 1$. Se ocorre inibição $\beta > 0$; $F_0 > F > 1$.

É comum expressar a fração de proteínas ativas em relação ao seu valor máximo F_{max} . Para inibição esse valor máximo ocorre na ausência de soluto ($X=0$), e então $F_{max}=F_0$, enquanto para a ativação, o valor máximo ocorre para grandes α , para os quais $F_{max}=1$.

Para a inibição a fração de proteínas ativas é dada pela equação:

$$f = \frac{F}{F_{max}} = \frac{(1 + K^{-1})}{(1 + K^{-1}e^{\beta X})} \quad 2.47$$

Enquanto para a ativação:

$$f = \frac{F}{F_{max}} = \frac{1}{(1 + K^{-1}e^{\beta X})} \quad 2.48$$

Dessa maneira conhecendo as concentrações de soluto e as variações de pressão lateral e de área devido a inserção de soluto em uma bicamada, podemos determinar se ocorrerá uma ativação ou inibição das proteínas de membrana transmembrânicas.

A obtenção da variação da área das proteínas ao transitar entre os estados (in)ativo é complicado, uma vez que não existem informações experimentais diretas das mudanças na área da seção transversal das proteínas em função de profundidade na bicamada, o que impossibilitaria a utilização da metodologia proposta acima. Dessa maneira, Cantor [162] propôs modelos geométricos que representariam essas mudanças conformacionais em termos de propriedades estruturais simples, sendo ele: a inclinação cooperativa e a hélice dobrada.

2.13.1 Inclinação cooperativa

Nesse modelo, as hélices podem ser aproximadas como cilindros bastante lisos, de modo que, como uma aproximação, o domínio transmembranar da proteína pode ser descrito como um feixe de bastões rígidos, uma representação deste modelo é mostrada na figura 17.

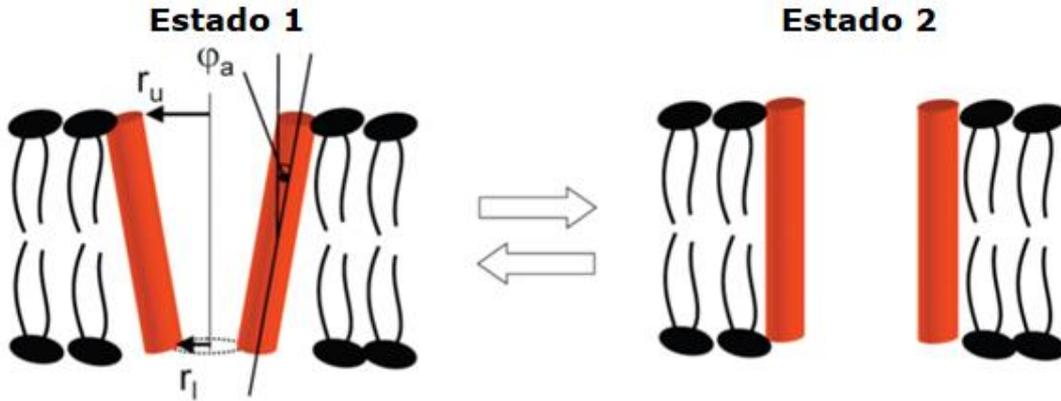


Figura 17: Esquemática do modelo de inclinação cooperativa, elucidando do raio da proteína e o ângulo de abertura do canal ϕ .

A mudança na forma do feixe pode então ser descrita usando uma representação geométrica simples, essencialmente idêntica ao efeito de pegar um feixe apertado de hastes rígidas compridas, cilíndricas e simétricas (por exemplo, lápis), segurando uma extremidade do feixe com uma mão e a outra com a outra mão e torcendo o feixe girando as mãos em direções opostas ao redor do eixo do feixe. Quando os eixos das hastes são paralelos e perpendiculares ao plano da bicamada, o pacote tem área transversal uniforme. À medida que o ângulo entre cada haste e o plano da bicamada diminui de 90° , o feixe se espalha em ambas as extremidades, a área da seção transversal aumentando não uniformemente, no maior grau na maior distância do centro do feixe.

Definindo o eixo z perpendicular a bicamada, e o plano x - y com $z=0$ é o centro da bicamada, e $2h$ é a espessura da membrana, a variação da área para transitar entre o estado ativo e inativo é dado pela equação mostrada na equação 2.49.

$$\Delta A(z) = \pi z^2 (\sin(\varphi_a)^2 - \sin(\varphi_i)^2) \quad 2.49$$

A variação da área ΔA depende apenas do ângulo de inclinação e da espessura da membrana. Este resultado é importante pois a inclinação de uma haste não interfere na inclinação das outras, mostrando que a variação da área independe do raio do grupo.

Aplicando a equação 2.49 na 2.45, se obtém o parâmetro α , mostrada na equação 2.50

$$\alpha = \frac{2\pi}{k_b T} (\sin(\varphi_a)^2 - \sin(\varphi_i)^2) \Delta M_2 \quad 2.50$$

O valor escolhido para $\sin(\varphi_a)^2 - \sin(\varphi_i)^2$ foi proposto pelo Cantor como sendo de 0,05, e utilizado neste trabalho.

2.13.2 Hastes Rígidas dobradas.

Nesse modelo, as hélices estão dobradas ao redor do centro da bicamada, cada hélice em um ângulo φ_0 , esta conformação pode ser aproximada com um par de secções cônicas truncadas, uma para cada monocamada, como ilustra a figura 18.

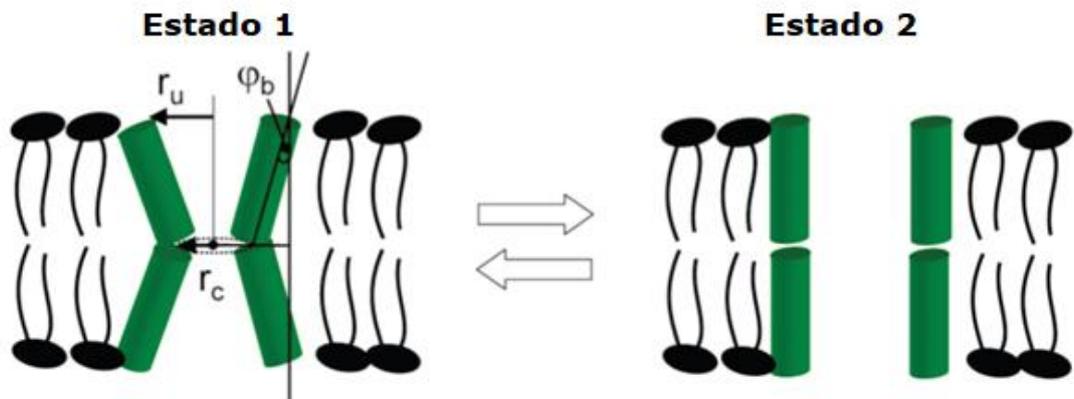


Figura 18: Esquematização do modelo das hastes dobradas rígidas, elucidando do raio da proteína e o ângulo de abertura do canal ϕ .

Os ângulos φ_{0+} e φ_{0-} entre os lados de cada seção cônica e o vetor normal a bicamada depende da orientação das hélices dobradas em relação ao vetor normal a bicamada. Por exemplo, para hélices dispostas simetricamente, φ pode variar entre $-\varphi_0/2$ até $\varphi_0/2$, os valores extremos (tendo a maior e a menor área de seção transversal, respectivamente) que ocorrem quando o plano definido pela hélice dobrada passa o valor do diâmetro da proteína. A figura 18 representa uma transição onde temos um valor de $\varphi_0/2$, ou seja, passando de um estado fechado para um aberto, o que representa uma ativação. Se o valor de $\varphi_0/2$ fosse negativo, a proteína estaria no estado inicial aberta e passaria para o fechado, representando uma inibição.

Para o caso geral, o raio ξ da seção transversal de um pedaço da proteína pode ser aproximada grosseiramente por uma função linear que depende do $|z|$, dessa maneira a variação da área para o estado s desse modelo pode ser obtido pela equação 2.51.

$$A_s(z) \approx \pi[\xi_s(z)]^2 \quad 2.51$$

E a dependência do raio com o eixo z para o estado s , pode ser descrito como:

$$\begin{aligned} \xi_s(z > 0) &\approx \xi_s(0) + |z| \tan \varphi_s^+ \\ \xi_s(z < 0) &\approx \xi_s(0) + |z| \tan \varphi_s^- \end{aligned} \quad 2.52$$

Aplicando a equação 2.52 na 2.45, encontra-se o parâmetro α , mostrada na equação 2.53

$$\alpha = \frac{\pi}{k_b T} \{2\Delta[\tan \varphi_s^+ + \tan \varphi_s^-] \cdot \xi_s(0) \Delta M_1 + \Delta[\tan^2 \varphi_s^+ + \tan^2 \varphi_s^-] \Delta M_2 \quad 2.53$$

Como o segundo termo é bem menor do que o primeiro, em geral α depende predominantemente do primeiro momento da PL, ou seja, $\kappa.c_0$. Nesse modelo, foi considerado que o raio da proteína é de 2nm, valor que representa o raio de um canal de íon, e foi considerada uma variação angular de $\Delta\varphi \approx 6^\circ$ para a transição de estados da proteína.

A utilização desses modelos leva a grandes possibilidades de resultados, dos momentos associados podemos obter o tipo de interação (ativação ou inativação) ocasionado pelo soluto ao interagir com a bicamada fosfolipídica e se estas alterações seriam suficientes para alterar o estado de proteínas transmembrânicas.

2.14 Simulações deste Trabalho

Para alcançar os objetivos propostos nesse trabalho, foram realizadas 7 simulações de equilíbrio e várias simulações com restrição de posição para obtenção da energia livre de Gibbs, utilizando o método denominado de Umbrella Sampling (US). Em todas as simulações a temperatura utilizada foi de 300K. Para as bicamadas de DOPC esse temperatura representa a fase líquido desordenada, uma vez que a temperatura de transição de fase para o DOPC é de 256K [163].

As simulações foram realizadas com o software Gromacs [164], utilizando o campo de força Gromos53A6 [125], as imagens foram feitas com a versão acadêmica do visualizador de estruturas Pymol [165]. Para o acoplamento de pressão semi isotropico foi utilizado o

Parrinello-Raman [134] e para a temperatura o Nose-Hoover [166,167,168], e o raio de corte para as interações eletrostáticas e de van der Waals foi de 1,2nm. Para a simulação em água o acoplamento de temperatura e pressão foi o Berendsen [169]

Para as dinâmicas de equilíbrio, a bicamada de DOPC obtida na referência [143] foi transladada e 12 moléculas de anandamida foram inseridas no centro da membrana, sendo que 6 moléculas tinham a cabeça polar voltada para a face positiva, e 6 para a face negativa, uma foto da configuração de partida da simulação com 12 AEA's esta mostrada na figura 19. Para as demais simulações foram retiradas moléculas de cada face, variando a quantidade de AEA's de 12 para 2.

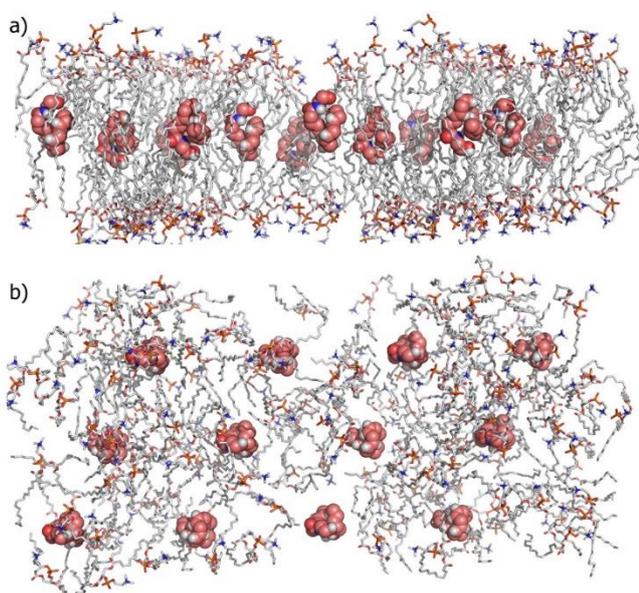


Figura 19: Configuração inicial da simulação de equilíbrio, em a) imagem lateral e b) vista de topo.

Para as simulações da Umbrella Sampling, 85 configurações iniciais foram geradas, chamadas de janelas, na figura 20 apenas algumas são mostradas: o início das simulações, referente a janela 1 está mostrada na figura com a cor alaranjado, e a janela 85 pela cor azul. O potencial restritivo para a anandamida nas janelas da US foi de 1000 kJ/mol, e o tempo de simulação variou de 10 a 70ns.

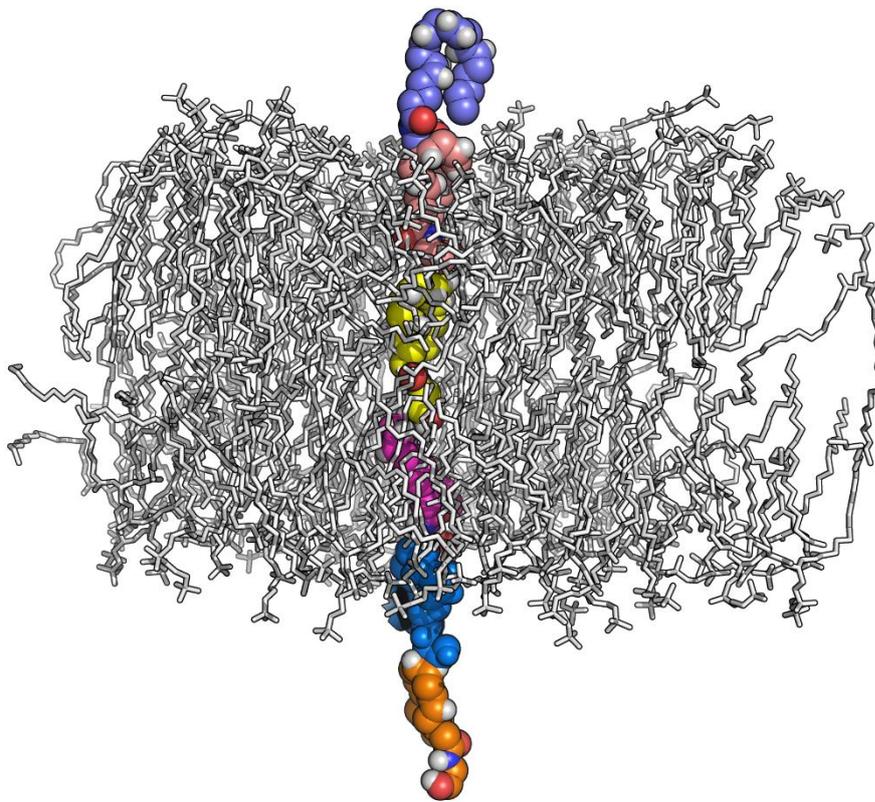


Figura 20: Algumas configurações iniciais para as janelas da "Umbrella Sampling", em laranja a representação da janela 1, e em azul da janela 85.

Um resumo das simulações realizadas, especificando a quantidade de água/lipídio, tempo de simulação para a simulação NVT, NPT, equilíbrio e produção estão mostradas na tabela 1.

Tabela 1. Especificações das simulações realizadas nesse trabalho.

Simulação	Água/lipí dio	Minimização de Energia (Passos)	NVT (ps)	NPT (ps)	Tempo Equilibração (ns)	Tempo Produção (ns)
AEA-água	7183 moléculas	7000	-	-	50	50
DOPC	56	5000	100	10000	500	100
2AEA	56	5000	100	10000	400	100
4AEA	56	5000	100	10000	400	100
6AEA	56	5000	100	10000	400	100
8AEA	56	5000	100	10000	400	100
12AEA	56	5000	100	10000	400	100
U S	100	7000	100	10000	-	10, 50 e 70

3. Simulação em Água

A água é a molécula mais abundante nos seres vivos, compreendendo cerca de 60% de sua massa total [170]. Nas células ocupa papel fundamental como solvente das reações químicas, dessa maneira a primeira simulação computacional realizada foi nesse importante solvente.

A simulação em água tem como objetivo principal estudar as conformações da molécula de anandamida quando está inserida em um ambiente totalmente hidrofílico. Por ter um caráter anfipático, com a cabeça hidrofílica e cauda hidrofóbica, espera-se que a AEA adote uma conformação que esconda seus grupos hidrofóbicos das moléculas de água, sendo as possíveis conformações o alvo desse capítulo de investigação.

A simulação foi conduzida posicionando uma molécula de AEA no centro de uma caixa cúbica com volume médio de $7,3 \text{ nm}^3$, essa caixa foi solvatada por 7183 moléculas de água e submetida aos passos usuais de equilibração, seguidos por 100ns de dinâmica molecular de equilíbrio para a coleta de dados. A estrutura inicial da anandamida foi obtida do PDB 4AZP [171], e os 50 ns finais foram utilizados para análises.

O equilíbrio termodinâmico ficou caracterizado pela flutuação das energias total, potencial, mostrada na figura 21, e cinética ao redor de valores médios, com um ajuste linear com coeficiente angular de uma parte em 10^7 do valor significativo da energia, ou seja, $\Delta E/E \sim 10^{-7} \text{ ns}^{-1}$. Para a temperatura e volume da caixa, outros parâmetros de controle, o comportamento é essencialmente o mesmo, com os valores de equilíbrio em $300 \pm 2 \text{ K}$ para a temperatura e $7,307 \pm 0,03 \text{ nm}^3$ para o volume da caixa.

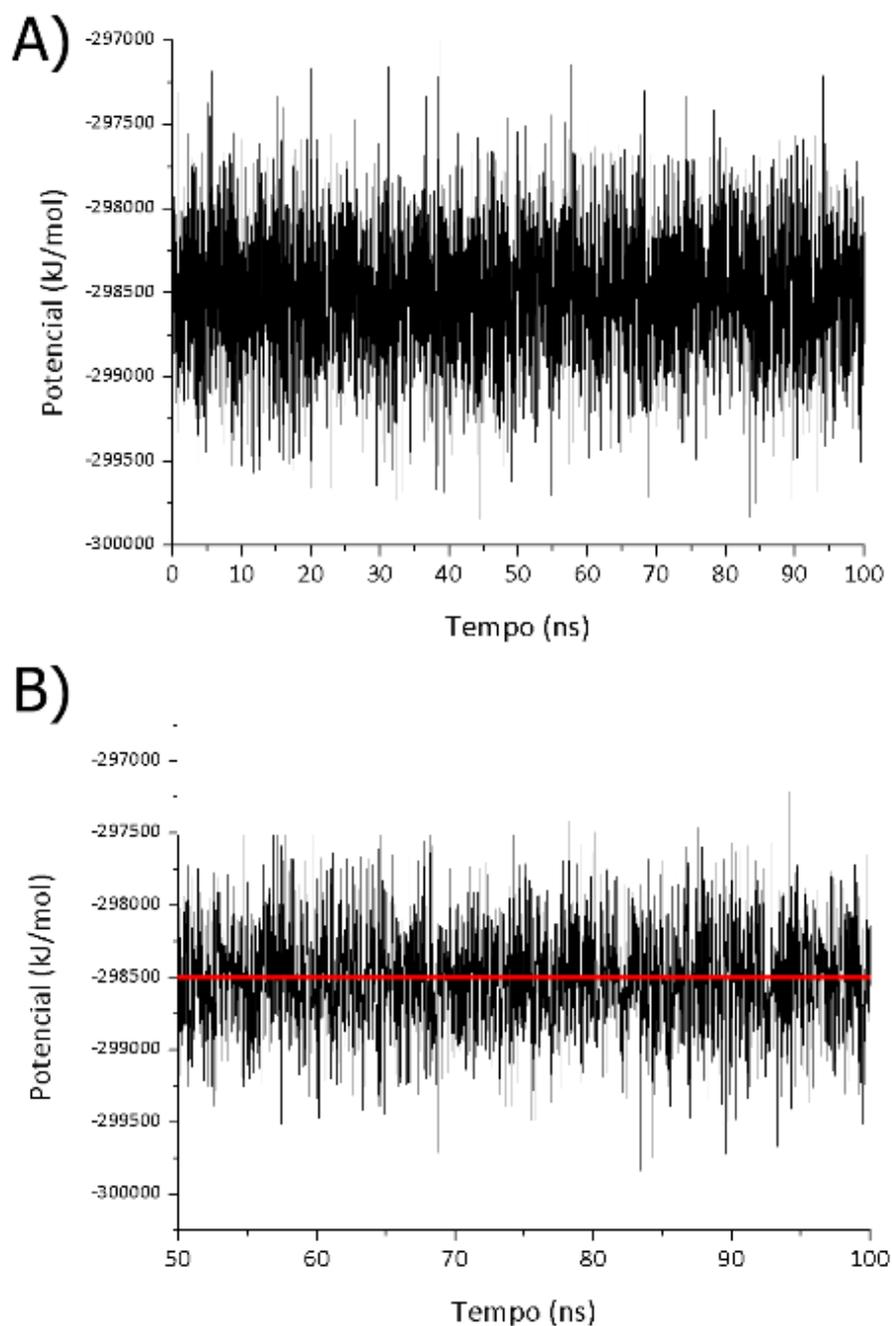


Figura 21: Gráficos de Energia Potencial para a simulação em água, em a) para o tempo total de 100ns e b) para o tempo de 50ns, onde a linha vermelha representa o ajuste linear dos dados.

3.1 Conformação AEA

Um conjunto de características estruturais da anandamida simulada em água, tais como o raio de giro R_g , a área acessível ao solvente, AAS, a distância média entre o átomo de nitrogênio e o carbono terminal da cauda, d_{N-C} , e a distância média entre o primeiro átomo de

oxigênio da cabeça e o átomo de carbono terminal da cauda, d_{O-C} , estão disposto na Tabela 2, comparados aos valores obtidos da estrutura inicial do PDB.

Tabela 2. Características estruturais da anandamida simuladas em água, R_g é o raio de giro da molécula, AAS é a área acessível ao solvente, d_{N-C} , é a distância média entre o átomo de nitrogênio da AEA ao carbono terminal da cauda, e d_{O-C} é a distância média entre o primeiro átomo de oxigênio da cabeça do AEA com seu carbono terminal.

<i>Propriedades</i>		<i>PDB</i>
R_g (nm)	$0,53 \pm 0,11$	0,52
AAS (nm ²)	$6,08 \pm 0,47$	6,49
d_{N-C} (nm)	$1,18 \pm 0,48$	0,995
d_{O-C} (nm)	$1,26 \pm 0,55$	1,062

O raio de giro (R_g) pode ser associado à compactação das moléculas. Dessa forma quanto menor seu valor, menor será o raio de uma esfera fictícia que a contém. A área acessível ao solvente pode indicar se o solvente ao qual o soluto está inserido é de natureza semelhante, por exemplo, um soluto polar teria uma grande exposição de seus grupos se estivesse também em um ambiente polar, porém se o solvente fosse apolar, provavelmente o valor da área acessível ao solvente cairia, pois a molécula tentaria esconder seus grupos polares do solvente. A distância média entre átomos específicos da anandamida, também pode ser utilizado como um parâmetro estrutural, por seu uma molécula grande, e ter uma cauda acíclica de 20 átomos, a anandamida possui grande liberdade estrutural, mesmo com tal liberdade, espera-se que a molécula tenha algumas conformações preferenciais, dessa maneira a medida da distância entre seus grupos cabeça e cauda ajudam a elucidar essas estruturas.

Os valores dispostos na Tabela 2, mostram o valor médio para o raio de giro de $0,53 \pm 0,11$ nm, estes resultados estão condizentes com dados publicados na literatura, onde foi encontrado um valor de 0,58 nm [172] para a água como solvente. Estes autores, utilizaram o método de Monte Carlo para explorar a liberdade conformacional da cadeia acíclica do AEA, considerando o solvente de forma implícita. Resultados recentes na literatura [173] discutem as vantagens da utilização de modelos explícitos para a água sobre aqueles em que o solvente é tratado implicitamente, quando comparados aos resultados experimentais.

Para as demais grandezas mostradas na tabela 2, não há dados na literatura para comparação, razão pela qual eles foram comparados aos valores dessas grandezas obtidos da estrutura cristalográfica da anandamida depositada no PDB com o código 4AZP, e utilizada

como estrutura de início nas simulações. Esta estrutura da anandamida foi obtida complexada com a proteína FABP5, como mostra a figura 22.

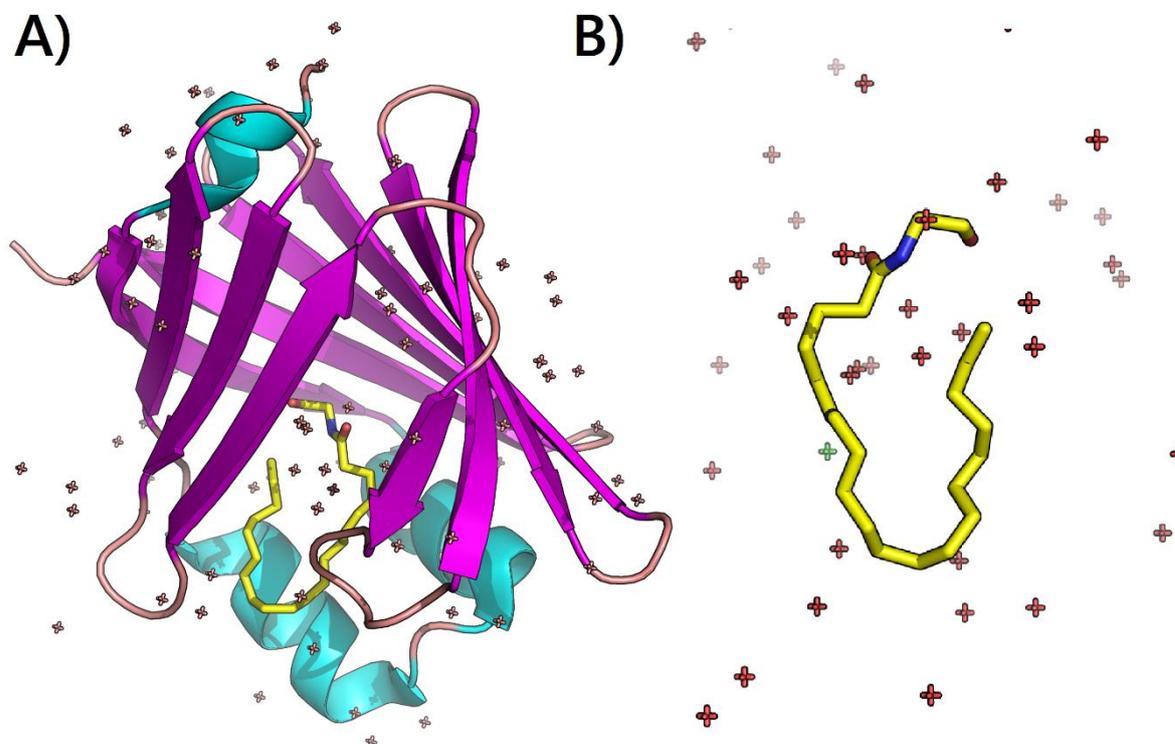


Figura 22: Representação do PDB 4AZP, em A) temos o complexo anandamida FABP5 e as moléculas de água em vermelho, em B) somente a estrutura cristalográfica da anandamida e as moléculas de água que a solvatam.

Da figura 22 A), nota-se que a anandamida está inserida na proteína, porém com uma grande quantidade de moléculas de água ao seu redor. Da parte B) da figura 22 é possível associar uma conformação parecida com a letra J, e uma molécula bem compacta.

Comparando os valores médios obtidos da simulação com aqueles obtidos da estrutura cristalográfica para as grandezas mostradas na tabela 2, observa-se que os valores do raio de giro são praticamente os mesmos, porém o valor da área acessível ao solvente é maior para a estrutura cristalográfica e os valores médios obtidos da simulação para as distâncias d_{N-C} e d_{O-C} , representativas da distância entre extremos da anandamida, são maiores do que os da estrutura cristalográfica. É igualmente evidente da Tabela 2 que os valores das grandezas consideradas, obtidas da estrutura cristalográfica, estão contidos nas barras de erro dos valores das correspondentes grandezas simuladas. Isso significa que a conformação cristalográfica é uma dentre diferentes conformações visitadas pela dinâmica molecular. Isso é relevante, uma vez que a cadeia acilíca da anandamida tem uma considerável liberdade conformacional,

representada pelas torções dos pares de ângulos diedrais que separam as insaturações da cadeia e que a dinâmica realizada é capaz de visitar tais conformações. A estrutura cristalográfica é uma dessas possíveis conformações e, a despeito de apresentar uma área acessível ao solvente maior ela é estável na estrutura cristalográfica devido as imposições estéricas do restante da proteína em seu equilíbrio, inclusive com as águas cristalográficas.

Como mostrado na figura 15, a anandamida é composta de uma cabeça polar, e uma cauda acíclica contendo 20 átomos de carbono e 4 duplas ligações, entre os átomos de carbono C5=C6, C8=C9, C11=C12 e C14=C15. Estas duplas ligações são precedidas e seguidas por pelo menos duas ligações simples, em torno das quais a molécula pode apresentar uma grande liberdade conformacional, influenciando em sua estruturação. Para avaliar as possíveis estruturas formadas pela AEA, foram analisados os ângulos diedrais de sua cadeia acíclica, em particular aqueles nominados na tabela 3.

Tabela 3. Nomenclatura dos ângulos diedrais analisados para determinação da estrutura da AEA, estes átomos estão mostrados na figura 15.

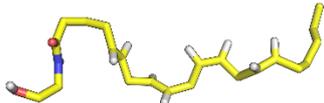
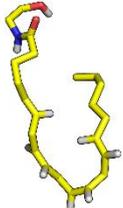
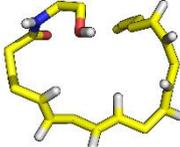
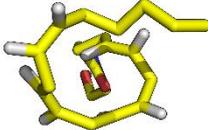
NOMENCLATURA	CARBONOS
ω_5	C5=C6-C7-C8
ω_6	C6-C7-C8=C9
ω_8	C8=C9-C10-C11
ω_9	C9-C10-C11=C12
ω_{11}	C11=C12-C13-C14
ω_{12}	C12-C13-C14=C15

As conformações foram analisadas seguindo a metodologia usada por Bennett e Norris em 1998 [172]. Nesse trabalho os autores analisam a superfície de energia separadamente para cada par de ângulos (ω_5 , ω_6), (ω_8 , ω_9) e (ω_{11} , ω_{12}), variando de 10 em 10 graus, em dois ambientes, um hidrofílico, água, e outro hidrofóbico, clorofórmio CHCl₃, tratados implicitamente. A partir dos mínimos de energia encontrados nessas superfícies, eles geram milhares de cadeias usando o método de Monte Carlo. As conformações podem ser classificadas pelo sinal dos respectivos pares de ângulos torcionais. Quando os ângulos possuem todos os mesmos sinais a cauda da anandamida apresenta uma conformação estendida, I. Para ângulos com sinais trocados a conformação apresenta algum tipo de curvatura. A conformação é denominada J se os ângulos do par (ω_5 , ω_6) tem sinais opostos e os demais são do mesmo sinal, a curvatura apresenta-se próxima ao final do ácido carboxílico. A forma em U ocorre se os

ângulos dos pares (ω_5 , ω_6) e (ω_{11} , ω_{12}) têm sinais opostos, introduzindo curvatura próximas aos dois finais da molécula e se os ângulos dos pares (ω_5 , ω_6), (ω_8 , ω_9) e (ω_{11} , ω_{12}) tem sinais opostos a estrutura resultante é helicoidal.

A tabela 4, mostra as estruturas visitadas pela dinâmica molecular com os respectivos tempos (proporção de frames numa conformação em relação ao número total de frames) para a anandamida em água.

Tabela 4. Porcentagens das estruturas encontradas na simulação da anandamida em água. No ambiente aquoso 40,2% das estruturas estão na conformação em U, seguida de 23,4% na estruturação em J, 13,5% na conformação em H e 9% na conformação I. Uma imagem representativa das estruturas estão mostradas na terceira coluna.

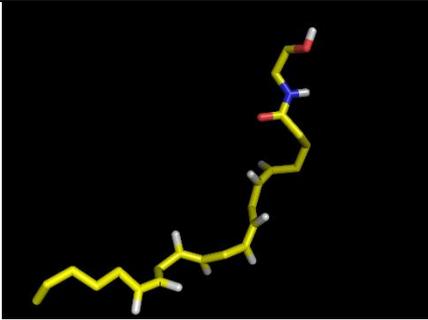
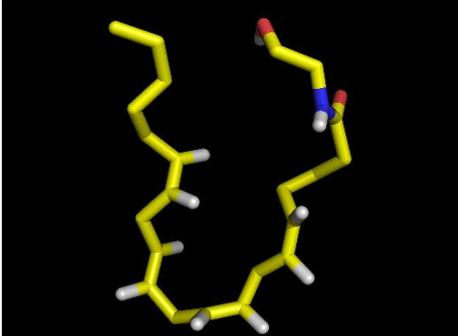
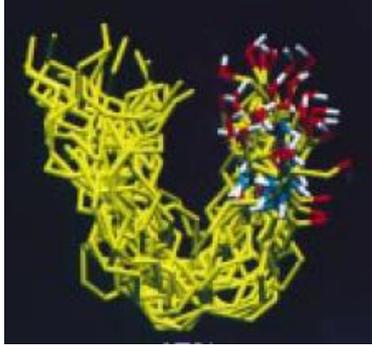
Estrutura	% tempo	Figura
I	9	
J	23,4	
U	40,2	
H	13,5	

Os resultados obtidos mostram que a anandamida em água, tem a forma U (40,2%) como conformação preferencial, seguida das formas J (23,4%) e hélice (H) com 13,5%, e somente 9% das conformações encontradas são estendidas (I). Esse resultado está de acordo com o esperado pois, devido ao caráter anfipático da anandamida, as conformações dobradas permitem esconder melhor os grupos hidrofóbicos da cauda das moléculas de água.

Estes resultados são qualitativamente equivalentes àqueles obtidos por Bennett e Norris em 1998 [172], que obtiveram, para a água, predominantemente (73%) uma conformação híbrida entre a conformação estendida e em U, sendo seguida pela conformação em U (17%).

Utilizando a ferramenta *g_cluster* do Gromacs, com um raio de corte de 0,25 nm e utilizando o método *gromos*, foi possível classificar todas as estruturas geradas na dinâmica em 20 clusters, sendo os dois mais populados apresentados na tabela 5.

Tabela 5. Comparação entre os resultados de análise de clusters (uma estrutura típica) obtidos da simulação em água, e os obtidos na referência [172].

	%	Conformação	Literatura
1º Cluster	52,7		
2º Cluster	27,5		

Dos 20 clusters encontrados, o primeiro e o segundo, compreendem cerca de 70% das estruturas presentes na simulação. A conformação representativa de cada cluster está mostrada na tabela 5, sendo comparada com a estrutura obtida pelo Bennet e Norris [172].

É notória a semelhança entre as estruturas encontradas em nosso trabalho e o da literatura, porém há uma grande diferença nas porcentagens encontradas, enquanto nesse trabalho a conformação híbrida representa 52,7% das estruturas encontradas, na literatura se encontrou um valor de 73%. Para a conformação em U, os resultados ficam bem próximos, ambos por volta de 27%.

As diferenças nas porcentagens podem estar relacionadas a várias possibilidades, dentre elas, os diferentes métodos, Monte Carlo (MC) e dinâmica molecular (DM), a temperatura (300 K neste trabalho, enquanto no trabalho de Benett e Norris ela varia de 2700 a 310 K), o tipo de tratamento dado ao solvente (explicitamente representado neste trabalho, enquanto no de Benett e Norris ele é tratado implicitamente).

3.2 Discussão

O objetivo deste capítulo era estudar as propriedades estruturais e conformações da anandamida quando inserida em um meio hidrofílico. Sendo uma molécula anfipática, as conformações esperadas para a AEA seriam compactadas, tentando esconder sua cauda acíclica e hidrofóbica das moléculas de água.

Através da análise dos pares de ângulos diedrais, chega-se que a conformação preferencial da anandamida é em um formato parecido com a letra U, seguida da conformação J, hélice (H) e por último a conformação estendida (I). Estes resultados estão de acordo com o esperado para essa molécula anfipática, pois mostram que a preferência da AEA é manter uma estrutura dobrada, tentando diminuir a área de exposição ao solvente da sua cadeia acíclica, e conseqüentemente tendo um valor baixo de raio de giro, refletindo uma maior compactação.

A comparação dos resultados obtidos da DM para as grandezas selecionadas com aquelas correspondentes obtidas da estrutura cristalográfica depositada no PDB, mostram que esta conformação, em J, está entre as conformações significativamente visitadas na dinâmica, embora não tenha sido a conformação predominantemente visitada. Isso parece natural uma vez há um conjunto de condicionantes impostos pela proteína com a qual a estrutura foi determinada e o estado físico do sistema para que a determinação cristalográfica pudesse ser realizada.

4. Umbrella Sampling

A energia livre de Gibbs é uma função termodinâmica que contém as informações necessárias para a descrição de um sistema. Contudo, da dinâmica molecular tradicional não é possível obter essa função, pois o espaço de fases não é amostrado suficientemente. Dessa maneira utiliza-se a técnica computacional denominada “Umbrella Sampling” (US) para forçar o sistema visitar pontos do espaço conformacional que não seriam acessados somente pela simulação clássica.

Neste trabalho, essa técnica foi utilizada para investigar a posição de mínima energia da anandamida quando ela atravessa uma bicamada fosfolipídica, permitindo obter o perfil de energia livre através de um caminho de reação. Como mostrado na seção 2.12, escolhe-se uma coordenada de reação, divide-se esse caminho num número suficientemente grande de janelas, aplica-se uma função potencial que restrinja os movimentos do centro de massa da molécula (AEA) aos limites da janela em questão, permitindo que o sistema visite de forma significativa o espaço conformacional do sistema em cada janela. Por meio de uma repesagem apropriada dos perfis de energia de cada janela é possível obter o perfil de energia livre. O caminho de reação escolhido foi a distância do centro de massa da anandamida ao longo do eixo z, que é a direção normal ao plano da bicamada lipídica, até o centro da bicamada. A molécula de anandamida foi transladada em intervalos de 0,1 nm, até atravessar a membrana, obtendo o perfil de energia livre mostrado na figura 23.

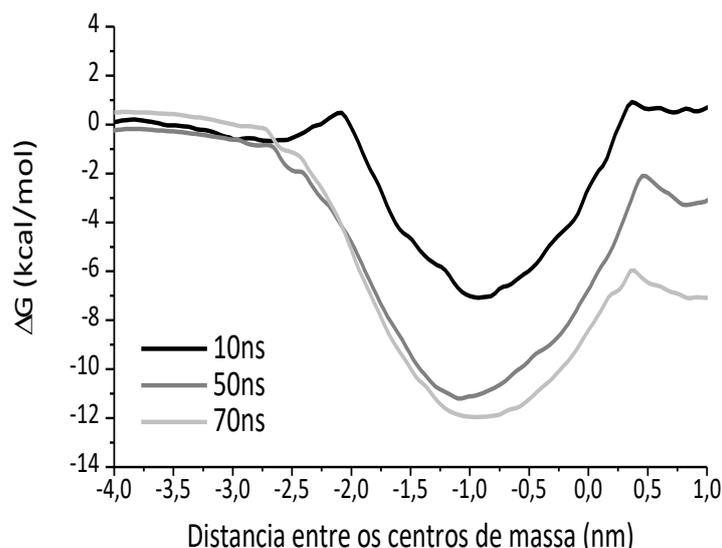


Figura 23: Perfis de energia livre de Gibbs obtidas pela técnica Umbrella Sampling; As diferentes curvas são devido a diferentes tempos de simulações nas janelas, a curva preta, cinza e cinza claro representam o tempo de 10ns, 50ns e 70ns, respectivamente.

A figura 23 mostra o resultado da US para três tempos diferentes, quando as janelas foram simuladas em 10, 50 e 70ns. Essas simulações tem o intuito de mostrar a convergência do método, uma vez que mesmo tendo os histogramas corretamente sobrepostos, devemos assegurar que a molécula em estudo tem tempo suficiente para passear pelo espaço configuracional, fornecendo resultados sólidos de energia livre. Da figura 18, podemos perceber uma pequena variação da profundidade do mínimo de energia em relação a simulação de 50 e 70ns, esse resultado indica a convergência das simulações realizadas. Tendo a confiança dos resultados convergentes, a próxima análise é dos histogramas.

A figura 24 mostra a sobreposição dos histogramas, devido à grande quantidade de simulações, a figura mostra a sobreposição de apenas 7 janelas, porém o histograma foi cuidadosamente analisado para averiguar possíveis regiões de baixa amostragem. Em nenhum trecho do histograma obtemos resultados diferentes dos mostrados na figura 24, indicando alto grau de sobreposição assegurando assim confiabilidade nos resultados obtidos.

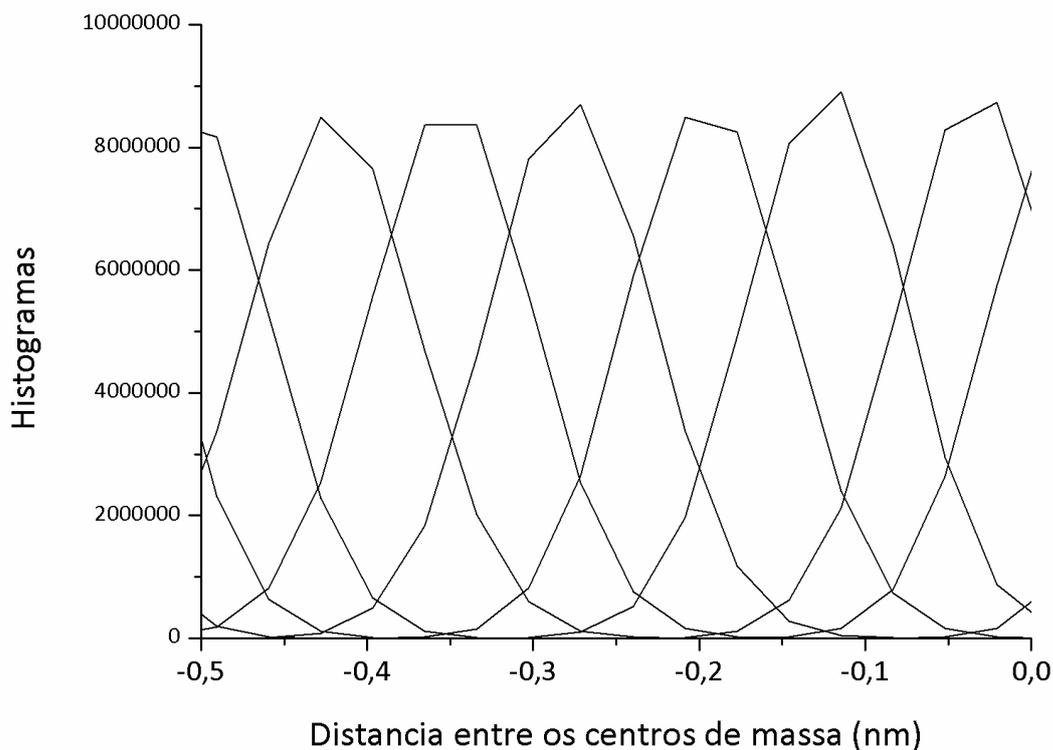


Figura 24: Histogramas das simulações da Umbrella Sampling para a simulação de 70ns.

Os resultados de energia livre obtidos através da umbrela sampling mostram que a anandamida tem seu mínimo de energia inserida na bicamada de DOPC, na posição relativa de 1 nm entre o centro de massa da AEA e o centro de massa da bicamada. Para entender quais são as características estruturais, posições e interações realizadas nesse ponto de mínima energia, foi analisada a janela 46 da simulação de 70ns, correspondente a simulação de mínima energia. Os resultados estão mostrados nos itens subsequentes.

4.1 Conformações da AEA

A tabela 6 mostra os dados estruturais obtidos pela simulação em água e os dados obtidos na simulação do ponto de mínimo de energia livre.

Tabela 6. Propriedades estruturais da anandamida simuladas em água e da simulação da janela 46 da Umbrella Sampling (janela que representa a posição de mínima energia), onde R_g é o raio de giro da molécula, AAS é a área acessível ao solvente, d_{N-C} é a distância média entre o átomo de nitrogênio da

AEA ao carbono terminal da cauda, e d_{O-C} é a distância média entre o primeiro átomo de oxigênio da cabeça do AEA com seu carbono terminal.

	R _g (nm)	AAS (nm ²)	d _{N-C} (nm)	d _{O-C} (nm)
Água	0,53 ±0,11	6,08 ±0,47	1,18 ±0,48	1,26 ±0,55
US	0,67 ±0,08	6,52 ±0,26	1,73 ±0,35	1,86±0,42

Comparando os dois meios (água e DOPC) vemos que ao se inserir na bicamada o raio de giro da anandamida aumenta, indiciando que sua conformação foi alterada, um valor maior de raio de giro poderia indicar que a AEA estaria em uma conformação mais estendida se comparada a simulação em água. Ao comparar a área acessível ao solvente (AAS) encontramos um valor maior para a simulação em bicamada, esse maior valor está relacionado ao seu caráter hidrofóbico, em água a AEA diminui sua exposição ao solvente, levando a uma maior compactação, e conseqüentemente a diminuição do raio de giro e da área acessível ao solvente, o contrário ocorre ao se inserir a anandamida em um meio anfipático como a bicamada de DOPC, as cadeia de carbono da AEA fica na mesma região das caudas do DOPC, dessa forma ela consegue se manter mais esticada, aumentando seu raio de giro e área acessível ao solvente.

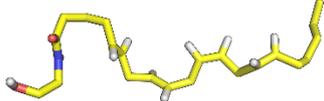
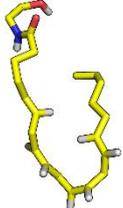
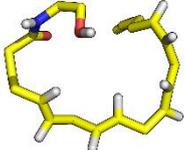
A distância entre o nitrogênio e o oxigênio presentes na “cabeça” da AEA e seu carbono terminal foram realizadas, nessa análise percebemos um aumento na distância para a simulação em bicamada, fato que reforça a possibilidade de uma conformação mais estendida para a simulação em membrana.

Baseados nas informações na tabela 6, podemos inferir que mudanças conformacionais foram sofridas pela anandamida ao mudar de meio, claramente em água ela possui uma estrutura mais compacta, dobrada em seus ângulos diedrais, como discutido na seção 3.2. Já a simulação em bicamada infere uma estruturação mais estendida para a AEA, fato relacionado ao seu caráter hidrofóbico que a faz expor seus grupos no núcleo hidrofóbico do DOPC.

Para verificarmos a estruturação, foi realizada a análise dos ângulos diedrais, seguindo o protocolo discutido na seção 3.2 do capítulo de simulação em água. Dessas análises foram obtidos os resultados mostrados na tabela 7.

Tabela 7. Porcentagens das estruturas encontradas na simulação da janela 46 da US. Nessa janela a molécula de anandamida se encontra completamente inserida dentro da bicamada fosfolipídica, a estrutura mais presente é a estendida, compreendendo 38,4%, seguida da estruturação em J,

compreende 27,4%, e 18,1% da estrutura em U e 7,7% da conformação em H. Uma imagem representativa das estruturas estão mostradas na terceira coluna.

Estrutura	% estruturas	Figura
I	38,4	
J	27,4	
U	18,1	
H	7,7	

A tabela 7, mostra a porcentagem de estruturas obtidas pela anandamida em função do tempo, é possível notar uma preferência para a conformação estendida (38,4%), seguida da conformação em J (27,4%), da U (18,1%) e por último a conformação em hélice (7,75%). Este resultado está de acordo com os dados estruturais obtidos pela tabela 6, onde foram encontrados valores de AAS e Rg que indicavam uma estrutura preferencialmente estendida.

Dados da estrutura da AEA em meios hidrofóbicos foram amplamente estudados pela literatura. Os primeiros resultados de simulação em ambiente hidrofóbico foram mostrados pela referência [172], onde utilizaram Monte Carlo e o solvente CHCl_3 implícito como ambiente hidrofóbico. Algumas comparações e diferenças dos métodos foram discutidas na seção 3.2. Os resultados mostram que em ambiente hidrofóbico há uma preferência pela conformação estendida, representando 47% das estruturas encontradas, seguida pela conformação em U (22%). Nossos resultados se assemelham aos obtidos na referência, porém assim como os resultados obtido em água, há diferenças nas porcentagens, há várias possibilidades para tais diferenças, uma delas é devido ao meio hidrofóbico utilizado, uma vez que as moléculas que compõem nosso meio hidrofóbico (fosfolipídio DOPC) são muito maiores do que as moléculas de CHCl_3 . Por ser menor, as moléculas de CHCl_3 conseguem acessar mais diretamente os grupos da anandamida, fazendo com que a estrutura se mantenha mais estendida. Outras diferenças já foram discutidas no tópico 3.2.

As próximas comparações foram realizadas em bicamadas lipídicas, Lynch 2005 [174] fez simulações da anandamida em uma bicamada de DOPC utilizando o campo de força CHARMM e o modelo de água TIP3P, simulando um total de 10 ns em uma temperatura de 310K. Seus resultados estruturais e os nossos estão comparados na tabela 9.

Para comparação direta, foram modificadas as estruturas analisadas, a estrutura estendida continua sendo a que mantém os pares de ângulos diedrais com mesmo sinal. Para a conformação U, os pares de ângulos (ω_5, ω_6) e (ω_{11}, ω_{12}) devem ter sinais opostos enquanto (ω_8, ω_9) apresentam mesmo sinal. Para conformação J temos (ω_5, ω_6) tem sinais opostos e (ω_8, ω_9) e (ω_{11}, ω_{12}) apresentam mesmos sinais. Uma segunda estrutura em formato J, porém com o gancho próximo ao grupo terminal metil foi denominado de J', e seus ângulos apresentam os sinais (ω_{11}, ω_{12}) opostos e (ω_5, ω_6) e (ω_8, ω_9) iguais. A tabela 8 mostra um resumo desses sinais de ângulos e a tabela 9 os resultados obtidos na simulação.

Tabela 8. Avaliação dos sinais dos pares de ângulos diedrais para as conformações estendida, U, J e J'

	(ω_5, ω_6)	(ω_8, ω_9)	(ω_{11}, ω_{12})
I (Estendido)	Iguais	Iguais	Iguais
U	Opostos	Iguais	Opostos
J	Opostos	Iguais	Iguais
J'	Iguais	Iguais	Opostos

Tabela 9. Comparação entre os dados obtidos na janela 46 da US e os da referência [174]. Os dados se referem a porcentagem de estruturas encontradas nos 70ns de simulação da janela 46.

	% Estruturas encontradas	
	US	Literatura [174]
I	38,1	43,4
U	18,1	15,6
J´	13,0	10,7
J	14,4	20,7

Através da análise de estruturas, em ambiente hidrofóbico, 38,1% das conformações encontradas foram estendidas, seguidas de 18,1% para a conformação U e 27,4% somando a conformação J e J´. Estes resultados reforçam o que os dados estruturais da tabela 6 já indicavam, no ambiente hidrofóbico, a AEA tem uma preferência pela conformação estendida, em geral por dois motivos, primeiro pois o núcleo hidrofóbico formado pelas caudas do DOPC forma um ambiente “seguro” para a cauda da AEA, e outro possível motivo, seria a dificuldade de mobilidade dentro do núcleo hidrofóbico, as caudas do DOPC são grandes e acabam dificultando as mudanças de conformação.

Os resultados obtidos estão bem próximos dos obtidos pela literatura, pequenas diferenças surgem devido a diferentes parametrizações e campos de força, mas em geral, esses resultados podem ser comparáveis.

4.2 Posições de Equilíbrio

Uma informação importante é a posição que a anandamida ocupa em seu mínimo de energia, esta posição pode revelar suas interações preferenciais e ser um indicativo do equilíbrio das dinâmicas subsequentes. Desta maneira, gráficos de densidade de massa foram realizados e estão mostrados na figura 25.

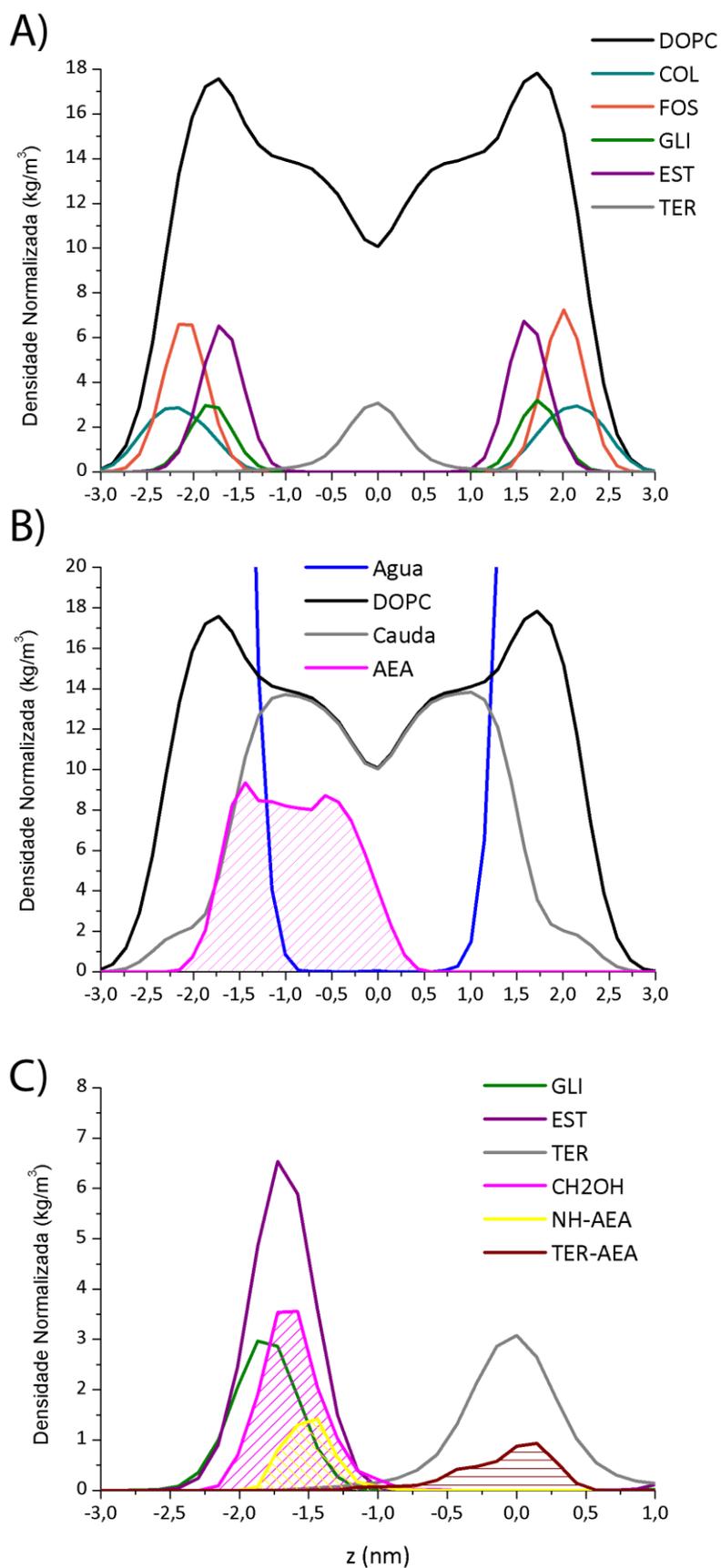


Figura 25: Gráficos de densidade normalizada, em A) para os DOPC e seus grupos, B) anandamida e o DOPC e C) para a posição relativa dos grupos da AEA e os grupos do DOPC. As cores das curvas representam: em verde o grupo glicina (GLI), em roxo o grupo éster (EST), em cinza o

terminal metil (TER), todos referentes ao DOPC, para a AEA temos que a cor rosa representa o grupo CH₂OH, amarelo o grupo NH e bordo o carbono terminal (TER).

Na figura 25 foi realizada a densidade de massa do DOPC e seus grupos, é possível notar a separação dos grupos e a separação de fase entre os fosfolipídios e a água, formando uma bicamada. Para facilitar a visualização a densidade foi normalizada em relação a quantidade de moléculas presentes em cada face da membrana, por exemplo, dividimos a densidade de massa da AEA por 1 e do DOPC e sua cauda por 64, pois é a quantidade de moléculas presentes em uma face da bicamada. O mesmo foi feito para a parte B) e C) da figura 25, e em todas as análises subsequentes cuja densidade é normalizada.

Através da parte B) da figura 25 é determinada a posição relativa da anandamida em relação: ao DOPC, ao núcleo hidrofóbico da membrana, que seriam as caudas do DOPC, e a água. É possível notar que o mínimo de energia livre é quando a anandamida está inserida na bicamada de DOPC, sendo parte solvatada por água.

Uma análise mais detalhada, mostra a posição dos grupos da anandamida e dos grupos de DOPC, desta análise é possível notar que o grupo CH₂OH da AEA está localizado na região do grupo éster do DOPC, e que seu grupo NH fica levemente deslocado para a direita, indicando que fica localizada mais próximo da cauda acídica. Estes resultados já foram obtidos em simulações anteriores, Lynch em 2005 [174] encontrou que os grupos cabeça da anandamida se encontram na interface entre DOPC/água, analisando que a água alcança posições próximas a -0,75 nm, nossos resultados são equivalentes.

Já a cauda da AEA possui grande liberdade conformacional, o que reflete em um gráfico de densidade baixo e bastante esticado, mesmo com este perfil é possível perceber um pico, que indica a região preferencial, sendo localizada próxima ao pico do carbono terminal do DOPC, mesmos resultados foram obtidos nas referências [174,175]

Considerando que a AEA é obtida de um fosfolipídio, e que possui um caráter anfipático, é de se esperar que seu comportamento e sua posição seja semelhante aos fosfolipídios de DOPC que constituem a bicamada.

Para complementar as análises de densidade foram calculadas as distâncias mínimas entre os grupos da anandamida, representados pelo CH₂OH e NH e os grupos do DOPC. Os resultados estão mostrados na tabela 10.

Tabela 10. Valores médios das mínimas distâncias entre os grupos do DOPC, colina (COL), fosfato (FOS), glicerol (GLI) e éster (EST) e água e grupos da anandamida CH₂OH e NH, para a janela 46 da US.

	CH ₂ OH	NH
AGUA	0,27 ±0,09	0,38 ±0,10
COL	0,50 ±0,15	0,64 ±0,14
FOS	0,37 ±0,12	0,46 ±0,11
GLI	0,37 ±0,07	0,36 ±0,06
EST	0,30 ±0,07	0,21 ±0,07

A tabela 10 mostra a distância entre os grupos analisados pelo perfil de densidade, e nele podemos perceber que tanto o grupo CH₂OH, como o NH da anandamida estão mais próximos do grupo éster, estando mais afastados do grupo colina. É interessante notar que o grupo CH₂OH está aproximadamente a mesma distância da água e do éster, se considerarmos a barra de erro. A água aparece mais próxima do grupo CH₂OH do que do NH, fato relacionado a posição relativa dos grupos, o grupo CH₂OH está mais próxima a região das cabeças dos fosfolípidios. Dessa análise é possível inferir que as moléculas de água se inserem próximas ao grupo éster, estando de acordo com o gráfico de densidade (Figura 25).

4.3 Interações

Para compreender quais interações são feitas pela anandamida, foi realizada a análise de ligações de hidrogênio entre a AEA e seus grupos com o DOPC e água, estes resultados estão mostrados na tabela 11.

Tabela 11. Ligações de hidrogênio entre o DOPC e seus grupos com a água e com a AEA e seus grupos. A primeira parte da tabela mostra o valor absoluto médio de ligações de hidrogênio em cada frame, na parte de baixo da tabela, a porcentagem destas ligações divididas pelos grupos do DOPC e AEA. Em parênteses está mostrado a quantidade média de ligações de hidrogênio feitas por cada molécula de DOPC com a água, ou seja, a razão entre o valor absoluto de ligações de hidrogênio pela quantidade de moléculas de DOPC

Pontes de Hidrogênio	
DOPC-AGUA	796,9 (6,22)
DOPC-AEA	1,27
AEA-AGUA	0,484

Porcentagem do tempo	
FOS-AGUA	61,3%
EST-AGUA	38,7%
FOS-CH2OH	13,2%
EST-CH2OH	18,7%
FOS-NH	2,6%
EST-NH	65,5%
CH2OH-AGUA	62,8%
NH-AGUA	11,4%

Estes resultados foram obtidos utilizando a ferramenta *g_hbond*, e seu algoritmo é discutido na seção 2.10. A tabela mostra a quantidade de pontes de hidrogênio por frame entre os grupos selecionados, na segunda parte da tabela temos a porcentagem média de ligações de hidrogênio por grupos para cada frame. Por exemplo, por frame a AEA e o DOPC realizam cerca de 1,27 pontes de hidrogênio, destas pontes, 18,7% foram entre o grupo CH2OH da anandamida com o grupo éster do DOPC.

A análise de ligações de hidrogênio mostradas na tabela 11 revelam que cada DOPC realiza cerca 6 pontes de hidrogênio com a água, e que destas interações com a água, 61% é feita com o grupo fosfato e 38,7% são com o grupo éster. Das pontes de hidrogênio realizadas entre o DOPC e a AEA, temos que 15,8% são feitas com o grupo fosfato, enquanto 84,2% são com o grupo éster.

As ligações de hidrogênio com a água mostram uma preferência do grupo fosfato em relação ao éster, assim como há uma preferência do grupo CH2OH da AEA em comparação com o NH. O grupo CH2OH da anandamida está mais pra fora da bicamada tendo mais moléculas de água ao seu redor e dessa forma interagindo preferencialmente com elas, o mesmo ocorre com o grupo fosfato do DOPC, por estar mais distante do centro da bicamada tem suas interações preferenciais com a água. Dessa forma, o grupo NH e éster por estarem mais inseridos, ou seja, mais próximos do núcleo hidrofóbico, possuem menor quantidade de moléculas de água ao seu redor e preferem interagir entre si.

4.4 Discussão

Portanto todas as análises discutidas nos tópicos anteriores levam conclusão que a posição de equilíbrio para a anandamida é inserida na bicamada, com seus grupos CH₂OH e NH voltados para a região hidrofílica, próximos aos grupos glicerol e éster, respectivamente e sua cadeia acídica fica inserida no núcleo hidrofóbico do DOPC. A figura 26, mostra uma representação da posição da AEA, assim como suas ligações de hidrogênio.

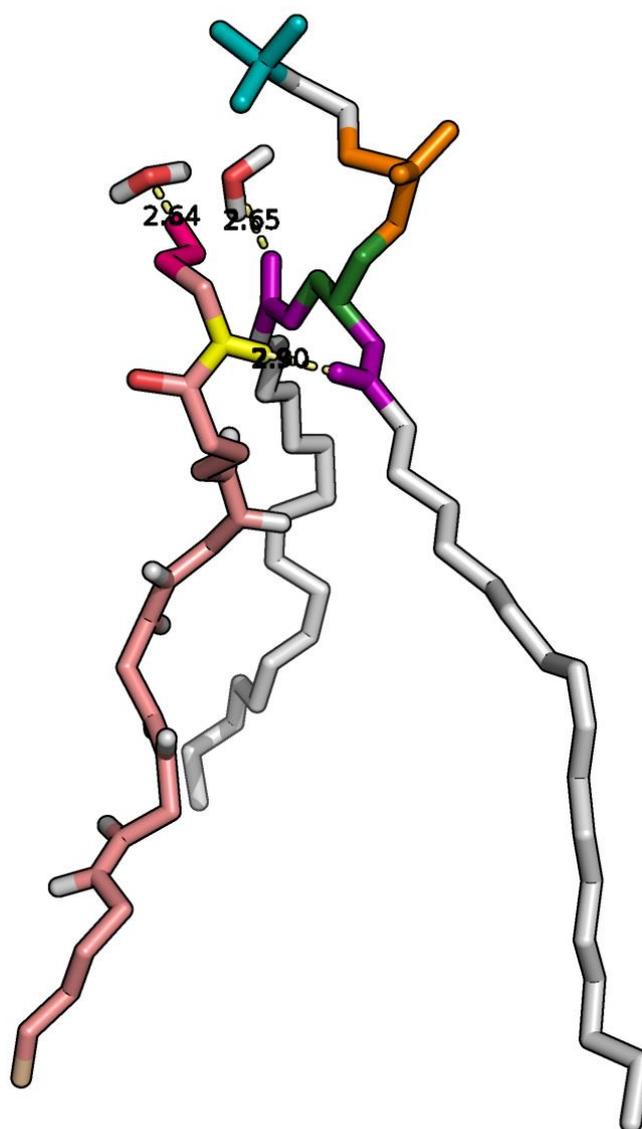


Figura 26: Visualização da anandamida (rosa) próxima a uma molécula de DOPC (cinza). Os grupos do DOPC estão representados pelas cores: ciano para a colina (COL), laranja para o fosfato (FOS), verde para o glicerol (GLI) e roxo para o éster (EST). Os grupos da anandamida estão representados por pink para o grupo CH₂OH e amarelo para o grupo NH. As linhas pontilhadas amarelas representam as ligações de hidrogênio realizadas entre os grupos.

Devido a posição que ocupa os grupos da cabeça da AEA interagem com a água, principalmente o grupo CH₂OH que está mais na extremidade, ou seja, mais próximo as moléculas de água. Além da interação com a água, o grupo CH₂OH da AEA também interage com os grupos fosfato e éster do DOPC. Já o grupo NH por estar mais inserido na membrana faz uma menor quantidade de ligações de hidrogênio com água, conseqüentemente realiza uma maior quantidade de ligações de hidrogênio com os grupos da membrana, principalmente o éster.

Sua conformação estendida já era esperada, uma vez que as caudas do DOPC formam um núcleo hidrofóbico que “protege” a cadeia de carbonos da AEA, sendo assim consegue se manter na posição estendida. Todos esses resultados estão de acordo com outros trabalhos da literatura [176,174,175] como já discutido no tópico 3.1.

Com as discussões e resultados mostrados nas seções 3.1 e 3.2 conseguimos responder algumas perguntas a respeito da anandamida:

- “Será que ela particiona em uma bicamada?”

Sim, as simulações por Umbrella Sampling mostram que o mínimo de energia livre se encontra no interior da bicamada com seus grupos cabeça voltados para a água, próximo aos grupos éster e glicerol do DOPC, como mostra os perfis de densidade da figura 25 e as tabelas de distancias médias entre os grupos do DOPC e AEA, mostrados na tabela 10.

- “Como a anandamida se comporta no interior da membrana?”

A AEA, quando inserida na bicamada, mantém uma configuração preferencialmente estendida, com seu grupo cabeça fazendo ligações de hidrogênio com a água e com os grupos fosfato e éster do DOPC, e sua cauda inserida no interior no núcleo hidrofóbico formado pelas caudas do DOPC, como mostrado na figura 26.

Das análises desse capítulo, foi possível entender a estruturação da anandamida em ambientes hidrofóbicos, assim como, sua posição relativa com as moléculas de DOPC e água.

5. Simulações em Bicamada

Este capítulo concentra os resultados obtidos pela DM tradicional para a interação da anandamida com uma bicamada fosfolipídica de DOPC. Começaremos explorando os resultados da bicamada pura e posteriormente os resultados oriundos do aumento da concentração de AEA.

Neste trabalho, toda as simulações realizadas em bicamadas, foram feitas utilizando o fosfolipídio DOPC (dioleoil fosfatidilcolina). A escolha do DOPC foi baseada na grande quantidade de dados teóricos disponíveis para comparação [177,178,143,174], de dados experimentais de interação entre a anandamida e o DOPC [67], além de ser um dos fosfolipídios constituintes do cérebro onde o receptor CB1 é majoritariamente expresso.

5.1 DOPC

Seguindo o protocolo dos outros capítulos, começaremos discutindo os parâmetros de controle e validações da bicamada de DOPC. Os detalhes da simulação estão na seção 2.14 no capítulo de matérias e métodos. Seguiremos comparando os resultados obtidos da DM com dados da literatura.

Os dados de controle verificados foram a energia potencial e a temperatura dos 100ns finais de simulação, mostrados na figura 27, da mesma forma como na simulação em água, o equilíbrio termodinâmico ficou caracterizado pela flutuação da energia potencial, mostrada na ao redor de valores médios, com um ajuste linear com coeficiente angular de uma parte em 10^7 do valor significativo da energia. Para a temperatura, o comportamento é essencialmente o mesmo, com os valores de equilíbrio em 300 ± 2 K.

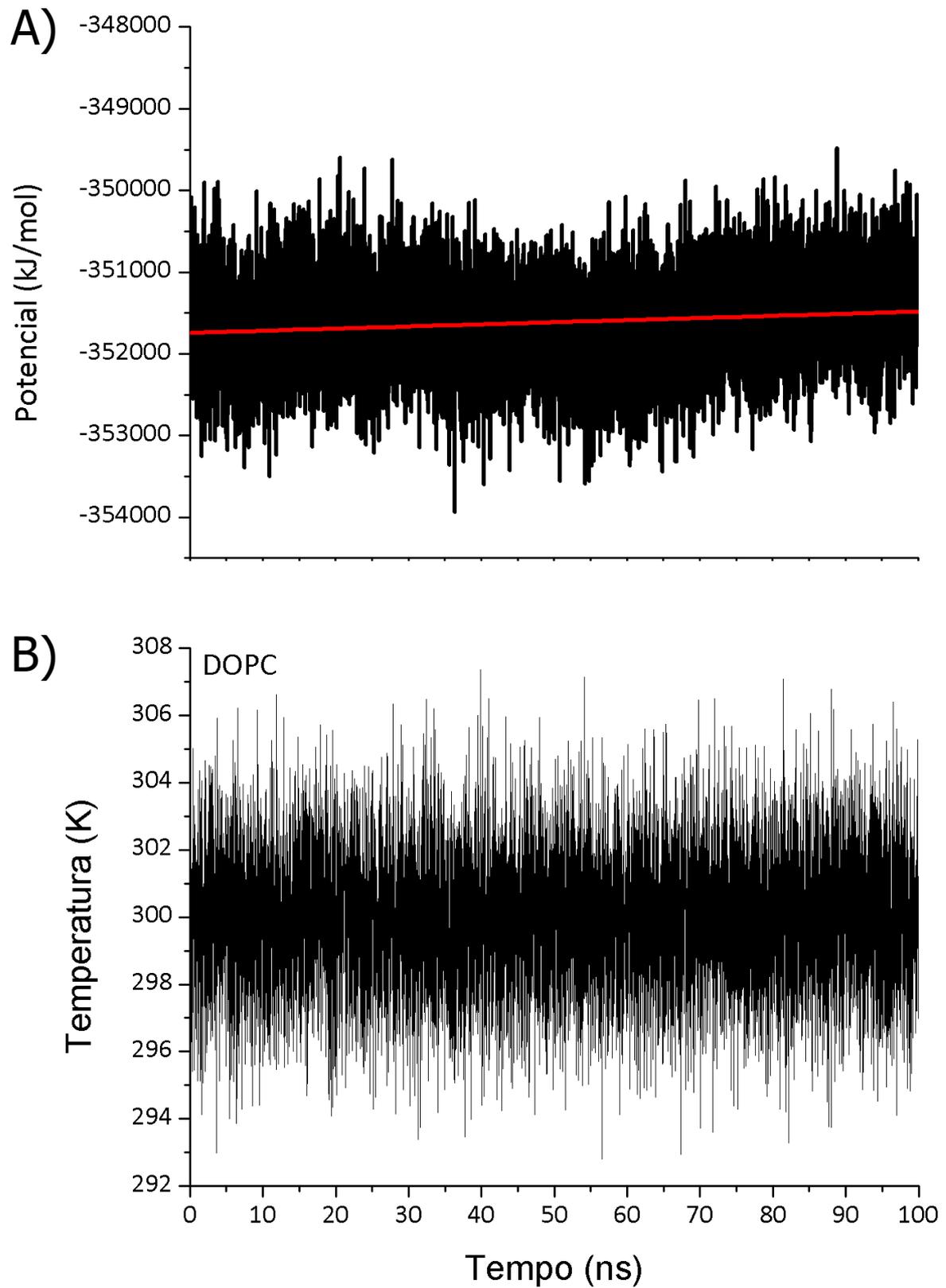


Figura 27: Parâmetros de controle para a simulação de DOPC, em A) energia potencial em kJ/mol, e B) Temperatura em K, ambas analisadas nos 100 ns segundos de produção.

Dados de controle, não serão mostrados para as outras simulações com o intuito de evitar páginas desnecessárias, porém estes resultados foram realizados e analisados e seguem no apêndice 1.

5.1.1 Densidade

Devido ao caráter anfipático dos fosfolipídios, eles formam bicamadas quando inseridos em um meio aquoso, ocorrendo uma separação de fase entre o meio hidrofóbico ou apolar e hidrofílico ou polar. Dessa maneira a análise de densidade mostrada na figura 28 tem o intuito de analisar se a presente simulação consegue reproduzir essas características de uma bicamada.

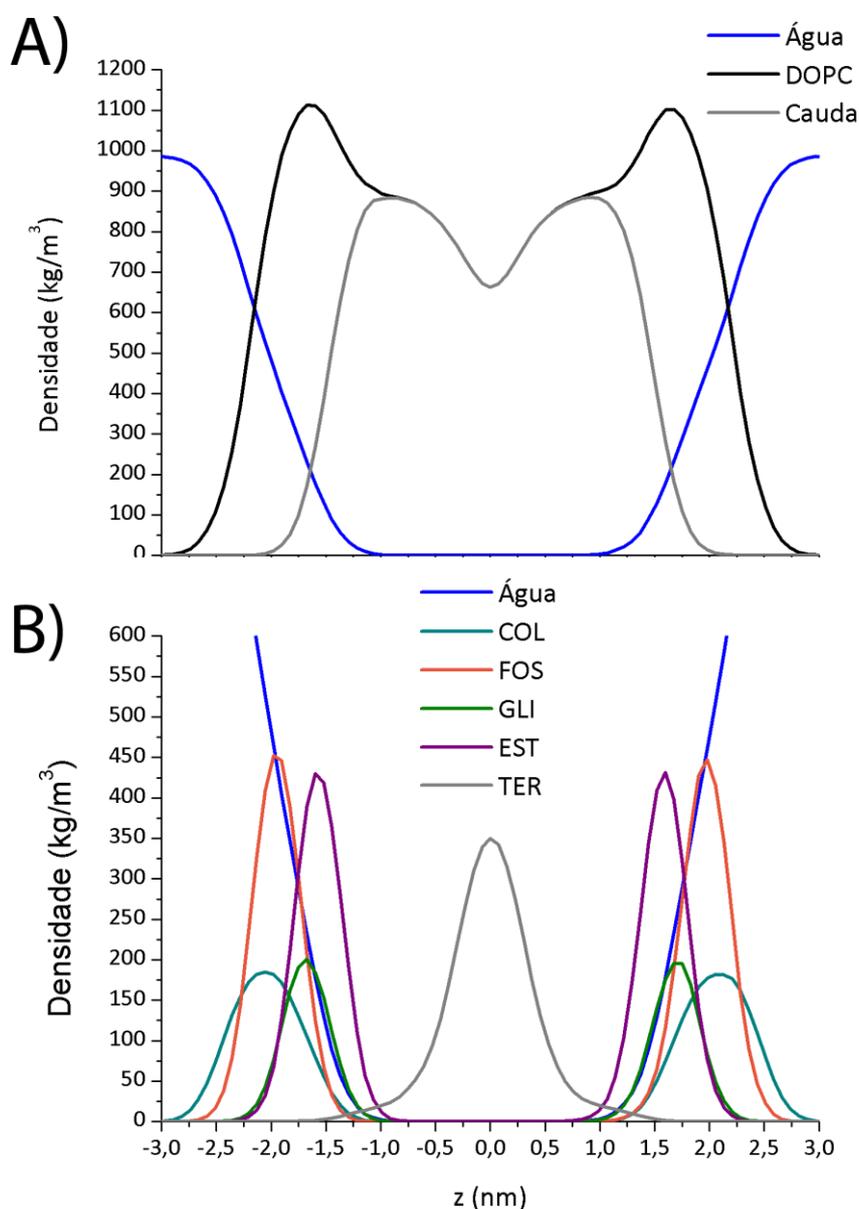


Figura 28: Perfil de densidade para a simulação de DOPC em água, em A) o DOPC, água e as caudas do DOPC, e em B) os grupos do DOPC.

A figura 28 mostra os resultados de densidade para a simulação de DOPC pura, na parte A) é possível notar a separação dos meios hidrofóbicos e hidrofílicos, o núcleo hidrofóbico representado pelas caudas do DOPC ocupa a posição de -2 a +2 nm, sendo que ainda ocorre uma pequena entrada de água até a posição ± 1 nm. Já a região hidrofílica ocupa o restante da caixa, sendo representado pela água e parte do DOPC.

Na figura 28B) está evidenciado os grupos do DOPC e a solvatação da água, a água solvata o grupo colina, fosfato e glicerol, o grupo éster, por estar mais próximo no núcleo hidrofóbico, tem uma menor quantidade de água ao seu redor. Já os dois últimos átomos da cauda do DOPC, representado como TER (terminal metil), não apresentam moléculas de água ao seu redor, confirmando a formação da bicamada. Esses resultados já foram extensivamente obtidos na literatura [143,174,73,179,180].

Para comparar se a bicamada simulada representa as características de outras simulações, análises de espessura da membrana (d) e área por lipídio (ApL) foram calculados com o software Apl@voro, que utiliza os polígonos de Voronoi para tais medições. Os resultados obtidos estão expressos na tabela 12.

Tabela 12. Dados de espessura da membrana (d) e área por lipídio (ApL) para a simulação de DOPC e os resultados da literatura.

Simulações	d (nm)	ApL (nm ²)
Voronoi	3,95 \pm 0,02	0,63 \pm 0,01
Literatura [143]	4,00 \pm 0,03	0,62 \pm 0,014

Os resultados apresentados na tabela 12 são bem próximos com os obtidos da referência para o DOPC (Siu, 2008). Os dados obtidos com o apl@voro para a espessura da membrana se encontram na barra de erro, assim como os valores de área por lipídio. Esses valores também foram encontrados nas referências Dickson, 2012 [179] e Rosso, 2006 [180].

5.2 BICAMADA + AEAs

O objetivo desta tese é estudar se a anandamida consegue alterar as propriedades elásticas das bicamadas, alternando assim os estados abertos ou fechados de proteínas inseridas nessa membrana. Para investigar essas modificações nas bicamadas foram realizadas 5 simulações de DOPC com concentrações crescentes de AEA, os resultados dessas simulações serão discutidos nos próximos tópicos.

5.2.1 Densidade

A conformação de partida para as AEAs foi no centro da bicamada, conforme mostra a figura 19, porém através das simulações de US foi averiguado que a posição de menor energia para a anandamida não é localizada no centro da bicamada, mas com seus grupos cabeça próximos a região do glicerol e éster do DOPC, como elucidado na figura 26. Desta maneira perfis de densidade foram traçados para investigar a posição da AEA nas simulações de equilíbrio, esses resultados estão mostrados na figura 29.

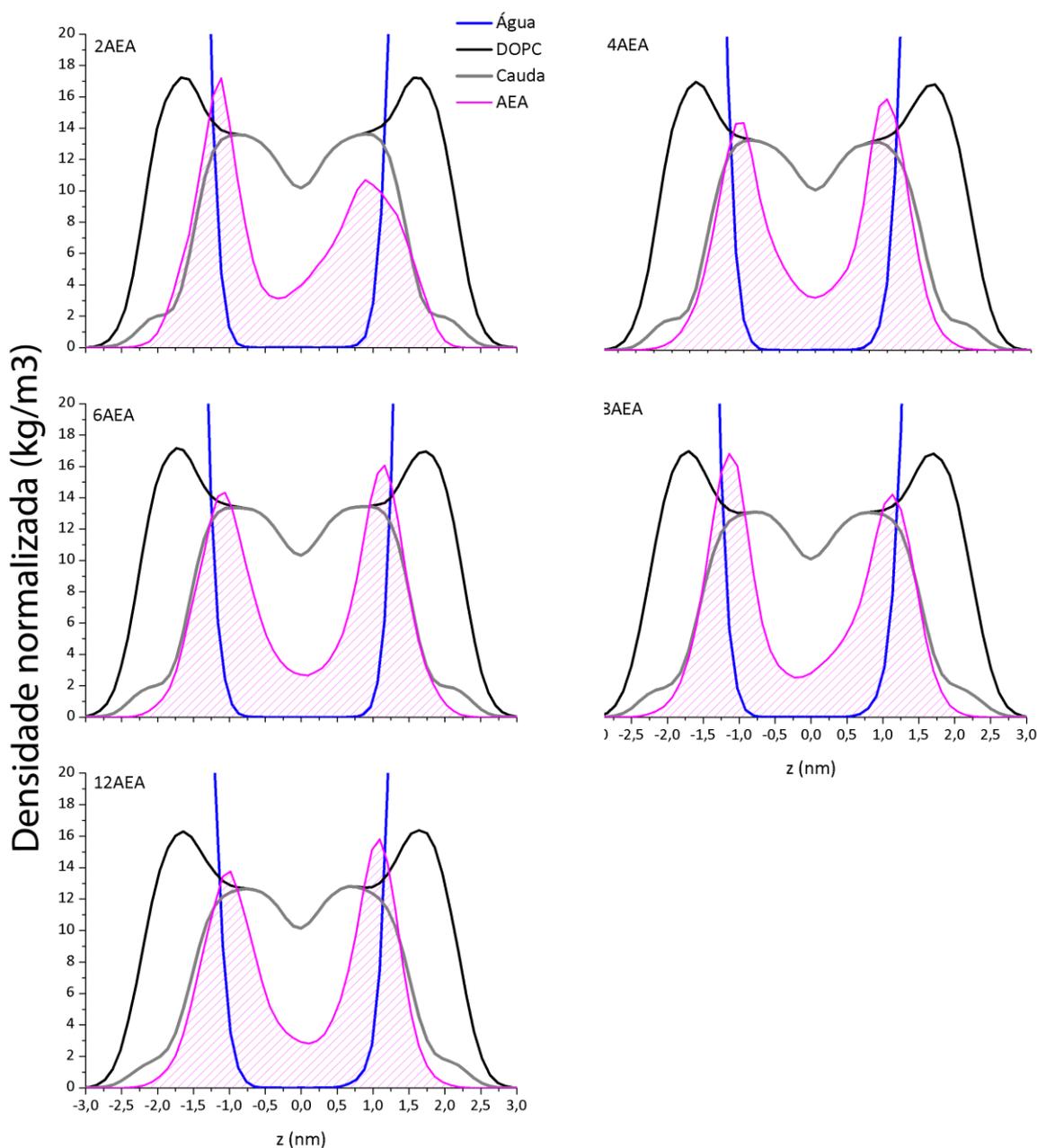


Figura 29: Densidade de massa normalizada de alguns componentes da simulação para as simulações com diferentes quantidades de AEA. Em preto, resultados para o DOPC, cinza para o núcleo hidrofóbico do DOPC, representado por suas caudas, em azul a água e em rosa hachurado a molécula de anandamida.

As análises realizadas na figura 29 mostram que a anandamida fica inserida totalmente na bicamada de DOPC. Nota-se que a água se insere na bicamada e solvata parte da anandamida. Em todas as simulações números iguais de moléculas de anandamida ficaram em cada face da membrana, embora os picos de AEA sejam mais altos, sua base é mais estreita, o que resulta em uma área igual nas duas faces da membrana.

A posição da AEA em todas as simulações é a mesma encontrada como o mínimo de energia livre através da simulação da US, esse resultado indica que independentemente da conformação inicial da simulação, após tempo de equilíbrio suficiente a AEA alcança sua posição de equilíbrio. Lynch em 2006 obteve o mesmo resultado de posição, porém seu tempo computacional foi consideravelmente menor do que deste trabalho, mostrando que a AEA alcança sua posição de equilíbrio relativamente rápido [174].

5.2.2 Conformação

Nesse tópico serão analisadas as conformações e parâmetro estruturais obtidas pelas anandamidas nas diferentes simulações, e comparadas com os dados da US e da literatura. Dessa maneira, a figura 30 mostra as propriedades estruturas da AEA para as diferentes simulações, os resultados mostrados se referem a média de todas as moléculas presentes nas respectivas simulações, os resultados individuais são mostrados no Apêndice 1.

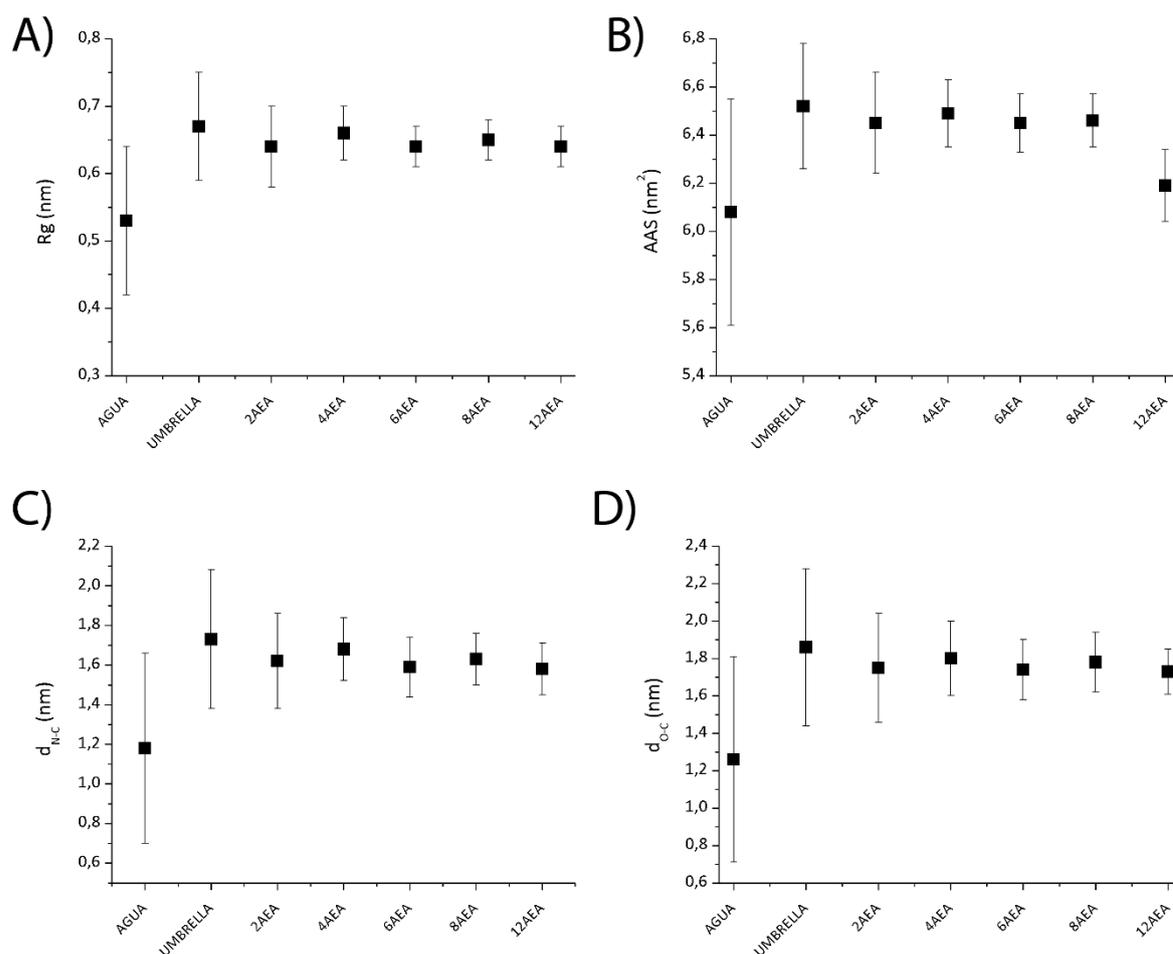


Figura 30: Parâmetros estruturais da anandamida para as diferentes simulações deste trabalho, em A) valores para o raio de giro (R_g), b) área acessível ao solvente (AAS), C) e D) distancia média entre o nitrogênio e o oxigênio, respectivamente com o carbono terminal da AEA.

A figura 30 mostra os dados estruturais de: raio de giro (R_g), área acessível ao solvente (AAS), distância entre o oxigênio e nitrogênio com o carbono terminal da cauda acíclica, d_{O-C} e d_{N-C} . Para facilitar a comparação os resultados da simulação em água e da janela 46 da Umbrella Sampling estão representados como os dois primeiros pontos em cada gráfico, dessa maneira, é possível a comparação direta das mudanças desses parâmetros em um ambiente hidrofílico, representado como Água (primeiro ponto) e o mínimo de energia livre, representado por Umbrella (segundo ponto).

A análise estrutural mostrada na figura 30 exhibe um aumento do raio de giro da área acessível ao solvente para as simulações em bicamada, estes resultados estão relacionados a estruturação da anandamida, que em ambiente hidrofóbico mantém uma estrutura mais estendida, enquanto em água ocorre uma dobra em sua cadeia de carbonos para diminuir a área de contato com a água, influenciando assim nos valores de raio de giro e área acessível ao solvente (AAS).

A tendência de manter uma estrutura linear em ambientes hidrofóbicos, é verificada também quando se calcula a distância entre os átomos de oxigênio (O) e o carbono terminal da cauda da AEA, sendo que a maior distância ocorre para a janela que representa o mínimo de energia (denominada Umbrella no gráfico) e o menor valor ocorre para a simulação realizada em água. O mesmo ocorre para a distância do nitrogênio (N) presente na região da cabeça da AEA com o carbono terminal (C). Esses dados reforçam a hipótese que em ambiente hidrofóbico a anandamida tem a tendência de se manter a conformação estendida.

Para averiguarmos mais profundamente a estruturação da anandamida, investigamos os ângulos diedrais, seguindo a metodologia discutida na seção 4.1. Os resultados obtidos estão na tabela 13.

Tabela 13. Resultados da análise de estruturas para as simulações de equilíbrio, os resultados obtidos na US e pela literatura estão mostrados para facilitar comparações.

	Simulações Equilíbrio	Janela 46 - US	Literatura [175]
Estendida	31,3 \pm 2,0	32,3 \pm 2,1	43,4
U	11,0 \pm 0,8	10,3 \pm 0,4	15,6
J	14,3 \pm 1,2	13,8 \pm 0,6	10,7
J'	10,6 \pm 0,9	10,9 \pm 1,1	20,7

A tabela 13 fornece os resultados da análise de estruturas para as simulações de equilíbrio, esse resultado representa a média de todas as estruturas de AEA das simulações de equilíbrio, totalizando 32 estruturas, os resultados individuais estão mostrados no apêndice 1. Para facilitar a comparação os resultados obtidos na US e na literatura foram colocados nas colunas ao lado.

Os dados estruturais mostrados na tabela 13, exibem uma concordância entre as porcentagens de estruturação para a simulação de equilíbrio e de US, em ambos ocorre uma preferência pela conformação estendida, mas passeia pelas outras estruturas. Quando comparada aos resultados da literatura, referência [174], os resultados gerais são os mesmos, porém ocorrem mudanças nas porcentagens de estruturas, na literatura a conformação estendida é a preferencial, se mantendo mais tempo estendida do que nas simulações de equilíbrio dessa tese, possíveis razões para as diferenças nas porcentagens já foram discutidas na seção 4.1.

5.2.3 Posição

Nesta seção serão abordadas as posições que a anandamida ocupa inserida na bicamada. Para tal propósito foi realizada o perfil de densidade normalizado dos grupos da anandamida e dos grupos do DOPC, e estão mostrados na figura 31.

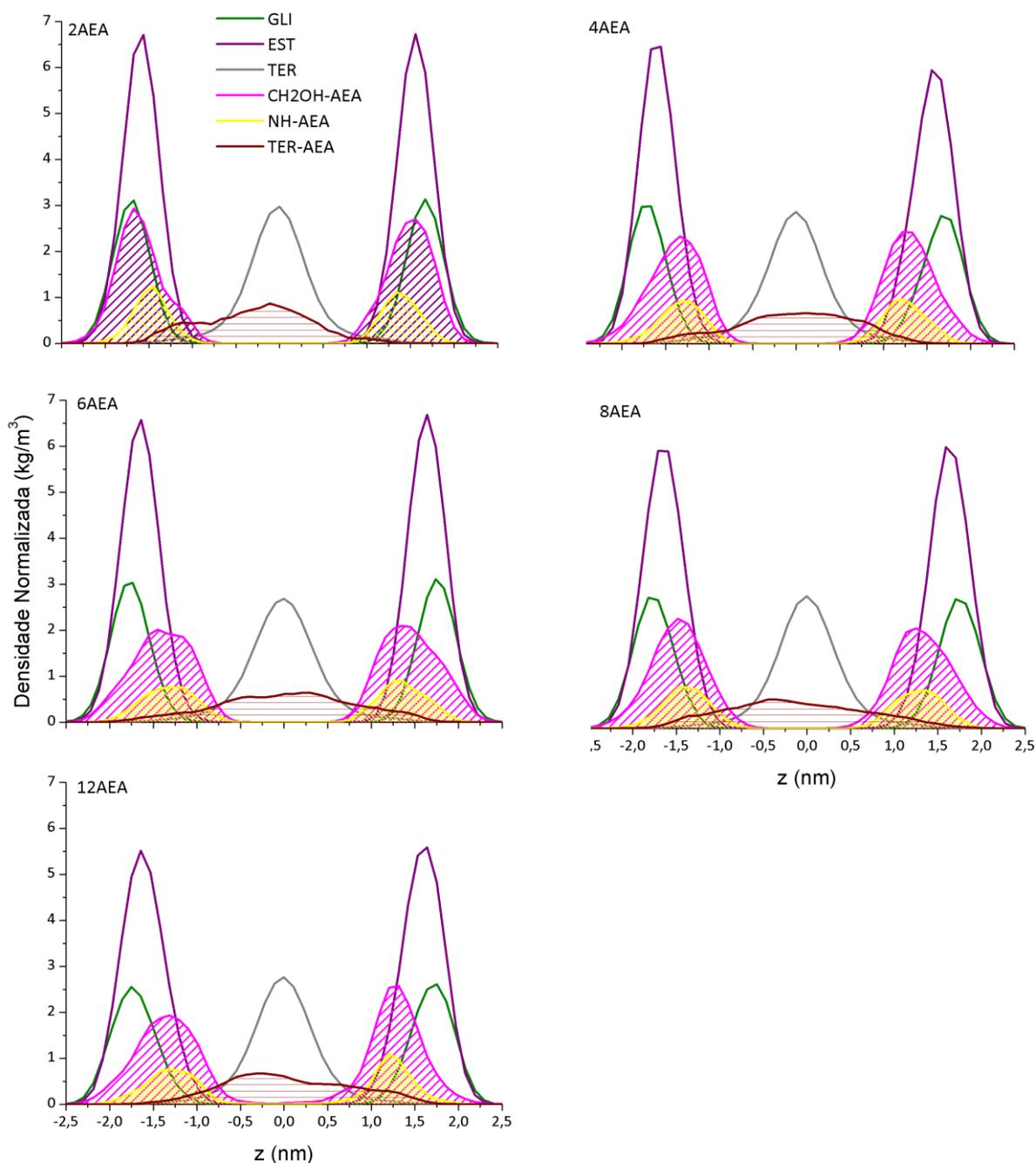


Figura 31: Densidades normalizadas para os grupos do DOPC e da AEA para as simulações de equilíbrio com diferentes quantidades de AEA. As curvas hachuradas se referem aos grupos da anandamida.

A análise de posições de grupos resulta em picos de CH₂OH e NH bem definidos, próximos ao grupo éster do DOPC, e com a cauda (TER-AEA) imersa no núcleo hidrofóbico, podendo passear por todo núcleo hidrofóbico, refletindo um perfil de densidade baixo e alongado.

O grupo CH₂OH parece possuir liberdade de movimentação maior do que o grupo NH, seu pico, representada pela cor magenta hachurada, parece se deslocar ligeiramente nas simulações, variando de bem próximo ao grupo glicerol, no caso da simulação de 2AEA, e mais afastada, como na simulação de 12AEA. A posição próxima ao glicerol se assemelha a posição obtida na US, conforme ocorre um aumento da concentração parece haver um deslocamento desse grupo para posições mais próximas ao núcleo hidrofóbico

Devido a modificação da posição do grupo CH₂OH da AEA na figura 31, com o aumento da concentração, análises de mínima distância entre o grupo CH₂OH e os grupos do DOPC foram realizadas, os resultados obtidos se encontram na tabela 14.

Tabela 14. Valores médios de mínima distância entre o grupo CH₂OH da anandamida, com os grupos do DOPC, para as diferentes simulações de equilíbrio.

	2AEA	4AEA	6AEA	8AEA	12AEA
COL	0,47±0,03	0,53±0,02	0,53±0,04	0,52±0,03	0,55±0,06
FOS	0,35±0,01	0,42±0,05	0,41±0,05	0,44±0,04	0,44±0,06
GLI	0,37±0,02	0,4±0,01	0,38±0,01	0,39±0,01	0,41±0,06
TER	0,93±0,05	0,8±0,06	0,81±0,11	0,72±0,19	0,83±0,06

Através dos resultados de mínima distância média mostradas na tabela 14, parece haver uma modificação da posição de equilíbrio da anandamida com o aumento da concentração, é possível perceber um afastamento do grupo CH₂OH da AEA com os grupos colina (COL), fosfato (FOS) e glicerol (GLI) do DOPC, assim como uma aproximação ao carbono terminal do DOPC (TER). Estes resultados indicam que a maior quantidade de anandamidas na bicamada, faz com que estas se insiram mais membrana, e esta mudança de posicionamento poderia ocasionar mudanças na organização da bicamada e assim afetar suas propriedades globais ou elásticas.

Para investigar as modificações na bicamada ocasionadas pelo aumento da concentração da AEA, ou mesmo pela mudança no posicionamento das anandamida, fomos investigar as alterações dos parâmetros globais da bicamada, sendo mostradas no próximo tópico.

5.2.4 Propriedades Globais

Neste tópico serão analisados as propriedades da bicamada que podem ser medidas em laboratórios ou através de dados de DM, propriedades como área por lipídio (ApL), espessura da membrana (d) e parâmetro de ordem (SCD).

As primeiras análises foram de espessura da membrana e área por lipídio, mostradas na figura 32.

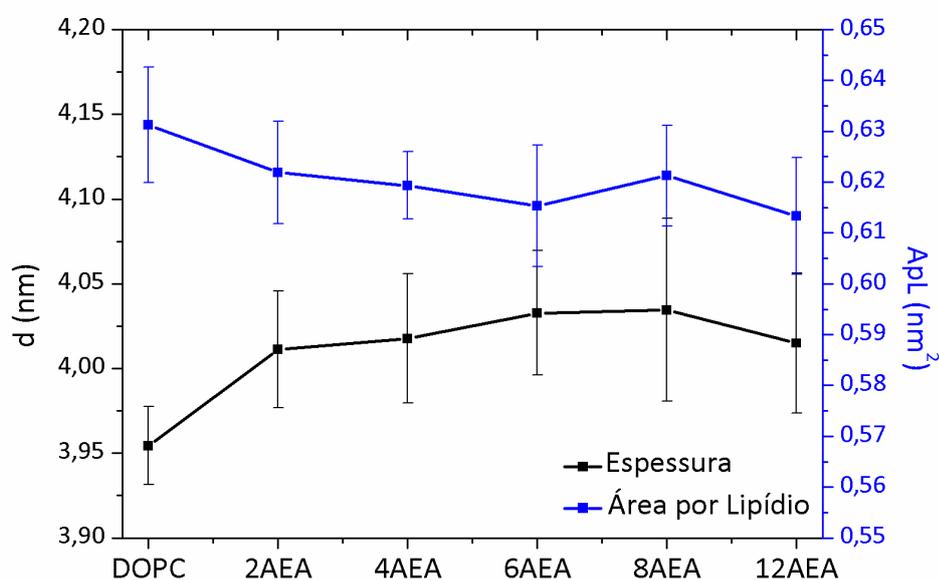


Figura 32: Espessura da membrana (d) e área por lipídio (ApL) para as simulações de equilíbrio com diferentes concentrações de AEA.

A curva azul se refere aos dados de área por lipídio (ApL) e a curva preta aos valores de espessura da membrana (d), ambas em função da quantidade de AEAs na bicamada.

Os resultados obtidos revelam uma pequena modificação nesses valores, onde tanto para a curva azul quanto para a preta os valores se encontram nos limites da barra de erros.

Esse resultado mostra que o aumento da concentração de AEA não ocasiona uma mudança estrutural perceptível na bicamada lipídica, fato este que pode estar relacionado a natureza anfipática do soluto, que é muito parecida com a natureza do próprio DOPC, desta maneira sua presença não faz alterações significativas nessa estrutura da membrana. Resultados experimentais semelhantes foram obtidos na referência [67], onde o aumento da concentração

de anandamida em uma bicamada de DOPC não ocasiona alterações significativas da espessura da membrana, mas aumenta o encontro e o tempo de duração dos monômeros da Gramicidina.

Para analisar o empacotamento das cadeias acílicas do DOPC, foi realizada a análise de parâmetro de ordem, mostrado na figura 33.

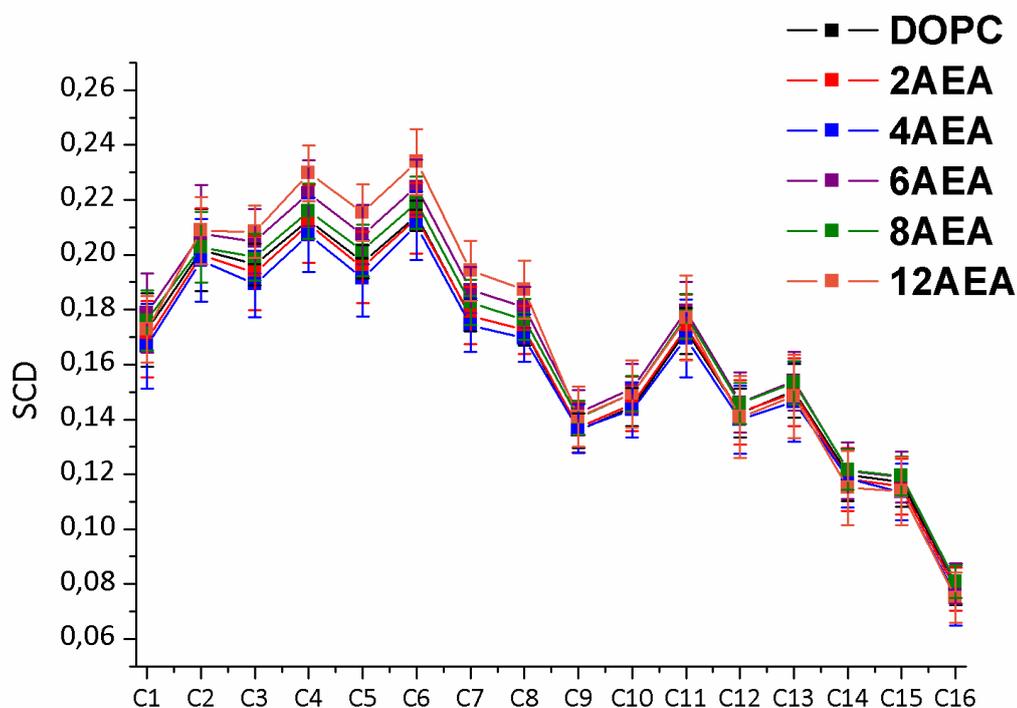


Figura 33: Parâmetro de ordem (SCD) das cadeias acílicas do DOPC para as diferentes concentrações de anandamida.

Analisando a figura 33, é perceptível a pequena variação do ordenamento das cadeias acílicas do DOPC com o aumento da concentração de soluto, assim como na figura 32, todos os valores se encontram nas respectivas barras de erro. Este resultado complementa os resultados da figura 31, onde a modificação do parâmetro de ordem pode ser relacionada a uma modificação da espessura da membrana, por exemplo, ao aumentar o SCD levaríamos a uma bicamada mais ordenada e dessa maneira um aumento na espessura da membrana (d) e conseqüentemente uma diminuição da área por lipídio (ApL). Ao não encontrar modificações significativas em nenhuma dessas propriedades, temos o panorama que a AEA pouco altera as propriedades globais da bicamada com sua presença.

Através das análises realizadas nesse tópico, foi possível concluir que o aumento da concentração da anandamida pouco altera as propriedades da bicamada lipídica. Resultado semelhante foi obtido pela referência [67], onde mesmo sem alterar a espessura da bicamada, a concentração de AEA aumenta o encontro da gramicidina, e ocasiona a passagem de íons através da membrana.

5.2.5 Interações

As interações que a anandamida realiza será o alvo de discussão deste tópico, desta maneira a tabela 15 mostra os resultados de ligações de hidrogênio para o DOPC, AEA e água.

Tabela 15. Ligações de hidrogênio entre o DOPC, AEA e água para as simulações de equilíbrio com diferentes concentrações de anandamida. Os resultados mostrados estão normalizados pela quantidade de moléculas por monocamada.

	DOPC	2AEA	4AEA	6AEA	8AEA	12AEA
DOPC – Água	6,39	6,29	6,36	6,33	6,35	6,42
DOPC – AEA	-	1,25	1,12	1,18	1,12	1,12
AEA – Água	-	0,46	0,57	0,47	0,54	0,48
AEA – AEA	-	0,004	0,005	0,005	0,006	0,016

A tabela 15 exibe os dados de ligação de hidrogênio para cada frame da simulação, para facilitar a comparação, os resultados foram normalizados pela quantidade de moléculas na monocamada, por exemplo, os valores referentes ao DOPC foram divididos por 64, já para a AEA pela metade da quantidade de moléculas na simulação, por exemplo, para a simulação com 4AEAs, os resultados foram divididos por 2.

Analisando a tabela 15, podemos perceber que a interação principal do DOPC é com a água, realizando cerca de 6 ligações e somente 1 com a anandamida. Já a anandamida, interage com a água e o DOPC e muito pouco consigo mesmo, ou com as outras moléculas de anandamida presentes. Ocorre um aumento da quantidade de ligações de hidrogênio entre as moléculas de AEA na simulação com 12, ou seja, 6 por face, a grande quantidade de anandamidas faz com que elas se tornem mais próximas e interajam mais entre si, porém mesmo com esse aumento a interação principal continua sendo com o DOPC e com a água.

Ocorre uma diminuição das ligações de hidrogênio entre o DOPC e AEA com a aumento da concentração, este resultado deve estar relacionado a posição da anandamida nas simulações

de maiores concentrações, como se encontram mais inseridas na bicamada, ocasionando um distanciamento do grupo fosfato, e assim diminuindo as ligações de hidrogênio.

Para investigar mais profundamente as ligações de hidrogênio, a tabela 16 apresenta a porcentagem de ligações de hidrogênio dos grupos do DOPC e AEA, entre si e com a água.

Tabela 16. Porcentagens médias de ligações de hidrogênio por frame para os grupos do DOPC e AEA entre si e com a água. Os valores mostrados na tabela foram obtidos a partir da tabela 15.

	DOPC	2AEA	4AEA	6AEA	8AEA	12AEA
DOPC-ÁGUA						
FOS-Água	60,5%	60,8%	60,8%	60,7%	61,1%	60,9%
EST-Água	39,5%	39,2%	39,2%	39,3%	38,9%	39,1%
DOPC-AEA						
FOS-CH ₂ OH	-	17,5%	7,8%	8,0%	6,8%	10,6%
EST-CH ₂ OH	-	15,8%	22,6%	22,6%	24,5%	18,8%
AEA-AEA						
	-	0,2%	0,3%	0,3%	0,4%	0,9%

Analisando a tabela 16, nenhuma mudança parece ocorrer com a interação do grupo fosfato (FOS) e éster (EST) do DOPC com a água, porém alterações ocorrem nas interações com os grupos da AEA. Ocorre uma diminuição percentual das ligações de hidrogênio do grupo CH₂OH da AEA com o grupo fosfato (FOS) com o aumento da concentração, da mesma maneira ocorre um aumento dessas ligações com o grupo éster do DOPC (EST). Este resultado está relacionado a posição da AEA, por estar mais próxima ao núcleo hidrofóbico, acaba se afastando do grupo fosfato e se aproximando ao grupo éster, o que levaria a estas alterações nas ligações de hidrogênio.

5.2.6 Discussão

Nesse capítulo, foram apresentados os resultados das simulações de equilíbrio com diferentes concentrações de anandamida, partindo do DOPC puro até 12 moléculas de AEA. As conformações de saída para as dinâmicas foram com as moléculas de anandamida inseridas no centro da bicamada ($z=0$), com seus grupos cabeças alternados entre a face positiva e negativa da bicamada.

Após 400ns de estabilização, foram realizados 100ns de produção, os quais foram analisados, as AEA se deslocaram do centro da bicamada até a região de interface, com o grupo CH₂OH da AEA próxima aos grupos glicerol e éster do DOPC. Sua cauda, fica inserida no núcleo hidrofóbico, juntamente com as caudas do DOPC. Com o aumento da concentração de AEA na bicamada ocorre um deslocamento de sua posição de equilíbrio, na simulação com 2AEA, uma em cada monocamada, o grupo CH₂OH fica mais próximo ao grupo glicerol da membrana, enquanto o aumento da concentração faz com que este mesmo grupo fique mais próximo ao grupo éster, essa modificação da posição faz com que as ligações de hidrogênio com o grupo fosfato diminuam e aumentem com o grupo éster.

A estruturação do soluto é preferencialmente estendida, cerca de 30% do tempo analisado, porém com grande liberdade conformacional passeando pelas outras estruturações. A conformação estendida era esperada, pois devido ao seu caráter anfipático semelhante aos fosfolipídios, sua estrutura principal deveria se aproximar a do DOPC, com seu grupo hidrofílico voltado para a água e próximo aos grupos cabeça do DOPC e com sua cauda inserida no núcleo hidrofóbico, por haver pouco espaço para a movimentação da cauda, e por ser um ambiente livre de moléculas de água, a cadeia de carbonos da AEA acaba se mantendo mais tempo estendida que nas simulações em água. Devido a flutuações nas posições, o que não ocorre na simulação da US, a porcentagem de tempo estendida é ligeiramente menor nas simulações de equilíbrio em comparação a US.

O aumento da concentração de anandamida pouco interfere nas propriedades da bicamada, os resultados para área por lipídio, parâmetro de ordem e espessura da membrana, não se mostram sensíveis a quantidade de AEA inseridos na bicamada, tendo todos seus valores dentro da barra de erros, esse resultado embora surpreendente já foi obtido e idealizado pela literatura [72]. Recentes dados experimentais de uma membrana de DOPC e concentrações crescentes de anandamida revelam que não ocorre mudanças nos valores de espessura da membrana, porém somente a inserção faz com que ocorra um aumento da passagem de íons [67]. Cantor já havia discutido que algumas concentrações de soluto na bicamada, embora

suficientes para (des)ativar seu efeito biológico não influenciam as propriedades de empacotamento da bicamada [71,70,72].

Com os resultados discutidos é possível responder duas questões propostas no objetivo deste trabalho:

“Como a AEA se comporta no interior da membrana? ”

Com sua estrutura preferencialmente estendida, mantendo seus grupos cabeça voltados para a face aquosa, próximo ao grupo glicerol e éster e fazendo ligações de hidrogênio com o grupo fosfato e éster do DOPC. A posição da anandamida na bicamada parece ser influenciada pela concentração de anandamida, quanto maior a quantidade de soluto mais inserida na bicamada (próxima ao núcleo hidrofóbico) a AEA se torna.

“Quais propriedades ela altera? ”

As propriedades da bicamada de DOPC pouco se alteram com a inserção das AEAs, mantendo os valores de área por lipídio, espessura da membrana e parâmetro de ordem com resultados semelhantes aos obtidos pela bicamada de DOPC pura.

6. Pressão Lateral

Neste capítulo serão abordadas as mudanças no perfil de pressão lateral causada pela inserção de moléculas de anandamida em uma bicamada de DOPC. Como mostrado nos capítulos anteriores, a anandamida é uma molécula anfifílica e se insere na bicamada fosfolipídica com seus grupos polares voltados para a região das cabeças do DOPC e com sua cauda acílica junto as caudas do DOPC. Cantor [72] já havia discutido que mesmo com pequenas alterações nas propriedades estruturais da bicamada, os analgésicos alteram grandemente a PL da bicamada ao qual se particionavam, sabendo que a AEA particiona em uma bicamada, pouco afeta as propriedades estruturais da membrana e possui um caráter anfifílico, a investigação das alterações no perfil de pressão lateral parecem ajudar a elucidar os efeitos da anandamida em uma bicamada de DOPC.

As concentrações crescentes de anandamida pouca alteram as propriedades da membrana, como a sua espessura, área por lipídio e o parâmetro de ordem, porém ocorre uma diminuição de suas ligações de hidrogênio com o DOPC. Este resultado parece estar relacionado com a posição relativa a membrana que a AEA ocupa. Com o aumento da concentração, se afastam do grupo glicerol e se aproximam do carbono terminal do DOPC, conseqüentemente ocorre um afastamento do grupo fosfato que leva a diminuição das ligações de hidrogênio.

Dessa forma, como as mudanças estruturais na bicamada não parecem sensíveis a concentração de AEA, é pertinente investigar se ocorrem mudanças nas propriedades elásticas da membrana que poderiam modificar o estado conformacional das proteínas inseridas na bicamada. Para obter estes resultados foi calculado o perfil de pressão lateral das simulações de equilíbrio e os resultados obtidos estão mostrados na figura 34.

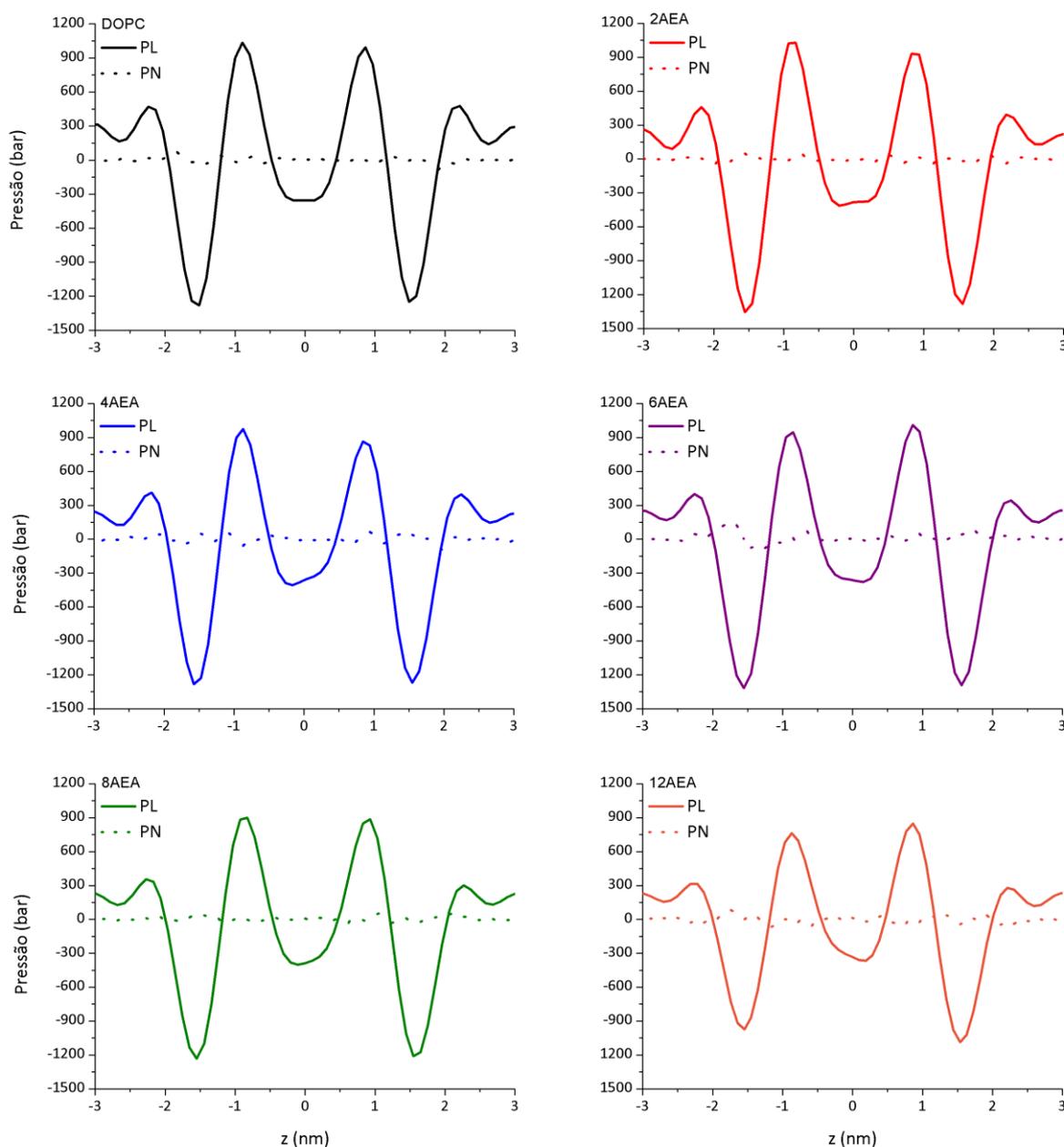


Figura 34: Pressão normal e lateral para as simulações de equilíbrio. A linha inteira representa a pressão lateral, enquanto a tracejada se refere a pressão normal.

A figura 34 mostra o perfil de pressão lateral e normal das simulações realizadas nesse trabalho para as diferentes concentrações de anandamida, onde a linha inteira representa a pressão lateral e a linha tracejada representa a pressão normal ao plano da bicamada. A simulação foi realizada a uma temperatura de 300K e o perfil da PL foi calculado utilizando a metodologia proposta por Ollila et al. [73] sem nenhuma restrição de ligação, e detalhado na seção 2.13 do capítulo de materiais e métodos.

Os perfis foram centralizados, fazendo com que o zero represente o centro da bicamada, todas as curvas passaram por um processo de suavização.

Os perfis da PL, como esperado, apresentam as mesmas características para todas as simulações realizadas. Analisando a curva da esquerda para a direita, vemos que o perfil apresenta valores próximos de zero na região aquosa, valores positivos para a região interfacial, indicando uma forte repulsão entre as cabeças fosfolipídicas, seguidos de valores negativos, correspondendo a contração da área da bicamada para impedir a entrada de água na região hidrofóbica da membrana e na região das cadeias acílicas encontra-se um pico positivo, resultante da alta mobilidade das caudas do DOPC. O pico central não é encontrado em nossas simulações pois a dupla ligação das cadeias acílicas do DOPC desloca o pico para a região interfacial [181,70].

A PL obtida na figura 34 pode ser comparado a simulações de DOPC da literatura, o formato das curvas obtidas neste trabalho e na literatura estão de acordo, pequenas diferenças aparecem devido a modificações de protocolos, porém em todos os casos as características descritas acima permanecem inalteradas [91].

O perfil de pressão lateral é obtido pela diferença da pressão lateral e normal, mostrada na equação 2.33. Portanto a figura 35 mostra os perfis da PL para as diferentes quantidades de AEA das simulações de equilíbrio. Para facilitar a comparação, todas as curvas foram centralizadas e colocadas na mesma figura.

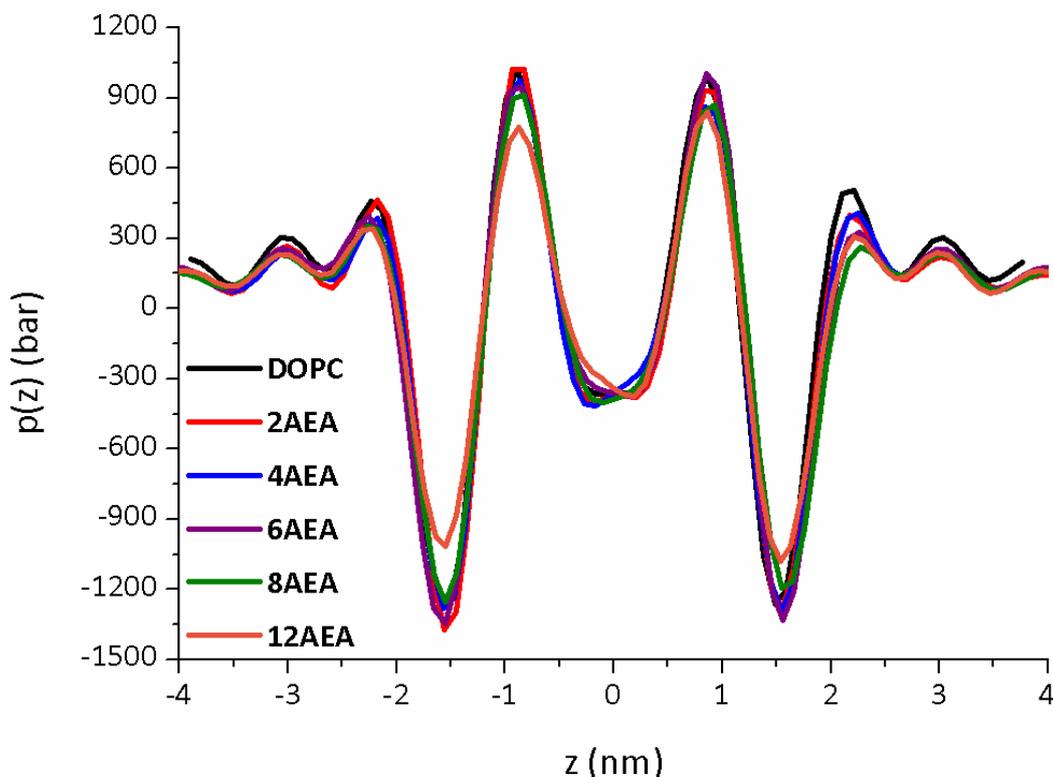


Figura 35: Perfil de pressão lateral $p(z)$ para as simulações de equilíbrio com diferentes quantidades de AEA.

Analisando a figura 35, na região das cabeças fosfolipídicas, correspondente a posição aproximada de ± 2 nm, ocorre uma diminuição da PL com o aumento da concentração de AEA, este mesmo efeito ocorre na região das caudas, representada como o pico localizado próximo a $\pm 0,75$ nm. Efeito contrário ocorre na região próxima a $\pm 1,5$ nm, onde a concentração aumenta a PL dessa região.

Este resultado mostra claramente uma dependência da PL com a concentração de AEA, e está de acordo com o esperado, a inserção da AEA altera as propriedades elásticas da membrana que podem ser claramente notados pelas alterações do perfil de pressão lateral.

A anandamida é sintetizada a partir do fosfolipídio POPE, uma das características deste fosfolipídio é ter um grupo cabeça pequeno se comparado a outros, dessa maneira ao inserirmos a anandamida poderíamos relacionar seu efeito ao de um fosfolipídeo de POPE, Gullingsrud em 2004 [182] encontrou uma diminuição da PL na região das cabeças para a simulação de POPE em comparação com a de POPC, esse mesmo efeito parece ocorrer, onde a inserção de AEA diminui a PL na região das cabeças mas acaba aumentando na região das caudas.

Outra possibilidade para os diferentes valores de PL para as diferentes concentrações, pode ter sido ocasionado pela modificação na posição da AEA, foi discutido no capítulo 5, que conforme aumenta-se a quantidade de anandamidas na bicamada, ocorre uma modificação em sua posição, onde se aproxima do núcleo hidrofóbico, conseqüentemente se afasta da interface. Ao se afastar da região das cabeças dos fosfolipídios um espaço ficaria aberto, o que levaria a uma diminuição da pressão lateral, como ocorre com o perfil na região $\pm 2\text{nm}$. Da mesma forma, sua nova posição, mais próxima ao grupo éster afetaria a PL, deixando menos espaço e aumentando o valor da pressão próximo a região $\pm 1,5\text{ nm}$.

As mudanças no perfil da PL, sugerem uma alteração das propriedades elásticas da membrana causadas pela inserção de anandamida, e essas modificações estão relacionadas aos valores dos momentos da PL pelas equações 2.34 e 2.35, dessa maneira foram calculados os valores dos momentos, e os resultados estão mostrados na tabela 17.

Tabela 17. Valores do primeiro e segundo momento, $M1$ e $M2$, respectivamente para as simulações com diferentes concentrações de AEA.

	$M1 [10^{-12} \text{ J/M}]$	$M2 [10^{-20} \text{ J}]$	$M1 [\text{K}_B\text{T}]$	$M2 [\text{K}_B\text{T}]$
DOPC	-2,87	-1,94	-0,69	-4,7
2AEA	-9,1	-5,9	-2,27	-14,3
4AEA	-10,8	-7,9	-2,6	-19,2
6AEA	-11,1	-11,5	-2,7	-27,8
8AEA	-15,4	-10,6	-3,7	-25,7
12AEA	-14,1	-7,13	-3,4	-17,2

Está disponível na literatura dados de $M1$ para o DOPC, o valor obtido foi de $-16,1 \cdot 10^{-12} \text{ J/m}$ [91], este resultado é mais negativo do que o encontrado neste trabalho ($-2,87 \cdot 10^{-12} \text{ J/m}$), porém a simulação da literatura foi obtida para a temperatura de 323K, enquanto neste trabalho todas as simulações foram realizadas a 300K.

A temperatura produz alterações na estrutura e transição de fase de uma bicamada, que podem levar a mudanças conformacionais na membrana, medidas de espalhamento difuso de raio-X para uma bicamada de DOPC, mostram que a bicamada tende a ficar mais fina com o aumento da temperatura, e que seus parâmetros elásticos como, o modulo de curvatura diminui conforme a temperatura aumenta [183]. Ao comparar nossos resultados com o da literatura

nota-se a mesma tendência, a simulação com maior temperatura [91] possui um valor menor de $M1$, que pode ser relacionado ao módulo de curvatura através da equação 2.34.

Parece haver uma dependência entre os momentos da PL e a concentração da anandamida, para facilitar a visualização a partir dos dados da tabela 17 foi feito um gráfico, cujo resultado está mostrado na figura 36.

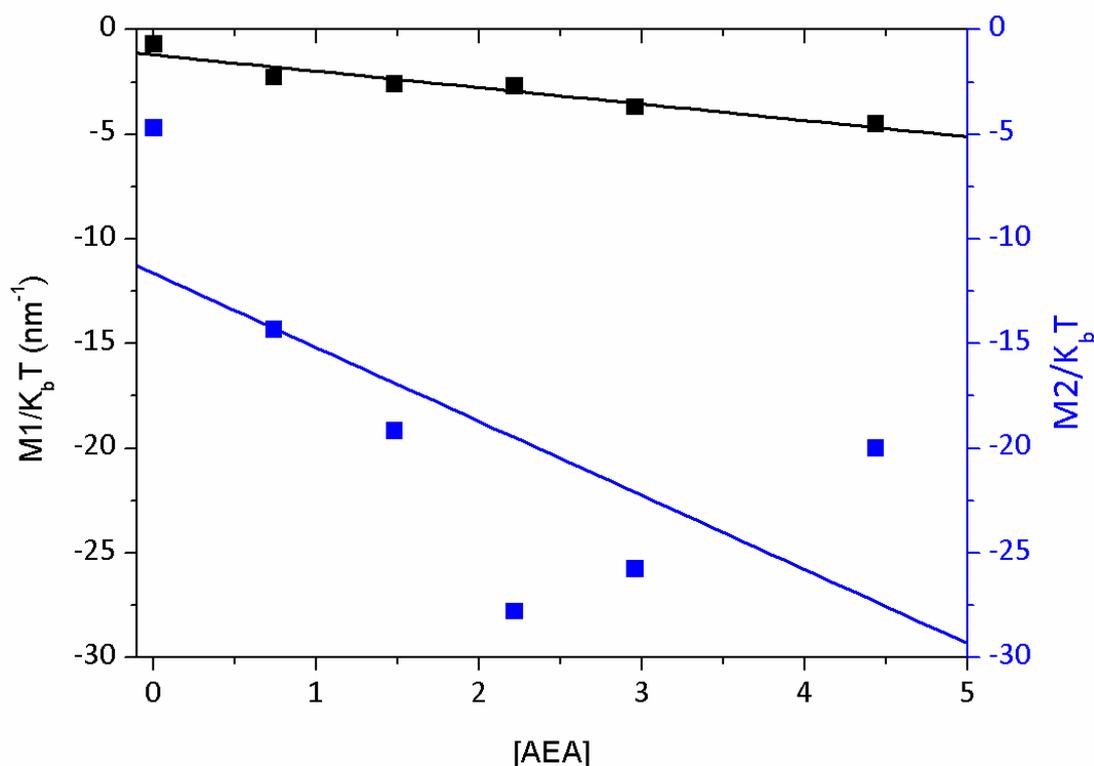


Figura 36: Momentos da pressão lateral. Em preto os valores para $M1$, e em azul valores para o $M2$.

Através da figura 36, nota-se claramente uma tendência de queda para os momentos, ao fazer um ajuste linear, o coeficiente angular para o $M1$ é de $-0,78 \text{ k}_b\text{T}/\text{nm}$ e para o $M2$ é de $-11,6 \text{ k}_b\text{T}$. O que indica uma queda mais acentuada para a segundo momento, recordando que este está relacionado ao módulo de curvatura gaussiana. Devido à falta de resultados teóricos e experimentais para os momentos do sistema AEA/bicamada não é possível a comparação com a literatura. Porém mesma tendência de queda foi observada para o sistema quetamina/POPC [87].

Para entender se essas diferenças nos valores dos momentos são suficientes para alterar as propriedades elásticas de uma bicamada, os dados obtidos na figura 36 foram colocados nos

modelos propostos por Cantor [162], e discutidos na introdução e detalhados na seção 2.13 do capítulo de matérias e métodos.

Para a aplicação do modelo é necessário conhecer a variação da área em função do eixo z , para a transição de estados de uma proteína transmembrânica, $\Delta A(z)$, para isto algumas argumentações mecânicas foram propostas e essa variação de área, juntamente com a variação dos momentos foram concentrados no parâmetro α , que representa a variação das modificações elásticas e mecânicas através da inserção das moléculas de anandamida, os valores obtidos para o parâmetro α obtidas pelo modelo de inclinação cooperativa e de hélices dobradas se encontram na tabela 18.

Tabela 18. Valores do parâmetro alfa para as simulações de equilíbrio com diferentes quantidades de anandamida. Estes resultados foram obtidos para o método Inclinação cooperativa e hélices dobradas. A última coluna se refere a relevância do valor obtido.

	Inclinação Cooperativa	Hélices Dobradas	Relevante
2AEA	-3,02	-2,33	Sim
4AEA	-4,55	-3,22	Sim
6AEA	-7,25	-4,46	Sim
8AEA	-6,61	-4,82	Sim
12AEA	-4,80	-4,53	Sim

A tabela 18, mostra os valores de α para os modelos de Inclinação cooperativa e de hélices dobradas ambas propostas por Cantor, a literatura mostra que se esses valores são maiores que $\ln(2) \sim 0,69$ há a modificação dos parâmetros estruturais da bicamada que poderiam gerar abertura ou fechamento de proteínas transmembrânicas [184], ou seja, a modificação das propriedades elásticas da bicamada seriam relevantes para o modelo.

Os resultados obtidos mostram que em ambos modelos o valor limite de α foi alcançado, e é possível notar uma tendência de aumento do módulo do valor conforme aumenta-se a concentração de AEA. Como o valor obtido para α é menor do que zero, o modelo propõe que ocorra uma ativação das proteínas transmembrânicas, ou seja, a inserção da anandamida favorece uma ativação ou abertura das proteínas ou canais iônicos, para evidenciar a dependência da concentração com ativação das proteínas foi realizado um gráfico tipo dose-resposta, mostrado na figura 37.

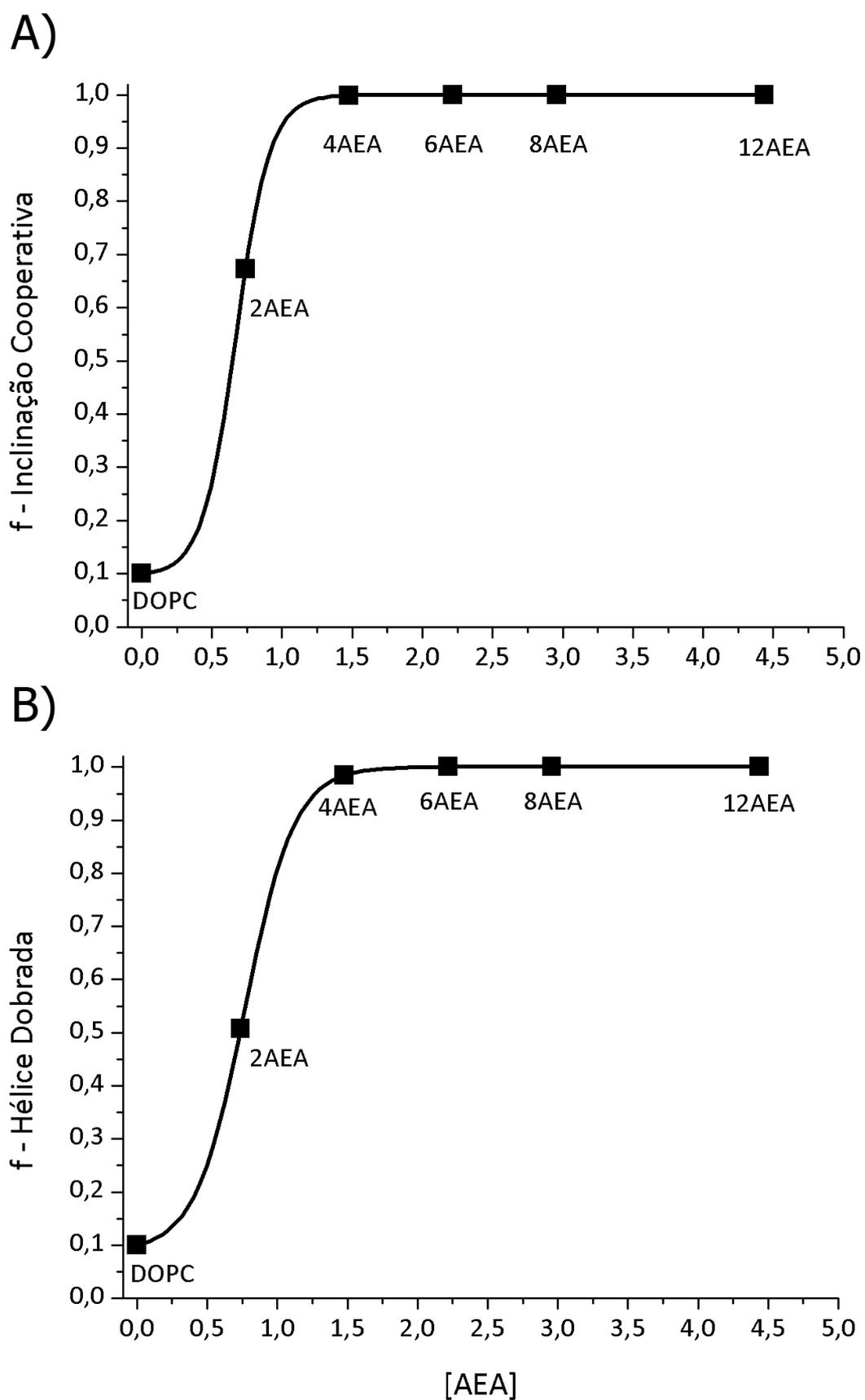


Figura 37: Fração de proteínas ativas por concentração de AEA para os modelos propostos por Cantor, A) Inclinação cooperativa, B) Hélices Dobradas.

A figura 37 mostra um gráfico dose resposta, onde f é o fator de abertura dos canais para a concentração de anandamida na bicamada, em ambos modelos foi assumido que 10% dos canais estariam no estado aberto na ausência da anandamida. Nos dois modelos aplicados, inclinação cooperativa e hélices dobradas, foi obtida uma curva de ativação, ou seja, a concentração de anandamida aumenta a fração de proteínas abertas, induzidas pelas mudanças na pressão lateral. Entretanto o modelo de inclinação cooperativa tem o efeito mais pronunciado, chegando a abertura máxima em uma concentração aproximada de 1,52 mol%, já para o modelo de hélices dobradas esse valor é próximo de 1,7 mol%. Ambos valores representam uma quantidade aproximada de 6AEAs para 128 fosfolipídeos.

6.1 Discussão

Utilizando dinâmica molecular para simular as modificações causadas pela anandamida em uma bicamada de DOPC, foi possível averiguar as modificações no perfil de PL ocasionados pelo aumento da concentração de AEA. Os resultados obtidos neste capítulo mostram que a anandamida é capaz de modificar o perfil de pressão lateral de uma bicamada de DOPC, estas mudanças quando associadas aos parâmetros elásticos da bicamada revelam que a crescente concentração de AEA leva a membranas com menores valores de módulo de curvatura e módulo de curvatura gaussiana.

Associando os valores de momentos da PL com os modelos geométricos propostos por Cantor, a partir da concentração de 1,7mol% de AEA já é suficiente para ativar 100% das proteínas transmembrânicas. Dados experimentais corroboram com os dados obtidos neste trabalho, resultados experimentais de canais de gramicidim A (gA), mostram que a concentração crescente de AEA aumenta a frequência da aparição de canais assim como seu tempo de vida médio, sem apresentar grandes alterações nas propriedades na bicamada, estes resultados sugeriam que ocorreria uma modificação na pressão lateral, que facilitaria o formação do canais de gA [67].

Resultados semelhantes foram obtidos para a interação de fitoquímicos com uma bicamada de POPC, mesmo com modestas alterações nos parâmetros globais da membrana (área por lipídio, espessura da membrana e parâmetro de ordem), a inserção destas moléculas alteram o perfil de pressão lateral e conseqüentemente as propriedades elásticas da bicamada [185].

Com estas análises é possível responder as duas últimas perguntas propostas nesta tese:

E) Será que a crescente concentração de AEA altera a pressão lateral?

Sim, o perfil de pressão lateral mostrado na figura 35, claramente sofre alterações com a presença da anandamida. Na região da interface membrana/água ocorre uma diminuição da PL, seguidos de um aumento na região entre as cabeças e as caudas acíclicas e novamente uma diminuição na região das caudas. Estas modificações de PL foram associadas a maior inserção da anandamida na bicamada com o aumento da concentração.

F) Poderia ela ser capaz de alterar a pressão de tal forma que resultaria em uma abertura ou fechamento de proteínas de membrana, explicando assim seus efeitos sem receptores?

Através da figura 37, a crescente concentração de anandamida faz com que as proteínas transmembrânicas mudem do estado inativo para o ativo, a partir de uma concentração aproximada de 1,7mol% de AEA.

7. Conclusão

O intuito deste trabalho foi investigar o modo de ação independente de receptor para a anandamida, para isso, foram realizadas simulações por dinâmica molecular para uma bicamada de DOPC com crescentes concentrações de AEA, além do cálculo de energia livre para inserção da AEA na bicamada, e a partir destes resultados entender quais propriedades seriam alteradas pela presença da anandamida em uma bicamada lipídica.

Os resultados obtidos indicam que a anandamida tem seu mínimo de energia livre inserido na bicamada lipídica, sua conformação preferencial é a estendida, porém possui alta liberdade conformacional, o que a faz visitar outras estruturas dentro da bicamada. Sua posição na bicamada parece depender da concentração de AEA, em baixas concentrações tem seu grupo CH₂OH próximo ao glicerol e fazendo ligações de hidrogênio com o grupo fosfato, ambos do DOPC. Ao aumentar a concentração, as ligações de hidrogênio com o fosfato diminuem, e a AEA se aproxima do centro da bicamada.

As modificações estruturais na bicamada de DOPC são pouco alteradas devido a presença da anandamida, propriedades como espessura da membrana, parâmetro de ordem e área por lipídio mantiveram praticamente os mesmos valores da simulação do DOPC puro (todos os resultados se encontram nas respectivas barras de erro), porém houve grande variação no perfil de pressão lateral nas simulações.

Através do perfil da PL, é possível relacionar as propriedades elásticas da bicamada de DOPC com os momentos da PL, dessa maneira, ocorre uma diminuição dos valores das propriedades elásticas da bicamada com a inserção das anandamidas, essas alterações poderiam levar a uma transição nos estados de proteínas de membrana e explicando assim o efeito independente de receptor da AEA.

Para testar essa hipótese, foi utilizado modelos geométricos que representariam estas proteínas transmembrânicas, e associadas aos momentos da PL (coeficientes elásticos da bicamada) foi possível associar uma concentração de aproximadamente 1,7 mol% de AEA para ativar 100% das proteínas apenas com as modificações dos coeficientes elásticos da bicamada. Embora não há dados experimentais comparativos, efeito semelhante foi obtido experimentalmente nos canais de gramicidim A, onde o aumento da concentração de anandamida, aumenta a frequência de encontros da gA e o tempo de vida do poro.

Todos estes resultados reforçam a hipótese que além da interação direta com os receptores, a anandamida também interaja com a bicamada fosfolipídica modulando a atividade de algumas proteínas de membrana.

Referências

1. WARF, B. High points: An historical geography of cannabis. **Geographical Review**, v. 104, n. 4, p. 414-438.
2. CARLINI, E. A. A história da maconha no Brasil. **J. bras. psiquiatr.**, Rio de Janeiro, v. 55, n. 4, p. 314-317, 2006.
3. MECHOULAM, R.; HANUS, L. A historical overview of chemical research on cannabinoids. **Chem Phys Lipids**, v. 108, n. 1-2, p. 1-13, 2000.
4. ROBSON, P. Human studies of cannabinoids and medicinal cannabis., n. 168, p. 719-56, *Handb Exp Pharmacol*.
5. WOOD, T. B.; SPIVEY, N. W.; EASTERFIELD, T. H. III.—Cannabinol. Part I. **Journal of the Chemical Society, Transactions**, v. 75, p. 20-36, 1899.
6. MECHOULAM, R.; SHVO, Y. Hashish—I: the structure of cannabidiol. **Tetrahedron**, v. 19, n. 12, p. 2073-2078, 1963.
7. GAONI, Y.; MECHOULAM, R. Isolation, structure, and partial synthesis of an active constituent of hashish. **Journal of the American chemical society**, v. 86, n. 8, 1964.
8. ELSOHLY, M. A.; SLADE, D. Chemical constituents of marijuana: the complex mixture of natural cannabinoids. *Life sciences*, v. 78, n. 5, p. 539-548, 2005.
9. WISSEL, J. et al. Low dose treatment with the synthetic cannabinoid Nabilone significantly reduces spasticity-related pain. *Journal of neurology*, v. 253, n. 10, p. 1337-1341, 2006.
10. SKABEK, K.; ZĄBIK, Ł. Implementation of progressive meshes for hierarchical representation of cultural artifacts. *International Conference on Computer Vision and Graphics*, 2008, p. 123-132.
11. MATSUDA, L. A. et al. Structure of a cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA. *Nature*, v. 346, p. 561-564, 1990.
12. MUNRO, S.; THOMAS, K. L.; ABU-SHAAR, M. Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabonoids. *Nature*, v. 365, p. 61-65, 1993.
13. HOWLETT, A. C. Cannabinoid Receptor Signaling. In: _____ *Handbook of Experimental Pharmacology*. [S.l.]: Springer, 2004. Cap. Cannabinoids.

14. PERTWEE, R. G. Inverse agonism and neutral antagonism at cannabinoid CB1 receptors. *Life sciences*, v. 76, n. 12, p. 1307-1324, 2005.
15. MACKIE, K. Signaling via CNS cannabinoid receptors. *Molecular and cellular endocrinology*, v. 286, n. 1-2, p. S60-S65, 2008.
16. DI MARZO, V.; MATIAS, I. Endocannabinoid control of food intake and energy balance. *Nature neuroscience*, v. 8, n. 5, p. 585, 2005.
17. KREITZER, A. C.; MALENKA, R. C. Endocannabinoid-mediated rescue of striatal LTD and motor deficits in Parkinson's disease models. *Nature*, v. 445, n. 7128, p. 643, 2007.
18. PRYCE, G. et al. Direct suppression of CNS autoimmune inflammation via the cannabinoid receptor CB 1 on neurons and CB 2 on autoreactive T cells. *Nature Medicine*, v. 13, n. 4, p. 492, 2007.
19. MACKIE, K. MACKIE, Ken. Distribution of cannabinoid receptors in the central and peripheral nervous system. *Cannabinoids.*, p. 299-325, 2005.
20. MILLER, A. M.; STELLA, N. CB2 receptor-mediated migration of immune cells: it can go either way. *British journal of pharmacology*, v. 153, n. 2, p. 299-308, 2008.
21. CABRAL, G. A. et al. CB2 receptors in the brain: role in central immune function. *British journal of pharmacology*, v. 153, n. 2, p. 240-251, 2008.
22. DEVANE, W. A. et al. Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor. *Science*, v. 258, n. 5090, p. 1946-9, Dec 1992.
23. MECHOULAM, R. et al. Identification of an endogenous 2 mono-glyceride, present in canine gut, that binds to cannabinoid receptors. *Biochem Pharmacol*, v. 50, p. 83-90, 1995.
24. SUGIURA, T. et al. 2-Arachidonoylglycerol: a possible endogenous cannabinoid receptor ligand in brain. *Biochem. Biophys. Res Commun*, v. 215, p. 89-97, 1995. ISSN 10.1006/bbrc.1995.2437.
25. MATIAS, I.; DI MARZO, V. Endocannabinoids and the control of energy balance. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, v. 18, n. 1, p. 27-37, 2007.
26. DI MARZO, V.; DE PETROCELLIS, L. Why do cannabinoid receptors have more than one endogenous ligand? *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, v. 367, n. 1607, p. 3216-3228, 2012.

27. PERTWEE, R. G. et al. International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXIX. Cannabinoid receptors and their ligands: beyond CB1 and CB. *Pharmacological reviews*, v. 62, n. 4, p. 588-631, 2010.
28. HANUS, C. et al. 2-Arachidonyl glyceryl ether, an endogenous agonist of the cannabinoid CB1 receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, v. 98, p. 3662-5, 2001.
29. BISOGNO, T. et al. N-acyl-dopamines: novel synthetic CB(1) cannabinoid-receptor ligands and inhibitors of anandamide inactivation with cannabimimetic activity in vitro and in vivo. *Biochem J*, v. 351, p. 817-24, 2000.
30. HUANG, S. M. et al. An endogenous capsaicin-like substance with high potency at recombinant and native vanilloid VR1 receptors. *Proc Natl Acad Sci USA*, v. 99, p. 8400-5, 2002.
31. PORTER, A. C. et al. Characterization of a novel endocannabinoid, virodhamine, with antagonist activity at the CB1 receptor. *J Pharmacol Exp Ther*, v. 301, p. 1020-4, 2003.
32. DI MARZO, V. et al. Formation and inactivation of endogenous cannabinoid anandamide in central neurons. *Nature*, v. 372, p. 686-691, 1994.
33. SUGIURA, T. et al. Enzymatic synthesis of anandamide, an endogenous cannabinoid receptor ligand, through N-acylphosphatidylethanolamine pathway in testis: Involvement of Ca(2+) -dependent transacylase and phosphodiesterase activities. *Biochem Biophys Res Commun*, v. 218, p. 113-117, 1996.
34. CRAVATT, B. F. et al. Molecular characterization of an enzyme that degrades neuromodulatory fatty-acid amides. *Nature*, v. 384, p. 83-87, 1996.
35. MACCARRONE, M. et al. Programming of neural cells by (endo) cannabinoids: from physiological rules to emerging therapies. *Nature Reviews Neuroscience*, 12, 2014.
36. DI MARZO, V.; STELLA, N.; ZIMMER, A. Endocannabinoid signalling and the deteriorating brain. *ature reviews Neuroscience*, 1, 2015.
37. SOLTESZ, I. et al. Weeding out bad waves: towards selective cannabinoid circuit control in epilepsy. *Nature Reviews Neuroscience*, 5, 2015.
38. CURRAN, H. V. et al. Keep off the grass? Cannabis, cognition and addiction. *Nature Reviews Neuroscience*, 5, 2016.
39. MACCARRONE, M. et al. Endocannabinoid signaling at the periphery: 50 years after THC. *Trends in Pharmacological Sciences*, 5, 2015.

40. BENYÓ, Z. et al. Endocannabinoids in cerebrovascular regulation. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 7, 2016.
41. JOURDAN, T.; GODLEWSKI, G.; KUNOS, G. Endocannabinoid regulation of β -cell functions: implications for glycaemic control and diabetes. *Diabetes, Obesity and Metabolism*, 6, 2016.
42. SHARKEY, K. A.; WILEY, J. W. The role of the endocannabinoid system in the brain–gut axis. *Gastroenterology*, 2, 2016.
43. WANG, M. et al. Endocannabinoids signaling: molecular mechanisms of liver regulation and diseases. *Front. Biosci.(Landmark Ed)*, 2016.
44. SIBAEV, A. et al. The endocannabinoid anandamide regulates the peristaltic reflex by reducing neuro-neuronal and neuro-muscular neurotransmission in ascending myenteric reflex pathways in rats. *Pharmacological Reports*, v. 66, n. 2, p. 256-263, 2014.
45. BASAVARAJAPPA, B. S. et al. Elevation of endogenous anandamide impairs LTP, learning, and memory through CB1 receptor signaling in mice. *Hippocampus*, v. 24, n. 7, p. 808-818, 2014.
46. TRAUTMANN, S. M.; SHARKEY, K. A. The endocannabinoid system and its role in regulating the intrinsic neural circuitry of the gastrointestinal tract. *International review of neurobiology*, v. 125, p. 85-126, 2015.
47. EISENSTEIN, T. K. et al. Anandamide and Δ^9 -tetrahydrocannabinol directly inhibit cells of the immune system via CB2 receptors. *Journal of neuroimmunology*, 189, n. 1-2, 2007.
48. PIOMELLI, D. The molecular logic of endocannabinoid signalling. *Nat. Rev. Neurosci.*, v. 16, p. 579-94, 2003.
49. SAITO, V. M.; WOTJAK, C. T.; MOREIRA, F. A. Exploração farmacológica do sistema endocanabinoide: novas perspectivas para o tratamento de transtornos de ansiedade e depressão?, v. 32, n. 1, 2010.
50. KLEIN, T. W. Cannabinoid-based drugs as anti-inflammatory therapeutics. *Nat. Rev. Immunol.*, v. 5, p. 400-11, 2005.
51. MACCARRONE, M.; BATTISTA, N.; CENTONZE, D. The endocannabinoid pathway in Huntington's disease: a comparison with other neurodegenerative diseases. *Prog. Neurobiol.*, v. 81, p. 349-79, 2007.

52. FARKAS, S. et al. [125I]SD-7015 reveals fine modalities of CB1 cannabinoid receptor density in the prefrontal cortex during progression of Alzheimer's disease. *Neurochemistry International*, v. 60, n. 3, p. 286-291, 2012.
53. HANSEN, H. S.; DIEP, T. A. Acylethanolamines, anandamide and food intake. *Biochemical Pharmacology*, v. 78, n. 6, p. 553, 2009.
54. REGGIO, P. H. Endocannabinoid binding to the cannabinoid receptors: what is known and what remains unknown. *Curr. Med. Chem.*, v. 17, p. 1468-86, 2010.
55. JANERO, D. R.; MAKRIYANNIS, A. Terpenes and lipids of the endocannabinoid and transient-receptor-potential-channel biosignaling. *ACS Chem. Neurosci.*, v. 5, p. 1097-106, 2014.
56. CHEMIN, J. et al. Direct inhibition of T-type calcium channels by the endogenous cannabinoid anandamide. *EMBO J.*, v. 20, p. 7033-40, 2001.
57. OZ, M. Receptor-independent actions of cannabinoids on cell membranes: focus on endocannabinoids. *Pharmacol. Ther.*, v. 111, p. 114-44, 2006.
58. OZ, M. Receptor-independent effects of endocannabinoids on ion channels. *Curr. Pharm. Des.*, v. 12, p. 227-39, 2006.
59. FISYUNOV, A. et al. Cannabinoids modulate the P-type high-voltage-activated calcium currents in purkinje neurons. *J. Neurophysiol.*, v. 96, p. 1267-77, 2006.
60. MATO, S. et al. CB1 cannabinoid receptor-dependent and -independent inhibition of depolarization-induced calcium influx in oligodendrocytes. *Glia*, v. 57, p. 295-306, 2009.
61. BARANA, A. et al. Endocannabinoids and cannabinoid analogues block cardiac hKv1.5 channels in a cannabinoid receptor independent. *Cardiovasc. Res.*, v. 85, p. 56-67, 2010.
62. LISHKO, P. V. et al. Acid extrusion from human spermatozoa is mediated by flagellar voltage-gated proton channel. *Cell*, v. 140, p. 327-37, 2010.
63. HAMPSON, A. J. et al. Hampson, A. J., Bornheim, L. M., Scanziani, M., Yost, C. S., Gray, A. T., HanseDual effects of anandamide on NMDA receptor-mediated responses and neurotransmission. *Journal of neurochemistry*, 2, 1998.
64. HAMPSON, A. J. et al. Dual effects of anandamide on NMDA receptor-mediated responses and neurotransmission. *Journal of neurochemistry*, 70, n. 2, 1998.
65. HAJ-DAHMANE, S.; SHEN, R. Y. Modulation of the serotonin system by endocannabinoid signaling. *Neuropharmacology*, 61, n. 3, 2011.

66. MOUSLI, M. et al. G protein activation: a receptor-independent mode of action for cationic amphiphilic neuropeptides and venom peptides. *Trends in pharmacological sciences*, 11, n. 9, 1990.
67. MEDEIROS, D. et al. Membrane-mediated action of the endocannabinoid anandamide on membrane proteins: implications for understanding the receptor-independent mechanism. *Sci Rep.*, v. 27, n. 7, 2017.
68. BONDARENKO, A. I. et al. Direct activation of Ca²⁺ and voltage-gated potassium channels of large conductance by anandamide in endothelial cells does not support the presence of endothelial atypical cannabinoid receptor. *European journal of pharmacology*, 805, 2017.
69. OZ, M. et al. The endogenous cannabinoid, anandamide, inhibits dopamine transporter function by a receptor-independent mechanism. *Journal of neurochemistry*, 6, 2010.
70. CANTOR, R. S. Lipid composition and the lateral pressure profile in bilayers. *Biophys. J.*, v. 76, n. 5, p. 2625-2639, 1999.
71. CANTOR, R. S. Lateral pressures in cell membranes: a mechanism for modulation of protein function. *The Journal of Physical Chemistry B*, v. 101, n. 10, p. 1723-1725, 1997.
72. CANTOR, R. S. The lateral pressure profile in membranes: a physical mechanism of general anesthesia. *Biochemistry.*, v. 36, n. 9, p. 2339-44, 4 Mar 1997.
73. OLLILA, S. Lateral pressure in lipid membranes and its role in function of membrane proteins. [S.l.]. 2010.
74. WIEDMANN, T. S. et al. Lipid-protein interactions mediate the photochemical function of rhodopsin. *Biochemistry*, v. 27, n. 17, p. 6469-6474, 1988.
75. GIBSON, N. J.; BROWN, M. F. Lipid headgroup and acyl chain composition modulate the MI-MII equilibrium of rhodopsin in recombinant membranes. *Biochemistry*, v. 32, n. 9, p. 2438-2454, 1993.
76. BROWN, M. F. Modulation of rhodopsin function by properties of the membrane bilayer. *Chemistry and physics of lipids*, v. 73, n. 1-2, p. 159-180, 1994.
77. MARSH, D. Lateral pressure in membranes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Biomembranes*, v. 1286, n. 3, p. 183-223, 1996.
78. SANSOM, M. S. P.; BIGGIN, P. C. *Molecular Simulations and Biomembranes: From Biophysics to Function*. 1. ed. [S.l.]: RSC Biomolecular Sciences, 2010.

79. PEROZO, E.; REES, D. C. Structure and mechanism in prokaryotic mechanosensitive channels. *Current opinion in structural biology*, v. 13, n. 4, p. 432-442, 2003.
80. FOLGERING, J. H. et al. Lipid-mediated light activation of a mechanosensitive channel of large conductance. *Langmuir*, v. 20, n. 17, p. 6985-6987, 2004.
81. KUIPER, M. PhD Thesis. [S.l.]: [s.n.], 2005.
82. VAN DEN BRINK-VAN DER LAAN, E. et al. Small alcohols destabilize the KcsA tetramer via their effect on the membrane lateral pressure.. *Biochemistry*, v. 43, n. 20, p. 5937-5942, 2004.
83. VAN DEN BRINK-VAN DER LAAN, E. et al. Stability of KcsA tetramer depends on membrane lateral pressure. *Biochemistry*, v. 43, n. 14, p. 4240-4250, 2004.
84. BOTELHO, A. V. et al. Curvature and hydrophobic forces drive oligomerization and modulate activity of rhodopsin in membranes. *Biophysical journal*, v. 91, n. 12, p. 4464-4477, 2006.
85. ATTARD, G. S. et al. Modulation of CTP: phosphocholine cytidyltransferase by membrane curvature elastic stress. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 97, n. 16, p. 9032-9036, 2000.
86. SHEARMAN, G. C. et al. Using membrane stress to our advantage., 2007.
87. JERABEK, H. et al. Membrane-mediated effect on ion channels induced by the anesthetic drug ketamine. *Journal of the American Chemical Society*, v. 132, n. 23, p. 7990-7997, 2010.
88. MCINTOSH, T. J.; SIMON, S. A. Roles of bilayer material properties in function and distribution of membrane proteins. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, v. 35, p. 177-198, 2006.
89. TEMPLER, R. H. et al. Sensing isothermal changes in the lateral pressure in model membranes using di-pyrenyl phosphatidylcholine. *Faraday discussions*, v. 111, p. 41-53, 1999.
90. KAMO, T. et al. Effects of an amphipathic α -helical peptide on lateral pressure and water penetration in phosphatidylcholine and monoolein mixed membranes. *The Journal of Physical Chemistry B*, v. 110, n. 49, p. 24987-24992, 2006.
91. OLLILA, O. S. et al. Role of sterol type on lateral pressure profiles of lipid membranes affecting membrane protein functionality: comparison between cholesterol, desmosterol,

- 7-dehydrocholesterol and ketosterol. *Journal of structural biology*, v. 159, n. 2, p. 311-323, 2007.
92. ČURDOVÁ, J. et al. Free pyrene probes in gel and fluid membranes: perspective through atomistic simulations. *The Journal of Physical Chemistry B*, v. 111, n. 14, p. 3640-3650, 2007.
93. HELFRICH, W. Elastic properties of lipid bilayers: theory and possible experiments. *Zeitschrift für Naturforschung C*, 28, n. 11-12, 1973.
94. MARSH, D. Lateral pressure profile, spontaneous curvature frustration, and the incorporation and conformation of proteins in membranes. *Biophysical Journal*, 93, 2007.
95. BOCHICCHIO, D.; MONTICELLI, L. BOCHICCHIO, D. The membrane bending modulus in experiments and simulations: a puzzling picture. *Advances in Biomembranes and Lipid Self-Assembly*, v. 23, p. 117-143, 2016.
96. LIU, J. et al. Endocytic vesicle scission by lipid phase boundary forces. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 103, n. 27, p. 10277-10282, 2006.
97. MCMAHON, H. T.; GALLOP, J. L. Membrane curvature and mechanisms of dynamic cell membrane remodelling. *Nature*, v. 438, n. 7068, p. 590, 2005.
98. CHERNOMORDIK, L.; KOZLOV, M. M.; ZIMMERBERG, J. Lipids in biological membrane fusion. *The Journal of membrane biology*, v. 146, n. 1, p. 1-14, 1995.
99. MARSH, D. Elastic curvature constants of lipid monolayers and bilayers. *Chem Phys Lipids*, v. 144, p. 146-159, 2006.
100. RAPPOLT, M.; PABST, G. Flexibility and structure of fluid bilayer interfaces. *Structure and dynamics of Membranous Interface*, v. 100, p. 198103, 2014.
101. ZIMMERBERG, J.; KOZLOV, M. M. How proteins produce cellular membrane curvature. *Nature reviews Molecular cell biology*, v. 7, n. 1, p. 9, 2006.
102. FROST, A.; UNGER, V. M.; DE CAMILLI, P. The BAR domain superfamily: membrane-molding macromolecules. *Cell*, v. 137, n. 2, p. 191-196, 2009.
103. KOZLOV, M. M. Biophysics: Joint effort bends membrane. *Nature*, v. 463, n. 7280, p. 439, 2010.
104. HAMAI, C. et al. Effect of average phospholipid curvature on supported bilayer formation on glass by vesicle fusion. *Biophysical Journal*, v. 90, n. 4, p. 1241-1248, 2006.

105. BLOOD, P. D.; SWENSON, R. D.; VOTH, G. A. Factors influencing local membrane curvature induction by N-BAR domains as revealed by molecular dynamics simulations.. *Biophysical journal*, v. 95, n. 4, p. 1866-1876, 2008.
106. CAMPELO, F.; MCMAHON, H. T.; KOZLOV, M. M. The hydrophobic insertion mechanism of membrane curvature generation by proteins. *Biophysical journal*, v. 95, n. 5, p. 2325-2339, 2008.
107. BLOOD, P. D.; VOTH, G. A. Direct observation of Bin/amphiphysin/Rvs (BAR) domain-induced membrane curvature by means of molecular dynamics simulations. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 103, n. 41, p. 15068-15072, 2006.
108. ARKHIPOV, A.; YIN, Y.; SCHULTEN, K. Four-scale description of membrane sculpting by BAR domains. *Biophysical journal*, v. 95, n. 6, p. 2806-2821, 2008.
109. ARKHIPOV, A.; YIN, Y.; SCHULTEN, K. Membrane-bending mechanism of amphiphysin N-BAR domains. *Biophysical journal*, v. 97, n. 10, p. 2727-2735, 2009.
110. ECKENHOFF, R. G.; JOHANSSON, J. S. Molecular interactions between inhaled anesthetics and proteins. *Pharmacological Reviews*, 4, 1997.
111. MULLINS, L. J. Some Physical Mechanisms in Narcosis. *Chem. Rev.*, v. 54, n. 2, p. 289-323, 1954.
112. JOHNSON, S. M.; MILLER, K. W. Antagonism of Pressure and Anaesthesia. *Nature*, v. 228, p. 75-76, 1970.
113. JAIN, M. K.; WU, N. Y.; WRAY, L. V. Drug-induced phase change in bilayer as possible mode of action of membrane expanding drugs. *Nature*, v. 255, n. 5508, p. 494-6, 1975.
114. MILLER, K. W.; PANG, K. Y. General anaesthetics can selectively perturb lipid bilayer membranes. *Nature*, v. 263, p. 253-55, 1976.
115. UNWIN, N. Acetylcholine receptor channel imaged in the open state. *Nature*, 6509, 1995.
116. TILLMAN, T. S.; CASCIO, M. Effects of membrane lipids on ion channel structure and function. *Cell Biochem. Biophys.*, v. 38, p. 161-90, 2003.
117. ANDERSEN, O. S.; KOEPPE, R. E. Bilayer thickness and membrane protein function: an energetic perspective. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, v. 36, p. 107-30, 2007.

118. MARSH, D. Protein modulation of lipids, and vice-versa, in membranes. *Biochim. Biophys. Acta*, v. 1778, p. 1545-75, 2008.
119. HAJILAR, S.; SHAFEL, B. Atomic-scale investigation of physical adsorption of water molecules and aggressive ions to ettringite's surfaces. *J Colloid Interface Sci.*, v. 513, p. 104-116, 2017.
120. BRUCE, N. J. et al. New approaches for computing ligand-receptor binding kinetics. *Curr Opin Struct Biol.*, v. 49, p. 1-10, 2017.
121. NAGASAKA, M.; YUZAWA, H.; KOSUGI, N. Interaction between Water and Alkali Metal Ions and Its Temperature Dependence Revealed by Oxygen K-Edge X-ray Absorption Spectroscopy. *J Phys Chem B.*, 2017.
122. ELFGEN, R.; HOLLÓCZKI, O.; KIRCHNER, B. A Molecular Level Understanding of Template Effects in Ionic Liquids. *Acc Chem Res.*, 2017.
123. GUERRA, M. R. et al. MD simulations and multivariate studies for modeling the antileishmanial activity of peptides. *Chem Biol Drug Des.*, v. 90, n. 4, p. 501-510, 2017.
124. MARTINS, D. B. et al. Membrane targeting peptides toward antileishmanial activity: Design, structural determination and mechanism of interaction. *Biochim Biophys Acta.*, p. 2861-2871, 2017.
125. OOSTENBRINK C., VILLA A., MARK A.E., VAN GUNSTEREN W.F.. A biomolecular force field based on the free enthalpy of hydration and solvation: The GROMOS force-field parameter sets 53A5 and 53A6. *Journal of Computational Chemistry*, v. 25, p. 1656-1676, 2004.
126. DARDEN T., YORK D., PEDERSEN L.. Particle mesh Ewald: An $N_{\log}(N)$ method for Ewald sums in large systems. *J. Chem. Phys.*, v. 98, p. 10089-10092, 1993.
127. ESSMANN, U., PERERA, L., BERKOWITZ, M. L., DARDEN, T., LEE, H., PEDERSEN, L. G. A smooth particle mesh ewald potencial. *J. Chem. Phys*, v. 103, p. 8577-8592, 1995.
128. MORGON M.H., COUTINHO K.. *Métodos de Química Teórica e Modelagem Molecular*. São Paulo: Livraria da Física, 2007.
129. VAN GUNSTEREN, W. F.; BERENDSEN, H. J. C. A leap-frog algorithm for stochastic dynamics. *Mol. Sim.*, p. 173-185, 1988.

130. MIYAMOTO S., K. P. A. Settle: An analytical version of the SHAKE and RATTLE algorithm for rigid water models. *J. Comp. Chem.*, v. 13, p. 952-962, 1992.
131. HESS, B. et al. LINCS: A linear constraint solver for molecular simulations. *J. Comp. Chem.*, v. 18, p. 1463-1472, 1992.
132. BUSSI, G.; DONADIO, D.; PARRINELLO, M. Canonical sampling through velocity rescaling. *J Chem Phys.*, v. 126, n. 1, 2007.
133. EVAN, D. J.; HOLIAN, B. L. The Nose-Hoover thermostat. *The Journal of Chemical Physics*, v. 83, 1985.
134. PARRINELLO, M.; RAHMAN, A. Polymorphic transitions in single crystals: A new molecular dynamics method. *J Appl. Phys*, v. 52, 1981.
135. EISENHABER, F. et al. The double cubic lattice method: Efficient Approaches to numerical integration of surface area and volume and to dot surface contouring of molecular assemblies. *Journal of Computational Chemistry*, v. 16, p. 273-284, 1995.
136. DAURA, X. et al. Peptide Folding: When Simulation Meets Experiment. *Angewandte Chemie International Edition*, v. 38, p. 236-240, 1999.
137. CHAU, P. L.; HARDWICK, A. J. A new order parameter for tetrahedral configurations. *Molecular Physics*, v. 93, n. 3, p. 511-518, 1998.
138. LUKAT, G.; KRUGER, J.; SOMMER, B. A Voronoi-based Membrane Analysis Tool for Gromacs Trajectories. *J Chem Inf Model*, 2013.
139. BERENDSEN H.J.C., POSTMA J.P.M., VAN GUNSTEREN W.F., HERMANS J.. Interaction models for water in relation to protein hydration. *Intermolecular Forces*, p. 331-342, 1981.
140. GUERRA, M. E. R. et al. Md simulations and multivariate studies for modeling the antileishmanial activity of peptides. *Chemical biology & drug design*, 60, n. 4, 2017.
141. BALDISSERA, G. et al. Role of peptide-peptide interactions in aggregation: protonectins observed in equilibrium and replica exchange molecular dynamics simulations. *Biochemistry*, 54, n. 13, 2015.
142. DOS SANTOS CABRERA, M. P. et al. Combining experimental evidence and molecular dynamic simulations to understand the mechanism of action of the antimicrobial octapeptide Jelleine-I. *Biochemistry*, 53, n. 29, 2014.

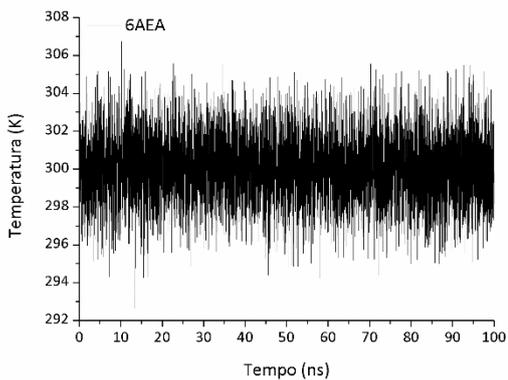
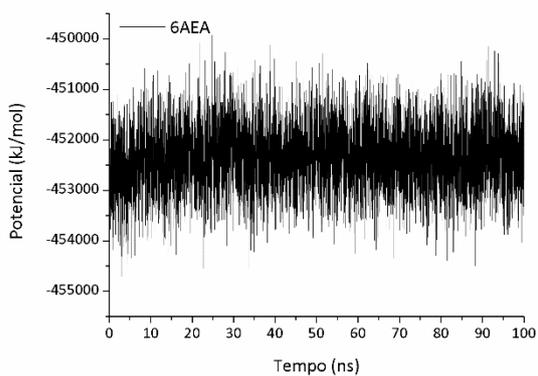
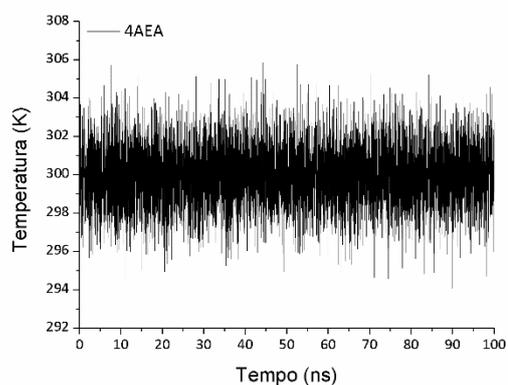
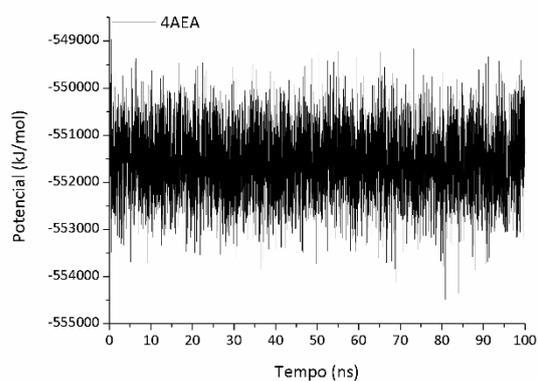
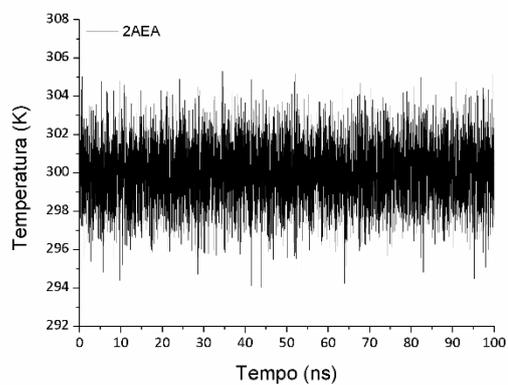
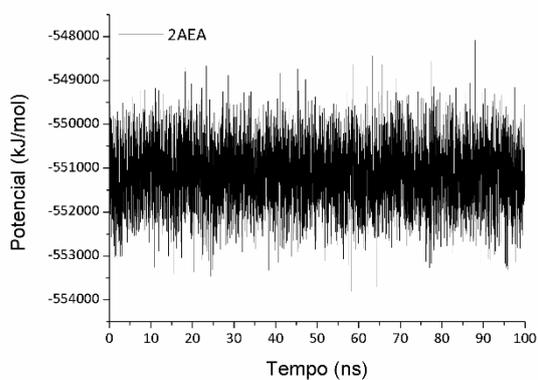
143. SIU, S. W. et al. Biomolecular simulations of membranes: physical properties from different force fields. *J Chem Phys*, v. 128, 2008.
144. MALDE, A. K. et al. An Automated force field Topology Builder (ATB) and repository: version 1.0. *Journal of Chemical Theory and Computation*, v. 7, n. 12, p. 4026-437, 2011. Disponivel em: <<http://compbio.biosci.uq.edu.au/atb/>>.
145. BEVERIDGE, D. L.; DICAPUA, D. M. Free Energy Via Molecular Simulation: Applications to Chemical and Biomolecular Systems. *Annual Review of Biophysics and Biophysical Chemistry*, 18, n. 1, 1989.
146. TORRIE, G. M.; VALLEAU, J. P. Nonphysical sampling distributions in Monte Carlo free-energy estimation - Umbrella sampling. *Journal of Computational Physics*, v. 23, p. 187-199, 1977.
147. HUB, J. S.; DE GROOT, B. L.; VAN DER SPOEL, D. g_wham - A Free Weighted Histogram Analysis Implementation Including Robust Error and Autocorrelation Estimates. *J. Chem. Theory Comput.*, v. 6, p. 3713-3720, 2010.
148. SCHOFIELD, P.; HENDERSON, J. *Statistical Mechanics of Inhomogeneous Fluids*. 379. ed. [S.l.]: Proceedings of The Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences., 1982. 231-246 p.
149. GOETZ, R.; LIPOWSKY, R. Computer simulations of bilayer membranes: Self-assembly and interfacial tension. *The Journal of Chemical Physics* , v. 108, 1998.
150. MISTURA, L. The definition of the pressure tensor in the statistical mechanics of nonuniform classical fluids. *Int J Thermophys*, v. 8, 1987.
151. HAFSKJOLD, B.; IKESHOJI, T. Microscopic pressure tensor for hard-sphere fluids. *Phys. Rev. E*, v. 66, 2002.
152. WAJNRYB, E.; ALTENBERGER, A. R.; DAHLER, J. S. Uniqueness of the microscopic stress tensor. *The Journal of Chemical Physics*, v. 103, 1995.
153. MORANTE, S.; ROSSI, G. C. The stress tensor of a molecular system: An exercise in statistical mechanics. *The Journal of Chemical Physics*, v. 125, 2006.
154. IRVING, J. H.; KIRKWOOD, J. G. The Statistical Mechanical Theory of Transport Processes. IV. The Equations of Hydrodynamics. *The Journal of Chemical Physics* , v. 18, 1950.

155. HARASIMA, A. Molecular theory of surface tension. *Adv. Chem. Phys.*, v. 1, p. 203-237, 1958.
156. LINDAHL, E.; EDHOLM, O. J. Spatial and energetic-entropic decomposition of surface tension in lipid bilayers from molecular dynamics simulations. *The Journal of Chemical Physics* , v. 113, 2000.
157. ROWLINSON, J. S.; WIDOM, B. *Molecular Theory of Capillarity*. Oxford: Clarendon press, 1982.
158. VENEGAS, J. M.; TORRES-SÁNCHEZ, A.; ARROYO, M. Importance of force decomposition for local stress calculations in biomembrane molecular simulations. *Journal of chemical theory and computation*, 2, 2014.
159. TORRES-SÁNCHEZ, A.; VENEGAS, J. M.; ARROYO, M. Examining the mechanical equilibrium of microscopic stresses in molecular simulations. *Physical review letters*, 25, 2015.
160. TORRES-SÁNCHEZ, A.; VANEGAS, J. M.; ARROYO, M. Geometric derivation of the microscopic stress: A covariant central force decomposition. *Journal of the Mechanics and Physics of Solids*, 2016.
161. SAFRAN, S. A. *Statistical Thermodynamics of Surfaces, Interfaces, and Membranes*. [S.l.]: Addison-Wesley, 1994.
162. CANTOR, R. S. The influence of membrane lateral pressures on simple geometric models of protein conformational equilibria. *Chemistry and physics of lipids*, 101, n. 1, 1999.
163. ULRICH, A.; SAMI, M.; WATTS, A. Hydration of dopc bilayers by differential scanning calorimetry. *Biochim. Biophys. Acta-Biomembr.*, 1191, 1994.
164. VAN DER SPOEL, D. et al. GROMACS: fast, flexible, and free. *Journal of computational chemistry*, 16, n. 26, 2005.
165. DELANO, W. L. *PyMOL*, 2002.
166. HOOVER, W. G. Canonical dynamics: Equilibrium phase-space distributions. *Phys. Rev. A* , 1985.
167. NOSÉ, S. Nosé S. A molecular dynamics method for simulations in the canonical ensemble. *Molecular physics*, 52, n. 2, 1984.

168. NOSÉ, S. A molecular dynamics method for simulations in the canonical ensemble. *Molecular physics*, 52, n. 2, 1984.
169. BERENDSEN, H. J. et al. Molecular dynamics with coupling to an external bath. *The Journal of chemical physics*, 81, n. 8, 1984.
170. WATSON, P. E.; WATSON, I. D.; BATT, R. D. Total body water volumes for adult males and females estimated from simple anthropometric measurements. *The American journal of clinical nutrition*, 1, 1980.
171. SANSON, B. et al. Crystallographic study of FABP5 as an intracellular endocannabinoid transporter. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*, 70, n. 2, 2014.
172. BARNETT-NORRIS, J. et al. Exploration of biologically relevant conformations of anandamide, 2-arachidonylglycerol, and their analogues using conformational memories. *Journal of medicinal chemistry*, v. 41, n. 24, p. 4861-4872, 1988.
173. ZHANG, J. et al. Comparison of Implicit and Explicit Solvent Models for the Calculation of Solvation Free Energy in Organic Solvents.. *Journal of chemical theory and computation*, v. 13, n. 3, p. 1034-1043, 2017.
174. LYNCH, D. L.; REGGIO, P. H. Molecular dynamics simulations of the endocannabinoid N-arachidonylethanolamine (anandamide) in a phospholipid bilayer: probing structure and dynamics. *Journal of medicinal chemistry*, 48, n. 15, 2005. 4824-33.
175. LYNCH, D. L.; REGGIO, P. H. Cannabinoid CB1 receptor recognition of endocannabinoids via the lipid bilayer: molecular dynamics simulations of CB1 transmembrane helix 6 and anandamide in a phospholipid bilayer. *Journal of computer-aided molecular design*, v. 20, n. 7-8, p. 495-509, 2006.
176. CHEN, J. Z.; HAN, X. W.; XIE, X. Q. Preferred conformations of endogenous cannabinoid ligand anandamide. *Life Sci.*, v. 76, n. 18, p. 2053-69, 2005.
177. KUĆERKA, N. et al. Location of the general anesthetic n-decane in model membranes. *Journal of Molecular Liquids.*, 2018.
178. HENRIQUES, H.; YUMI, C. Molecular modeling of poly L-lactic acid with lipid bilayer., 2018.
179. DICKSON, C. J. et al. GAFFlipid: a General Amber Force Field for the accurate molecular dynamics simulation of phospholipid.. *Soft Matter*, 8, n. 37, 2012.

180. ROSSO, L.; GOULD, I. R. Structure and Dynamics of Phospholipids Bilayers using recently developed general all-atom force fields. *Journal of Computational Chemistry*, 29, n. 1, 2006.
181. OLLILA, S.; HYVONEN, M. T.; VATTULAINEN, I. Polyunsaturation in lipid membranes: dynamic properties and lateral pressure profiles. *J. Phys. Chem. B*, v. 111, 2007.
182. GULLINGSRUD, J.; SCHULTEN, K. Lipid bilayer pressure profiles and mechanosensitive channel gating. *Biophysical journal*, v. 86, n. 6, p. 3496-3509, 2004.
183. PAN, J. et al. Temperature Dependence of Structure, Bending Rigidity, and Bilayer Interactions of Dioleoylphosphatidylcholine Bilayers. *Biophys J.*, 1, 2008.
184. GRIEPERNAU, B.; BÖCKMANN, R. A. The influence of 1-alkanols and external pressure on the lateral pressure profiles of lipid bilayers. *Biophysical journal*, 95, n. 12, 2008.
185. INGÓLFSSON, H. I. et al. Phytochemicals Perturb Membranes and Promiscuously Alter Protein Function. *ACS Chemical Biology*, 8, 2014.

APÊNDICE A: Energias Potenciais e Temperatura para as simulações de Equilíbrio.



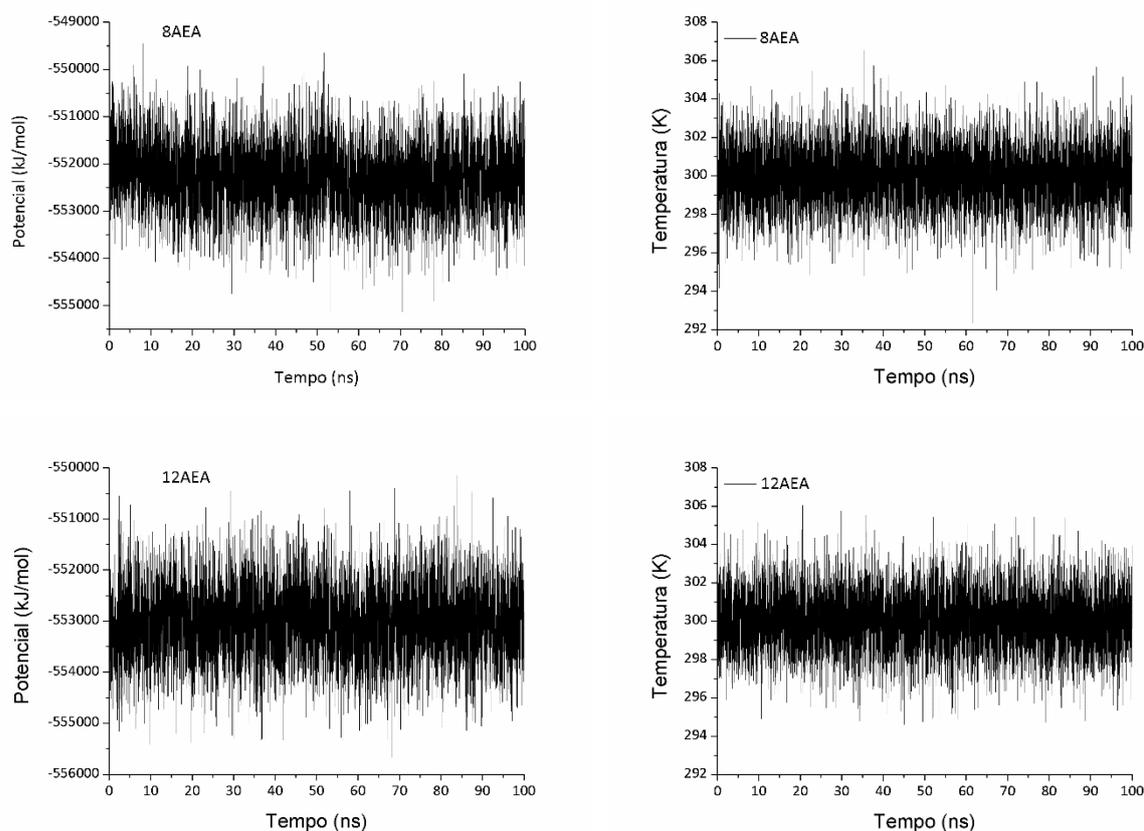


Figura A.1: Parâmetros de controle para as simulações de equilíbrio, na coluna da esquerda a energia potencial, e na coluna da direita a temperatura.

Tabela A.1: Porcentagens de estruturas para todas as anandamidas das simulações de equilíbrio.

	I	J	U	H	Uext	Usim	J'
2AEA-1	18,5 ±0,4	14,2 ±0,3	10,6 ±0,3	8,4 ±0,3	13,7 ±0,3	13,3 ±0,3	10,0 ±0,3
2AEA-2	17,6 ±0,4	14,8 ±0,3	12,1 ±0,3	9,5 ±0,3	12,3 ±0,3	13,0 ±0,3	9,9 ±0,3
4AEA-1	20,7 ±0,4	14,4 ±0,4	9,8 ±0,3	7,7 ±0,3	13,5 ±0,3	13,8 ±0,3	9,6 ±0,3
4AEA-2	19,9 ±0,4	14,2 ±0,3	10,5 ±0,3	7,5 ±0,3	13,4 ±0,3	14,0 ±0,3	10,5 ±0,3
4AEA-3	16,5 ±0,4	13,4 ±0,3	10,2 ±0,3	9,4 ±0,3	14,1 ±0,3	13,9 ±0,3	11,6 ±0,3
4AEA-4	16,8 ±0,4	13,1 ±0,3	10,6 ±0,3	9,3 ±0,3	14,0 ±0,3	13,5 ±0,3	12,0 ±0,3
6AEA-1	16,3 ±0,4	13,1 ±0,3	12,0 ±0,3	9,6 ±0,3	12,6 ±0,3	13,9 ±0,3	11,4 ±0,3
6AEA-2	14,7 ±0,4	13,4 ±0,3	12,1 ±0,3	9,2 ±0,3	14,0 ±0,3	14,3 ±0,4	11,1 ±0,3
6AEA-3	17,7 ±0,4	15,9 ±0,4	10,7 ±0,3	8,5 ±0,3	13,2 ±0,3	12,8 ±0,3	10,3 ±0,3
6AEA-4	17,6 ±0,4	14,3 ±0,3	11,9 ±0,3	8,3 ±0,3	13,3 ±0,3	13,1 ±0,3	10,2 ±0,3
6AEA-5	17,3 ±0,4	13,9 ±0,3	11,3 ±0,3	8,8 ±0,3	12,6 ±0,3	13,3 ±0,3	11,3 ±0,3

6AEA-6	19,1 ±0,4	15,4 ±0,4	10,0 ±0,3	7,9 ±0,3	13,3 ±0,3	13,3 ±0,3	10,3 ±0,3
8AEA-1	17,4 ±0,4	16,3 ±0,3	10,2 ±0,3	8,6 ±0,3	13,0 ±0,3	12,4 ±0,3	10,5 ±0,3
8AEA-2	19,1 ±0,4	15,2 ±0,4	10,8 ±0,3	8,5 ±0,3	13,4 ±0,3	12,5 ±0,3	9,6 ±0,3
8AEA-3	19,8 ±0,4	15,0 ±0,4	10,3 ±0,3	7,7 ±0,3	13,5 ±0,3	12,8 ±0,3	10,2 ±0,3
8AEA-4	19,8 ±0,4	16,5 ±0,4	10,1 ±0,3	8,1 ±0,3	13,2 ±0,3	12,0 ±0,3	9,6 ±0,3
8AEA-5	17,3 ±0,4	14,3 ±0,4	11,4 ±0,3	8,5 ±0,3	13,4 ±0,3	13,9 ±0,3	10,2 ±0,3
8AEA-6	19,2 ±0,4	14,9 ±0,4	10,4 ±0,3	7,9 ±0,3	12,9 ±0,3	14,0 ±0,3	10,2 ±0,3
8AEA-7	18,2 ±0,4	13,8 ±0,3	11,1 ±0,3	8,7 ±0,3	13,2 ±0,3	13,0 ±0,3	10,8 ±0,3
8AEA-8	17,0 ±0,4	15,2 ±0,4	10,7 ±0,3	8,8 ±0,3	14,3 ±0,3	11,8 ±0,3	10,4 ±0,3
12AEA-1	19,0 ±0,4	13,8 ±0,3	11,1 ±0,3	8,4 ±0,3	13,0 ±0,3	14,5 ±0,4	10,3 ±0,3
12AEA-2	23,4 ±0,4	16,5 ±0,4	9,5 ±0,3	6,1 ±0,3	12,8 ±0,3	12,6 ±0,3	8,7 ±0,3
12AEA-3	20,7 ±0,4	13,8 ±0,3	10,8 ±0,3	7,6 ±0,3	13,4 ±0,3	12,6 ±0,3	10,5 ±0,3
12AEA-4	15,2 ±0,4	12,0 ±0,3	12,8 ±0,3	9,9 ±0,3	12,7 ±0,3	15,3 ±0,4	12,3 ±0,3
12AEA-5	17,4 ±0,4	14,9 ±0,4	11,0 ±0,3	9,2 ±0,3	13,0 ±0,3	12,8 ±0,3	10,4 ±0,3
12AEA-6	16,7 ±0,4	13,9 ±0,3	11,0 ±0,3	8,2 ±0,3	14,9 ±0,4	12,9 ±0,3	11,4 ±0,3
12AEA-7	19,6 ±0,4	15,6 ±0,4	10,7 ±0,3	7,4 ±0,3	13,4 ±0,3	14,0 ±0,3	9,2 ±0,3
12AEA-8	19,4 ±0,4	14,9 ±0,4	10,9 ±0,3	8,7 ±0,3	13,1 ±0,3	12,7 ±0,3	9,6 ±0,3
12AEA-9	16,5 ±0,4	12,5 ±0,3	12,8 ±0,3	9,8 ±0,3	12,4 ±0,3	14,0 ±0,3	11,5 ±0,3
12AEA-10	15,2 ±0,4	12,8 ±0,3	12,0 ±0,3	8,6 ±0,3	14,3 ±0,3	14,7 ±0,4	11,4 ±0,3
12AEA-11	15,5 ±0,4	12,1 ±0,3	11,8 ±0,3	9,7 ±0,3	13,5 ±0,3	15,2 ±0,4	11,9 ±0,3
12AEA-12	16,4 ±0,4	12,7 ±0,3	12,0 ±0,3	9,1 ±0,3	12,8 ±0,3	15,7 ±0,4	10,9 ±0,3

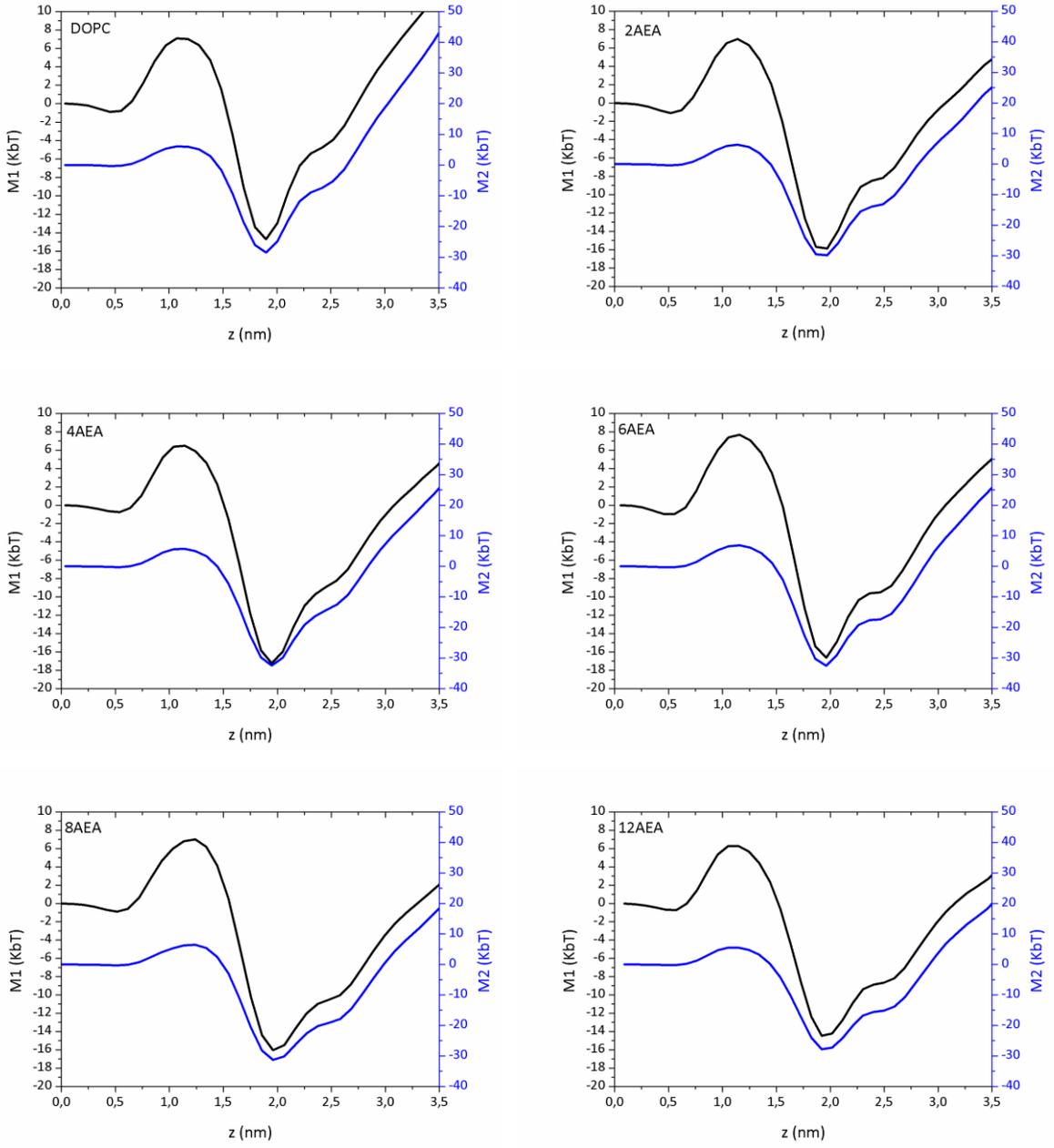


Figura A.2: Perfis de M1 e M2, para as simulações de equilíbrio.

ANEXO A: Protocolo de utilização do software GROMACS-LS

GROMACS-LS: Computing the Local Stress Tensor from MD Simulations

Juan M. Vanegas and Alejandro Torres-Sánchez
 juan.m.vanegas@gmail.com
 torres.sanchez.a@gmail.com
 Universitat Politècnica de Catalunya-BarcelonaTech,
 Barcelona, Spain.

August 21, 2015

1 Introduction

This is a manual for GROMACS-LS, a custom GROMACS version to compute the local stress tensor in 3D from a molecular dynamics simulation. This program computes the local stress based on the Hardy stress definition (see Ch.8 in Tadmor & Miller (2011) **Modeling Materials: Continuum, Atomistic and Multiscale Techniques**). The atomic virial stress (A. P. Thompson et al., *J. Chem. Phys.* 131, 154107 (2009)) definition was also recently added. Methodological details of the implementation can be found in:

Importance of Force Decomposition for Local Stress Calculations in Biomembrane Molecular Simulations by J. M. Vanegas, A. Torres-Sanchez, and M. Arroyo. *J. Chem. Theor. Comput.* 10, 691-702 (2014).

Examining the Mechanical Equilibrium of Microscopic Stresses in Molecular Simulations by A. Torres-Sánchez, J. M. Vanegas, and M. Arroyo. *Phys. Rev. Lett.* 114, 258102 (2015).

Geometric Derivation of the Microscopic Stress: A Covariant Central Force Decomposition by A. Torres-Sánchez, J. M. Vanegas, and M. Arroyo. In preparation.

We have patched the GROMACS source code (v4.5.5) at various locations in the routines that calculate particles forces and velocities. Our patches rely heavily on the code structure and functions implemented in a previous local pressure code (obtained from <http://repo.or.cz/w/gromacs.git/shortlog/refs/heads/release-4-5-localpressure> and ftp://ftp.gromacs.org/pub/tmp/gromacs-4.0.2_localpressure.tar.gz). This previous code implements the methodology outlined in

3D Pressure Field in Lipid Membranes and Membrane-Protein Complexes by S. Ollila et al. *Phys. Rev. Lett.* 102, 078101 (2009).

1.1 Highlights of GROMACS-LS

- Decomposition of multi-body potential forces using:
 1. Covariant central force decomposition (cCFD) (Torres-Sánchez A. Vanegas, J. M. and Arroyo, M. (*Phys. Rev. Lett.*, 2015)).

2. Non-covariant central force decomposition (nCFD) (N. C. Admal and E. B. Tadmor; *J. Elast.* 100, 63-143, 2010).
 3. Goetz-Lipowsky decomposition (GLD) (R. Goetz and R. J. Lipowsky; *J. Chem. Phys.* 108, 7397-7409, 1998.).
 4. Method of planes (Heinz, A. Paul W. and Binder K. *Phys. Rev. E.* 72 066704 (2005)).
- Ability to output the total or individual contributions to the local stress such as those from vdw, electrostatics, angles, and others.
 - Finite discretization over a rectangular grid using tri-linear weight functions, which result in smoother stress fields and also make the discretization exact regardless of the grid size.
 - Consistent treatment of forces arising from bond constraints (LINCS, SETTLE and SHAKE algorithms), which produces constant profiles for the normal component (perpendicular to the membrane plane) of the stress. This is necessary from an equilibrium stand-point and was an unresolved problem for stress profiles obtained from atomistic membrane simulations.
 - Virial stress per atom as defined in A. P. Thompson et al., *J. Chem. Phys.* 131, 154107 (2009).

If you publish results using GROMACS-LS, we kindly ask you to cite the papers by Vanegas et al., Torres-Sánchez et al., and Ollila et al., which we recommend you to read before continuing with the rest of the manual. In these papers we show the main differences between the different definitions of the stress. We show that the virial stress per atom and the stress from the method of planes do not satisfy balance of linear momentum, while the stress from cCFD, nCFD and GLD do. We also show that the GLD and the stress from the decomposition on geometric centers lead to non-symmetric stresses, which therefore do not satisfy balance of angular momentum. The two flavors of the CFD do satisfy both balance of linear and angular momentum by construction. However, for potentials beyond 4-body, such as CMAP, the nCFD leads to unphysical stresses. We therefore suggest that the cCFD definition is preferred in any case.

The types of interaction potentials that are included in stress calculations and have been tested are the following:

- Bonds
- Angles
- Dihedrals (proper, improper, and Ryckaert-Bellemans)
- Constraints (SETTLE and LINCS, SHAKE is included but has not been tested)
- Van der Waals
- Coulomb (plain cut-off and reaction-field)
- CMAP

As such, if you use this code to analyze a system that may use other types of potentials, we cannot guarantee that it will be correct. Please thoroughly check the output of the program and compare to known quantities such as the total pressure. For such comparisons you should first obtain the total virial pressure in double precision. To do this, reanalyze the trajectory (i.e. `mdrun.d -rerun`) using a double precision version of GROMACS and recompute the pressure with `g_energy.d`.

1.2 Summary of Recent Changes

The latest version of the code has undergone some significant changes that may affect its usage compared to previous versions:

- The code now requires an external LAPACK library. This is need to decompose the higher order potentials such as CMAP, and it also makes the force decomposition much more robust.
- In order to be more consistent with the naming and avoid confusion, we have changed all references from pressure to stress. This affects the naming of programs
`mdrun_LP` is now `mdrun_LS`
 and input flags
`-lpgridx` is now `-lsgridx`
- With the addition of new force decompositions the `-lsfd` has new options: `ccfd` (covariant central force decomposition, default), `ncfd` (non-covariant central force decomposition), `gld` (Goetz-Lipowsky decomposition), or `mop` (method of planes). We recommend to use `ccfd`.
- A new flag (`-lssa`) has been added to select whether to calculate the spatial IKM stress as before (option `spat`, default) or the virial stress per atom (option `atom`)
- The CMAP 5-body potential (used in combination with the CHARMM force-field) is now included in the decomposed potentials.
- We now include a utility called `tensorools` which replaces the individual `c` utilities `bin2xvg`, `bin2ncdf`, etc.

2 Installation

GROMACS-LS is based on GROMACS version 4.5.5. While the vanilla 4.5.5 version can be compiled using both the `autoconf` tools and CMake, this custom GROMACS-LS version can only be compiled with CMake.

External requirements: FFTW3, LAPACK

You will need to install a recent version of the FFTW3 library (in double precision and as shared library), CMake, and LAPACK (<http://www.netlib.org/lapack>). The LAPACK library needs to be installed as a shared library (`.so`). Compiling LAPACK with the `autoconf` tools can sometimes be a hassle, but recent versions can be easily compiled and installed with CMake.

Installing LAPACK with CMake

```
$> tar -zxvf lapack-3.5.0.tgz
$> cd lapack-3.5.0
$> mkdir build
$> cd build
$> cmake ../
```

Once the `cmake` dialog comes up, press `c` to begin the initial configuration. Change the `BUILD_SHARED_LIBS` flag to `ON` and modify the `CMAKE_INSTALL_PREFIX` variable to set the target installation directory. After `cmake` quits, you can follow the standard linux installation commands of `make` and `make install`.

If you install FFTW3 and LAPACK with a linux distribution such as Ubuntu or Fedora, you will also need to install the development (header) packages. If you have installed the FFTW3 or LAPACK libraries in a non-standard location (i.e. other than `/usr/lib` or `/usr/local/lib`), then before running `ccmake` you should export the variables `FFTW3_ROOT_DIR` and `CMAKE_PREFIX_PATH`, e.g.

```
export FFTW3_ROOT_DIR=/path/to/fftw3
```

```
export CMAKE_PREFIX_PATH=/path/to/lapack
```

Now the installation of the custom GROMACS-LS package

Installing LAPACK with CMake

```
$> tar -zxvf gromacs-4.5.5-ls-5.0.tar.gz
$> cd gromacs-4.5.5-ls-5.0
$> mkdir build
$> cd build
$> ccmake ../
```

Once the `ccmake` dialog comes up, press `c` to begin the initial configuration, and then modify the `CMAKE_INSTALL_PREFIX` variable to set the target installation directory. Use the toggle feature of `ccmake` (press `t`) and check that the paths to the FFTW3 and LAPACK libraries are correct.

Do not modify other variables unless you KNOW what you are doing. By default, the code is compiled in double precision (this is absolutely necessary), it cannot be compiled with MPI or GPU support, and all programs have the suffix `_LS`. Press `c` again and then `g` to generate the necessary Makefiles.

After `ccmake` quits, you can follow the standard linux installation commands of `make` and `make install`.

In addition to the GROMACS-LS code, we have also included two python programs:

`LStensor.py` and `tensorools`

`LStensor.py` contains a number of modules that can be imported into other python programs for the analysis of the data produced with the GROMACS-LS software. The `tensorools` utility provides an easy to use command line interface to most of the modules available in the `LStensor.py` file. These two files are installed along with the other GROMACS-LS files in the `bin` folder. We discuss these tools in more detail in Section 3.2.

3 Using the Code

3.1 Analyzing an MD Trajectory

For calculating the stress tensor in a MD simulation, we need a trajectory file (`.trr`) that contains both positions and velocities at the same points in time. In this section we show the steps you need to follow to calculate the stress tensor and illustrate it in the particular case of a POPE membrane.

As individual components of the system may drift over time, e.g. a membrane may drift in the simulation box, it is a good idea to first center a given group of atoms (in this case, the POPE bilayer) in the center of the simulation box. To do so, we use the tool `trjconv_LS` with the original trajectory, `traj.trr`:

Center the molecule into the simulation box before analyzing the stress

```
$ trjconv_LS -f traj.trr -o traj_centered.trr -n index -center -s topol.tpr
```

```
(...)
Select group for centering
Group 0 (      System) has 11600 elements
Group 1 (      POPE) has 2600 elements
Group 2 (      Water) has 9000 elements
Select a group: 1
```

Note that this `trjconv_LS` is a modified version of the vanilla one that places the center of mass, and not the geometrical center as it is done by the original, of the selected index group at the center of the simulation box. You must always pass a `.tpr` file as part of the input, or the program will return a segmentation fault without an error message. This new `traj_centered.trr` is the trajectory we will use to analyze the stress.

The 3D stress tensor is obtained by "rerunning" the trajectory with the `mdrun_LS`. Since the `-rerun` option of `mdrun_LS` outputs new `.log`, `.edr`, and `.trr` files, we suggest you first create a new folder and analyze the trajectory within it:

```
Computing the stress with mdrun_LS
$ mkdir stress
$ cd stress
$ mdrun_LS -s ../topol.tpr -rerun ../traj_centered.trr
```

To save space you can recreate the `.tpr` file by setting all the output `nst*` variables to 0 in the `.mdp` file:

```
nstxout = 0
nstvout = 0
nstlog = 0
nstenergy = 0
nstxtcout = 0
```

If your simulation was performed with PME or another long-range electrostatic method, you will need to create a new `.tpr` file with the `coulombtype` set to `Cut-off` or `Reaction-field` and a cutoff radius of at least 2.0-2.2 nm (see the Ref. 2 for more details). Note that this does not change your original trajectory but the way forces are calculated when analyzing each frame.

As with other GROMACS tools, `mdrun_LS` displays a help text running `mdrun_LS -h`. `mdrun_LS` has several special options for analyzing the stress:

mdrun_LS special options

Option	Filename	Type	Description
<code>-ols</code>	<code>localstress.dat</code>	Output	Generic data file
Option	Type	Value	Description
<code>-localsgrid</code>	real	0.1	Spacing for local pressure grid (default = 0.1 nm)
<code>-lsgridx</code>	int	0	Set the local pressure grid size in the x direction (default use <code>box[XX][XX]/localsgrid</code>)
<code>-lsgridy</code>	int	0	Set the local pressure grid size in the y direction (default use <code>box[YY][YY]/localsgrid</code>)
<code>-lsgridz</code>	int	0	Set the local pressure grid size in the z direction (default use <code>box[ZZ][ZZ]/localsgrid</code>)
<code>-lscont</code>	string	all	Select which contribution to write to output (default = all): all, vdw, coul, angles, bonds, dih, dihi, dihrb, lincs, settle, shake, cmap, vel

<code>-lsfd</code>	string <code>ccfd</code>	Select the type of force decomposition to be used: <code>ccfd</code> (covariant central force decomposition, default), <code>ncfd</code> (non-covariant central force decomposition), <code>gld</code> (Goetz-Lipowsky decomposition), or <code>mop</code> (method of planes)
<code>-lssa</code>	string <code>spat</code>	Select the type of stress to calculate: <code>spat</code> (spatial stress from IKM theory, default), <code>atom</code> (stress per atom)

With the flag `-ols` one selects the output file where the stress tensor is stored. The size of the discretization grid is given by several parameters. If your system was simulated at constant pressure, the program takes the size of the box (`box[XX]`, `box[YY]`, `box[ZZ]`) from the `.tpr` along with the desired grid spacing (with `-localsgrid`), and calculates the integer size of the grid and the real grid spacing, e.g. if the box size in the x direction is 5.37 nm and the given grid spacing is 0.1 nm, then the grid size in x is 53 and the real grid spacing becomes 0.1013 nm. The grid size in each dimension can also be overridden with the `-lsgridx`, `-lsgridy`, or `-lsgridz`. So if you are interested in calculating a stress profile along a given dimension, e.g. z, then you can use these different flags together:

Setting the grid size

```
$ mdrun_LS -s ../topol.tpr -rerun ../traj_centered.trr -localsgrid 0.1 -lsgridx 1 -lsgridy 1
```

At the moment, only systems simulated with rectangular boxes can be analyzed. `mdrun_LS` can also return the total or individual contributions to the stress with the `-lscont` flag. At the moment the available contributions are van der Waals, Coulomb, angles, bonds, proper dihedrals, improper dihedrals, Ryckaert-Bellemans dihedrals, constraints (LINCS, SHAKE, or SETTLE), `cmap`, and kinetic.

Finally, the `-lsfd` flag allows to select one of two different decompositions for the forces between particles that enter into the potential part of the stress. We advice you to use the `ccfd` option (set by default in the program) that always provides a symmetric stress, thereby satisfying the balance of angular momentum from a continuum viewpoint, and physically meaningful regardless of the number of particles involved in each additive potential of the force field. The `ncfd` is equivalent to the `ccfd` except for 5-body potentials. On the other hand, the `gld` option allows you to compute the stress from the decomposition by Goetz and Lipowsky (J. Chem. Phys. (1998) 17, 7397-7409), which has been widely used in biomembrane simulations. Please, take a close look to references 2 and 3 for a more detailed discussion about the differences between both decompositions.

The outputted `.dat0` file is a simple binary file in double precision with the following format:

Format of the `.dat0` binary file

```
precision = sizeof(int)*1
box       = sizeof(double)*9
gridx    = sizeof(int)*1
gridy    = sizeof(int)*1
gridz    = sizeof(int)*1
stresstensor = sizeof(double)*9*gridx*gridy*gridz
```

3.2 `tensorools`: Python scripts to post-process the stress fields

The command `mdrun_LS` produces binary `.dat0` files that need to be post-processed for analysis. To make life easier, we have included two tools `tensorools` and `LStensor.py` that can load, transform and save these binary files in useful formats. These python files are directly installed to the binary folder of the GROMACS-LS distribution. These python utilities require recent versions of the Numpy and Scipy packages, and optionally the ProDy package (<http://prody.csb.pitt.edu/>) when using some of the stress per atom options.

3.2.1 LStensor

The `LStensor.py` file defines what we call the `LStensor` object and corresponding analysis functions, which can be used to post-process the data from the GROMACS-LS program. This object can load IKN stresses as well as stresses per atom and convert these to a grid. It can also be used to compute the basic invariants of the stress as well as its divergence. It also provides a number of functions to load PDB files (stress per atom only) and to store files in NETCDF, plain txt, and PDB format.

3.2.2 tensortools

The other file, `tensortools`, is a command-line utility that can be used for a rapid post-processing of the binary stress files. It uses the functions defined in `LStensor.py` and allows easy manipulation of the data. The main options are:

Options for `tensortools` (`tensortools -h`)

```
-h, --help          show this help message and exit
-f [input.bin] [[input.bin] ...]
                   Single or multiple binary input files (must all have
                   the same grid size)
-v []              verbose
--irep [spat]      Input data representation, values: spat (spatial
                   stress/density distributed on a grid, default), atom
                   (stress per atom)
--pdb [[structure.pdb]]
                   PDB file with atom coordinates (FOR STRESS PER ATOM
                   ONLY)
--itype [stress]   Type of data such as density, stress tensor, or vector
                   field: dens, stress (default), or vec
--mif [avg]        How to process multiple input files, values: avg
                   (default) or sum
--sym []           FOR STRESS ONLY. Separates the resultant stress in its
                   symmetric and antisymmetric parts, and creates two
                   outputs with the subscripts _sym and _asm
                   respectively
--prof z           Output a profile along a given dimension, values: x,
                   y, or z (default)
--integ z          integrate out the stress profile along a given
                   dimension, values: x, y, or z (default)
--gf 1.0           Process input through a gaussian filter of a given
                   standard deviation (in units of the grid spacing,
                   default=1.0)
--gridsp 0.1 0.1 0.1
                   (For atom to grid conversion) Grid spacing for atom 2
                   grid conversion (default 0.1, 0.1, 0.1 nm)
--orep [spat]      Output data representation, values: spat (spatial
                   stress/density distributed on a grid, default), atom
                   (stress per atom)
--oformat [bin]    Output format, values: bin (i.e. binary .dat0,
                   default), nc (NETCDF), txt (default when using
                   --prof), or pdb (stress per atom only, creates a
                   separate file for each element in the tensor)
-o output.bin      Output file
```

Some examples of basic usage:

Averaging multiple input *.dat0 files

```
tensortools -f file0.dat0 file1.dat0 file2.dat0 -o stress.dat0
```

Conversion to NETCDF format

```
tensortools -f file.dat0 --oformat nc -o stress.nc
```

Compute a stress profile along the y axis and save it to a text file

```
tensortools -f file.dat0 --prof y -o stress.txt
```

Smooth data using a gaussian kernel with a standard deviation of 8 (in units of the grid spacing)

```
tensortools -f file.dat0 --gf 8.0 -o stress.dat0
```

Advanced usage:

Read the IKN stress from *.dat0 files, integrate out the z direction, smooth the data with a Gaussian filter of 25 (units of the grid size), and write the result in the file stress_gf25.nc

```
tensortools -f *.dat0 --inte z --oformat nc --gf 25 -o stress_gf25.nc -v
```

Read the stress per atom from *.dat0 files, load the PDB structure from struct.pdb, translate the data to a grid with spacing 0.01, 0.01, 10, apply a Gaussian filter of 25 and store the result in stress_atom_gf25.nc

```
tensortools -f *.dat0 --irep atom --pdb struct.pdb --orep spat --oformat nc -o  
stress_atom_gf25.nc --gridsp 0.01 0.01 10 --gf 25 -v
```

Note that although the main purpose of `LStensor.py` and `tensortools` is to analyze the stress tensor binary files, it can also manipulate other binary files such as those outputted by the `g_density3D_LS` utility.