

Dissertação de Mestrado

---



# Explicando *Ab Initio* a Intensidade de Ativação e Antagonismo do Receptor Glutamatérgico GluR2

*Ana Caroline Vasconcelos Martins*

---

Orientador: Pedro de Lima Neto  
Co-Orientador: Valder Nogueira Freire

Dissertação de Mestrado submetida à Comissão Julgadora do Curso de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal do Ceará como um dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Química com área de concentração em Físico-Química.



CENTRO DE CIÊNCIAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA  
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ANALÍTICA E FÍSICO-QUÍMICA  
GRUPO DE QUÍMICA TEÓRICA

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ**



*Ana Caroline Vasconcelos Martins*

**Explicando *Ab Initio* a Intensidade de Ativação e Antagonismo  
do Receptor Glutamatérgico GluR2**

Dissertação de Mestrado submetida à Comissão Julgadora  
do Curso de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal do Ceará  
como um dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Química  
com área de concentração em Físico-Química.

Orientador: Pedro de Lima Neto

Co-Orientador: Valder Nogueira Freire

**24 de Maio de 2012, em Fortaleza, Ceará**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
Universidade Federal do Ceará  
Biblioteca de Ciências e Tecnologia

---

M341e Martins Ana Caroline Vasconcelos  
Explicando *Ab Initio* a Intensidade de Ativação e Antagonismo do Receptor Glutamatérgico GluR2  
/ Ana Caroline Vasconcelos Martins – 2012.  
185 f. : il. color., enc. ; 30 cm.

Mestrado (Dissertação) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciência, Departamento de  
Química Analítica e Físico-Química, Mestrado em Química, Fortaleza, 2012.

Área de Concentração: Físico-Química.

Orientação: Prof. Dr. Pedro de Lima Neto.

Coorientação: Prof. Dr. Valder Nogueira Freire.


1. Glutamato 2. Simulações computacionais I. Título.

---

CDD 547




Esta Dissertação foi aprovada como parte dos requisitos necessários à obtenção do Grau de Mestre em Química, área de concentração Físico-Química, outorgada pela Universidade Federal do Ceará, em cuja Biblioteca de Ciências e Tecnologia/UFC encontra-se à disposição dos interessados.

  
\_\_\_\_\_  
Ana Caroline Vasconcelos Martins

DISSERTAÇÃO APROVADA EM: 24/05/2012

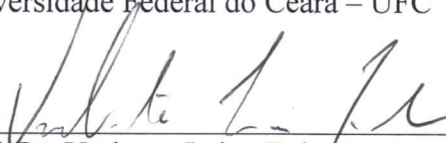
EXAMINADORES:

  
\_\_\_\_\_

Prof. Dr. Pedro de Lima Neto  
Universidade Federal do Ceará – UFC

  
\_\_\_\_\_

Prof. Dr. Luiz Gonzaga de França Lopes  
Universidade Federal do Ceará – UFC

  
\_\_\_\_\_

Prof. Dr. Umberto Laino Fulco  
Universidade Federal do Rio Grande do Norte - UFRN



À Jesus Cristo toda a honra,  
toda a glória e todo o louvor.

Dedico este trabalho aos meus pais,  
Felipe e Ana Martins,  
e aos meus irmãos,  
Felipe e Daniele Martins.

## **AGRADECIMENTOS**

Ao prof. Dr. Pedro de Lima Neto, meu orientador, pela oportunidade e incentivo, apostando sempre na minha capacidade.

Ao meu co-orientador, prof. Dr. Valder Nogueira, que teve a brilhante ideia do tema abordado nesse trabalho, por todo apoio e conhecimento transmitido.

À prof. Dra. Adriana Nunes Correia, por toda atenção e apoio.

A todos os professores do corpo docente do programa de Pós-Graduação em Química da UFC, pelos conhecimentos comunicados em todo o tempo.

Aos meus familiares, que sempre torcem por mim e me incentivam, especialmente ao meu tio José Eurico de Vasconcelos Filho, por toda ajuda.

Aos companheiros e amigos do Grupo de Química Teórica da UFC, que tornaram o dia a dia menos cansativo e mais divertido, especialmente Jota Junior, Leandro Mendonça e Jefferson Nascimento.

Aos alunos e agregados do grupo LabInitio, por toda disposição em ajudar; em maneira especial ao Ito Liberato, que me ensinou e sempre esteve disponível para tirar minhas dúvidas e debater sobre a metodologia e o trabalho.

Aos amigos do Grupo de Eletroquímica e Corrosão, GELCORR, que sempre quando necessário me ajudaram e me deram assistência.

Aos amigos que sempre me apoiaram durante o curso, especialmente Archimedes Fortes e Diego Quântico.

Aos amigos que, mesmo não estando sempre perto, me ajudam na caminhada diária, especialmente Raquel Guimarães, Tiago Koury, todas as pérolas, estrelas e princesas.

Ao Programa de Pós Graduação em Química e à agência financiadora CAPES, pela possibilidade de realizar o curso de Mestrado com bolsa de estudo.

A todos que, mesmo omitidos, colaboraram para minha formação e desenvolvimento deste trabalho.



## ÍNDICE

<b>1. INTRODUÇÃO GERAL</b> .....	001
1.1 Estado da arte estrutural da interação GluR2-ligante.....	008
1.2 Estudos computacionais do sistema GluR2-ligante.....	013
Referências.....	024
<b>2. MÉTODOS E SIMULAÇÕES COMPUTACIONAIS</b> .....	027
2.1 Inicialização: difração de raios-X da GluR2 e seus ligantes.....	029
2.2 Otimização da posição dos átomos de hidrogênio.....	033
2.3 Estado de protonação dos ligantes.....	034
2.4 Dividir para conquistar: a fragmentação molecular com capas conjugadas.....	037
2.5 Levando-se em conta moléculas de água.....	039
2.6 O sítio de ligação efetivo: variando-se a proximidade.....	040
2.7 A blindagem da vizinhança pós-próxima.....	042
2.8 Simulações computacionais no escopo da Teoria do Funcional da Densidade.	044
Referências.....	046
<b>3. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	049
3.1 Estrutura dos ligantes no pH fisiológico.....	051
3.2 Resíduos próximos e pós-próximos.....	054
3.3 Energia de interação GluR2-ligante variando o raio.....	055
3.4 Relevância da blindagem de resíduos pós-próximos.....	061
3.5 Energia de interação resíduo-ligante GGA+D.....	061
3.5.1 Análise da interação GluR2-glutamato.....	063

3.5.2	Análise da interação GluR2-AMPA.....	067
3.5.3	Análise da interação GluR2-cainato.....	071
3.5.4	Análise da interação GluR2-DNQX.....	075
3.5.5	Comparação entre os sistemas.....	080
3.5.6	Análise da interação Glu705-ligante.....	081
	Referências.....	082
<b>4.</b>	<b>CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS.....</b>	<b>083</b>
4.1	Conclusões.....	085
4.2	Perspectivas.....	087
	Referências.....	094
<b>APÊNDICE A:</b>	.....	<b>095</b>
	Do Sistema de Órgãos do Corpo Humano aos Neurotransmissores	
<b>APÊNDICE B:</b>	.....	<b>129</b>
	Fundamentos Teóricos	
<b>APÊNDICE C:</b>	.....	<b>161</b>
	Resumos em Congressos e Artigos Publicados	



**LISTA DE FIGURAS**

Figura 1.1 – Ligantes das GluRs.....	004
Figura 1.2 – Modelo para ativação e dessensibilização de GluRs.....	005
Figura 1.3 – Sequência de resíduos da subunidade GluR2.....	006
Figura 1.4 – Desenho esquemático ilustrando a estrutura do receptor GluR2 homotetramérico.....	007
Figura 1.5 – (a) Gráfico do encerramento do DIL da GluR2 versus a distância linker-linker (Ile633-Ile633) quando da interação com agonistas. (b) Gráfico da eficácia relativa versus a distância linker-linker (Ile633-Ile633) quando da interação com agonistas.....	012
Figura 1.6 – As duas formas mais estáveis para o ácido glutâmico em meio aquoso .....	014
Figura 1.7 – Modelo da ativação do receptor de glutamato.....	016
Figura 1.8 – O papel das moléculas de água no sítio de ligação.....	018
Figura 2.1 – O domínio de interação do ligante.....	030
Figura 2.2 – Cadeia A do domínio de interação do ligante complexado com cada um dos ligantes.....	032
Figura 2.3 – Posição dos átomos de hidrogênio antes, em vermelho, e depois da otimização, em preto, para os quatro sistemas.....	034
Figura 2.4 – Distribuição de microestados para o glutamato em função do pH e as estruturas observadas.....	035
Figura 2.5 – Distribuição de microestados para o AMPA em função do pH e as estruturas observadas.....	036
Figura 2.6 – Distribuição de microestados para o cainato em função do pH e as estruturas observadas.....	036
Figura 2.7 – Distribuição de microestados para o DNQX em função do pH e as estruturas observadas.....	037
Figura 2.8 – Esquema que ilustra a montagem do MFCC.....	038
Figura 2.9 – Ilustração de como foi considerada a relevância das moléculas de água.....	039
Figura 2.10 – Esquema do sítio de ligação do agonista.....	041

Figura 2.11 – Exemplificação de como é feita a consideração da blindagem de barreira..	043
Figura 3.1 – Estrutura química do glutamato, AMPA, cainato e DNQX.....	052
Figura 3.2 – Estado de protonação dos ligantes obtidas pelo o Marvin Sketch 5.3.2 para o pH 7,3.....	052
Figura 3.3 – Ilustração do sítio de interação da GluR2 com os ligantes e alguns dos resíduos próximos e pós-próximos.....	054
Figura 3.4 – Gráfico da Energia x Raio de interação para os 4 ligantes para ambos os funcionais LDA e GGA.....	056
Figura 3.5 – Ligantes.....	062
Figura 3.6 – Painel BIRD com alguns dos principais resíduos para a interação GluR2-glutamato.....	064
Figura 3.7 – Painel BIRD com alguns dos principais resíduos para a interação GluR2-AMPA .....	068
Figura 3.8 – Painel BIRD com alguns dos principais resíduos para a interação GluR2-cainato.....	072
Figura 3.9 – Painel BIRD com alguns dos principais resíduos para a interação GluR2-DNQX.....	076
Figura 3.10 – Ilustração da distancia dos ligantes a alguns dos resíduos relevantes para sua interação com a GluR2.....	079
Figura 4.1 – Variação da constante dielétrica em sistema proteico.....	088
Figura 4.2 – Estrutura e organização dos domínios dos receptores de glutamato.....	091
Figura 4.3 – Dímero do DIL da GluR2 nos estados Apo, ligado a glutamato, ligado a AMPA e ligado à DNQX.....	092
Figura 4.4 – A representação em <i>cartoon</i> de outras proteínas que atuam na sinapse glutamatérgica.....	093

**LISTA DE TABELAS**

Tabela 1.1 – Dados estruturais e farmacológicos da interação da GluR2 com o ligante (agonista/antagonista).....	009
Tabela 1.2 – Energia de ligação GluR2-glutamato experimental e calculada, em kcal/mol.....	017
Tabela 1.3 – Energias de interação, em kcal/mol, do ligante, glutamato, com a proteína e as águas.....	019
Tabela 1.4 – Interações-chave entre os subdomínios S1 e S2 em simulações MD.....	020
Tabela 2.1 – Resumo da difração com alta resolução dos cristais da variante S1S2 em complexo com uma série de ligantes.....	030
Tabela 2.2 – Estatísticas de refinamento cristalográfico para todos os complexos.....	031
Tabela 3.1 – Valores de pKa para os ligantes obtidos experimentalmente apenas para o glutamato (*), e a partir do programa Marvin Sketch 5.3.2.....	053
Tabela 3.2 – Resíduos por raio de interação - Parte 1.....	058
Tabela 3.3 – Resíduos por raio de interação - Parte 2.....	059
Tabela 3.4 – Energia de interação resíduo-ligante (kcal/mol) obtida com o funcional LDA PWC para os casos com e sem blindagem.....	061
Tabela 3.5 – Parte 1: energias de interação resíduo-GLU para todos os resíduos no raio de 13 Å.....	065
Tabela 3.6 – Parte 2: energias de interação resíduo-GLU para todos os resíduos no raio de 13 Å.....	066
Tabela 3.7 – Parte 1: energias de interação resíduo-AMPA para todos os resíduos no raio de 13 Å.....	069
Tabela 3.8 – Parte 2: energias de interação resíduo-AMPA para todos os resíduos no raio de 13 Å.....	070
Tabela 3.9 – Parte 1: energias de interação resíduo-CAI para todos os resíduos no raio de 13 Å.....	073
Tabela 3.10 – Parte 2: energias de interação resíduo-CAI para todos os resíduos no raio de 13 Å.....	074

Tabela 3.11 – Parte 1: energias de interação resíduo-DNQX para todos os resíduos no raio de 13 Å.....	077
Tabela 3.12 – Parte 2: energias de interação resíduo-DNQX para todos os resíduos no raio de 13 Å.....	078
Tabela 4.1 – Estruturas de raio-X do GluR-DIL e seus ligantes - Parte 1.....	089
Tabela 4.2 – Estruturas de raio-X do GluR-DIL e seus ligantes - Parte 2.....	090
Tabela 4.3 – Estruturas de raio-X do GluR-DIL e seus ligantes - Parte 3.....	091

## RESUMO

A transmissão de impulsos nervosos é feita por meio das sinapses, envolvendo neurotransmissores e receptores. Os receptores ionotrópicos glutamatérgicos (GluRs) são importantes canais iônicos do sistema nervoso central, encontrados em sinapses de excitação rápida, e estão relacionados a funções cerebrais importantes como aprendizado e memória. Além disso, os GluRs também estão associados com certas doenças neurológicas e psiquiátricas, como por exemplo: a doença de Alzheimer, o mal de Parkinson, a epilepsia, o acidente vascular cerebral, a esclerose lateral amiotrófica e a esquizofrenia. Neste trabalho, tiramos vantagem dos dados disponíveis na literatura da co-cristalização dos seguintes agonistas glutamato ( $C_5H_9NO_4$ ) e AMPA ( $C_7H_{10}N_2O_4$ ), do agonista parcial cainato ( $C_{10}H_{15}NO_4$ ) e do antagonista DNQX ( $C_8H_2N_4O_6$ ) com o receptor GluR2 com resolução de 1,9 Å, 1,7 Å, 1,9 Å e 1,8 Å, respectivamente, para estudar a interação destes quatro ligantes com a GluR2 por meio de métodos computacionais *ab initio*. Os hidrogênios ausentes dos dados de difração de raios-X foram colocados através de um processo semi-clássico de minimização da energia total GluR2-ligante. A seguir, as simulações foram feitas usando a Teoria do Funcional da Densidade (DFT), tanto ao nível da aproximação da densidade local (LDA), como da aproximação do gradiente generalizado (GGA), para descrição dos efeitos de troca e correlação. A utilização do método de fragmentação molecular com capas conjugadas (MFCC) tornou possível analisar a interação dos ligantes com cada um dos resíduos próximos e pós-próximos do GluR2. Considerou-se também a relevância da blindagem dos resíduos pós-próximos que interagem com os ligantes, bem como se fez uma análise da energia de interação dos resíduos (próximos e pós-próximos) considerados com os átomos dos ligantes (resultados apresentados nos gráficos BIRD), sem e com mediação das moléculas de água existentes no sítio de ligação (o que permite se determinar *ab initio* a relevância da água na energética da interação ligante-GluR2). Obteve-se a energia total de interação GluR2-ligante em função da distância dos centroides dos ligantes aos resíduos, o que permitiu correlacioná-la à intensidade de ativação e antagonismo dos neurotransmissores em questão. Demonstrou-se que ela segue a ordem AMPA > glutamato > cainato > DNQX somente quando um raio do sítio de ligação suficientemente grande é considerado, o que explica dados experimentais publicados sobre a ativação e antagonismo do receptor glutamatérgico GluR2, sugerindo que os resíduos pós-próximos podem ser importantes para determinar o funcionamento do receptor. Para o glutamato, os resultados obtidos indicam que os resíduos atrativos mais relevantes são: Arg485, Lys730 (mediado pela água W39), Ser654, Leu650 mediado por W69, e Lys656 mediado por W22; os resíduos repulsivos mais relevantes para o glutamato são Glu402 (pós-próximo) mediado por W36, Glu657 e Asp651 (pós-próximos). Para o AMPA os resíduos atrativos mais relevantes são: Arg485, Thr655 mediado por W134, Lys730 mediado por W137, Lys656 mediado por W138, Lys449 e Arg684 (pós-próximos); os resíduos repulsivos mais relevantes para o AMPA são Glu402 mediado por W3, Asp651 mediado por W96 e W139 (pós-próximo), e Glu657 (pós-próximo) mediado por W140. Para o cainato os resíduos atrativos mais relevantes são Arg485, Ser654, Thr655 e Arg684 (pós-próximo); os resíduos repulsivos mais relevantes para o Cainato são Glu402, Glu657 mediado por W78 (pós-próximo) e Asp651. Para o DNQX os resíduos atrativos mais relevantes são Arg485, Glu705 e Tyr450 mediado por W26 e W137; o resíduo repulsivo mais relevante para o DNQX é Leu498. Uma plêiade de perspectivas relacionadas aos resultados obtidos reluz e dentre elas podemos destacar a possibilidade do desenvolvimento de agonistas e antagonistas glutamatérgicos com especificidades voltadas à diminuição de efeitos colaterais quando utilizados no tratamento de doenças relacionadas à neurotransmissão glutamatérgica.

## ABSTRACT

The transmission of nerve impulses occurs through the synapses, involving neurotransmitters and receptors. The ionotropic glutamate receptors GluRs are important ionic channels of the central nervous system, founded in rapid excitation synapses, and related to important cerebral functions like learning and memory. Besides this, GluRs are also associated with important neurological and psychiatric diseases like Alzheimer, Parkinson, epilepsy, cerebral ischemia, amyotrophic lateral sclerosis, and schizophrenia. In this work, we take advantage of the available data in the literature of co-crystallization of the following full agonists glutamate ( $C_5H_9NO_4$ ) and AMPA ( $C_7H_{10}N_2O_4$ ), the partial agonist kainate ( $C_{10}H_{15}NO_4$ ) and the antagonist DNQX ( $C_8H_2N_4O_6$ ) with the GluR2 receptor with resolution of 1.9 Å, 1.7 Å, 1.9 Å and 1.8 Å, respectively to study the interaction of these four ligands with GluR2 by means of *ab initio* computational methods. The absent hydrogens in the GluR2-ligand X-ray diffraction data were inserted through a semi-classical total energy minimization process. Next, the simulations were performed within the scope of the Density Functional Theory (DFT), both in the local density approximation (LDA) as generalized gradient approximation (GGA) for the description of exchange-correlation effects. The use of the molecular fragmentation method with conjugated caps (MFCC) allowed to analyze the interaction between the ligands with each one close and next-closed GluR2 residues. It was also considered the relevance of the screening of the next-closed residues with interact with the ligands, and it was performed an analysis of the interaction energy between the focused residues (close and next-closed) with the atoms of the ligands (results depicted in the BIRD panels), without and with the mediation of water molecules existing in the binding pocket (which allows to determine *ab initio* the relevance of water in the GluR2-ligands energetic). It was obtained the GluR2-ligand total energy interaction as a function of the distance between the ligand centroid and the residues, which allowed to correlate it to the activation strength and antagonism of the ligands focused. It was demonstrated that it follows the order AMPA > glutamate > kainite > DNQX only when a large enough binding pocket radius is taken into account, explaining the experimental data published on the activation and antagonism of the glutamatergic receptor GluR2 and suggesting the next-closed residues can be important to determine the receptor functioning. For the glutamate, the obtained results point that the most important attractive residues are Arg485, Lys730 (water W39 mediated), Ser654, Leu650 (water W69 mediated), and Lys656 (water W22 mediated); the most important repulsive residues for the glutamate are Glu402 (next-closed water W36 mediated), Glu657 and Asp651 (nex-closed). For AMPA, the most important attractive residues are Arg485, Thr655 (water W134 mediated), Lys730 (water W137 mediated), Lys656 (water W138 mediated), Lys449 and Arg684 (next-closed); the most important repulsive residues for AMPA are Glu402 (water W3 mediated), Asp651 (next-closed, water W96 and W139 mediated), and Glu657 (next-closed, water W140 mediated). For kainate the most important attractive residues are Arg485, Ser654, Thr655 and Arg684 (next-closed); the most important repulsive residues for kainite are Glu402, Glu657 (next-closed, water W78 mediated) and Asp651. For DNQX, the most important attractive residues are Arg485, Glu705 and Tyr450 (water W26 and W137 mediated); the most important repulsive residue for DNQX is Leu498. A pleiade of perspectives related with the obtained results shines, among which one can highlight the possibility to develop glutamatergic agonists and antagonists with specificities related to decrease side effects when used in the treatment of maladies related with the glutamatergic neurotransmission.

# CAPÍTULO 1

## Introdução Geral





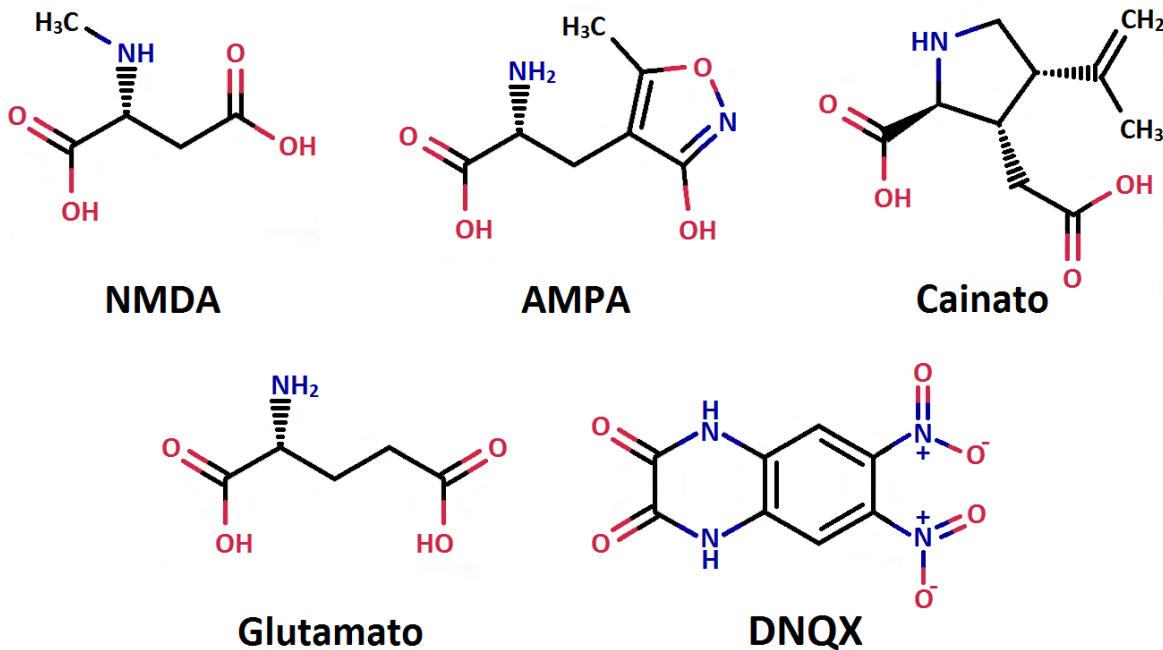
A transmissão sináptica excitatória no cérebro é feita principalmente pelos receptores ionotrópicos de glutamato (GluRs), que localizam-se, em sua maioria, na membrana pós-sináptica das células neuronais. Estes receptores são proteínas transmembranares que, quando ativadas, abrem um canal que permite a passagem de íons do meio extracelular para o intracelular. A neurotransmissão glutamatérgica está relacionada com a memória de curto prazo e o aprendizado. Além disso, os GluRs também estão associados com certas doenças neurológicas e psiquiátricas, como por exemplo: a doença de Alzheimer, o mal de Parkinson, a epilepsia, o acidente vascular cerebral, a esclerose lateral amiotrófica e a esquizofrenia (BRÄUNER-OSBORNE *et al.*, 2000; TRAYNELIS *et al.*, 2010). Esses receptores são vistos como alvos potenciais de fármacos e, como o nome deles sugere, o neurotransmissor que se acopla a estes receptores desencadeando uma resposta bioquímica, é o glutamato, mostrado na Figura 1.1 juntamente com os agonistas sintéticos ácido N-metil-D-aspartico (NMDA), ácido 2-amino-3-(3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolil)propiónico (AMPA), ácido (2S,3S,4S)-3-(carboximetil)-4-prop-1-en-2-il-pirrolidina-2-carboxílico (cainato) e o antagonista 6,7-Dinitroquinoxalina-2,3-diona (DNQX). O mecanismo pelo qual a ligação receptor-glutamato conduz à abertura do canal iônico é um processo importante na neurobiologia molecular. Uma visão geral a respeito da medicina, bioquímica e da neurociência que envolve o presente trabalho é apresentada no Apêndice A.

Os GluRs são classificados em três grupos, distinguidos funcional e farmacologicamente com base na resposta aos agonistas sintéticos NMDA, AMPA e cainato. Agonista (ou agonista total) é um composto que produz a resposta máxima, quando 100% dos receptores estão ocupados. O agonista sintético é um composto que causa a mesma resposta de um agonista total ao receptor. Vale ressaltar que, para receptores de tipo AMPA, o cainato funciona como agonista parcial, ou seja, a resposta produzida é apenas uma fração da resposta do agonista total mesmo 100% dos receptores estando ocupados. As estruturas químicas dos agonistas sintéticos dos receptores de glutamato são apresentadas na Figura 1.1. Além dos agonistas existem os antagonistas dos receptores proteicos. Estes interagem com o receptor, todavia não produzindo resposta alguma. Um exemplo de antagonista para as GluRs (DNQX) também é apresentado na Figura 1.1.

Os receptores ionotrópicos de glutamato são canais iônicos proteicos compostos por quatro subunidades, iguais ou não, que formam um tetrâmero, dímero de dímeros. Cada subunidade é composta pelos três domínios: o amino terminal DAT; o de interação do ligante DIL, que é composto por dois subdomínios, comumente chamados de S1 e S2; e o

transmembranar DTM que é formado pelos três segmentos intramembrana M1, M2 e M3 (STAWSKI *et al.*, 2010) – ver Fig. 1.2.

Figura 1.1 – Ligantes das GluRs. Na linha superior: agonistas sintéticos que definem os três grupos de receptores ionotrópicos de glutamato. Na linha inferior: o agonista natural das GluRs, glutamato, e o antagonista DNQX.



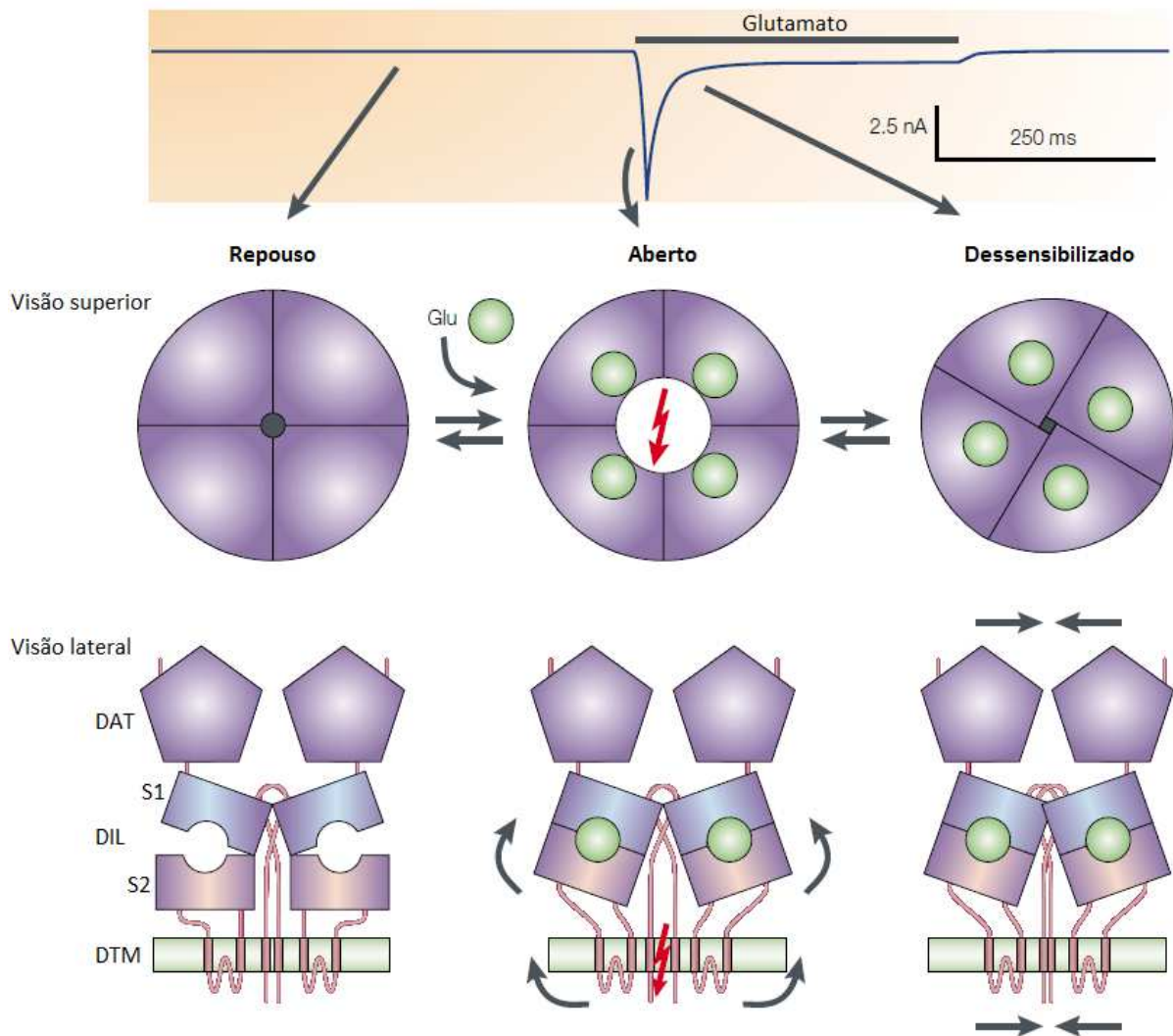
Fonte: Martins, 2012.

O que se sabe do mecanismo de ativação desses receptores é que, após a ligação do agonista ao domínio de interação do ligante (DIL), o receptor é ativado para um estado que permite a condução de íons do meio extracelular para o intracelular, e a este processo segue-se posteriormente a dessensibilização (TRAYNELIS *et al.*, 2010). A dessensibilização ocorre quando o canal iônico fecha, mesmo quando o agonista permanece interagindo com o DIL da proteína. Uma ilustração de todo o processo pode ser visualizada na Figura 1.2, que no painel superior mostra a resposta eletrofisiológica do canal formado por receptor ionotrópico de glutamato (GluRs), inicialmente em repouso (sem corrente iônica). Em resposta à aplicação de glutamato em neurônios do hipocampo de rato embrionário, os GluRs de tipo não-NMDA abrem o canal iônicos causando o pico da corrente, e, em seguida, rapidamente se dessensibilizam para um nível de estado estacionário.

As partes central e inferior da Figura 1.2 mostram a visão superior esquemática de canais no estado de repouso (abertos e dessensibilizados) e a vista lateral esquemática de duas das quatro subunidades GluRs que formam o canal, respectivamente. A ligação do glutamato

(Glu) desencadeia uma alteração conformacional, o fechamento da fenda S1S2, que é acoplado a uma alteração conformacional nos domínios transmembranais que abrem o canal iônico. Embora o agonista permaneça, a reorganização das subunidades fecha novamente o canal, mesmo os domínios S1S2 permanecendo na conformação de fenda fechada.

Figura 1.2 – Modelo para ativação e dessensibilização de GluRs. Painel superior: fisiologia do canal formado por receptor ionotrópico de glutamato (GluRs). Em resposta à aplicação de glutamato em neurônios do hipocampo de rato embrionário, GluRs de tipo não-NMDA abrem e, em seguida, rapidamente se dessensibilizam para um nível de estado estacionário. Linha central: visão superior esquemática de canais nos estados de repouso, abertos e dessensibilizados. A ligação do glutamato (Glu) desencadeia uma alteração conformacional que abre o canal iônico (seta vermelha). Embora o agonista permaneça, uma provável mudança conformacional do interdomínio permite que o canal se feche novamente. Painel inferior: vista lateral esquemática de duas das quatro subunidades GluRs que formam o canal. O fechamento da fenda S1S2 é acoplado a uma alteração conformacional nos domínios transmembranais que abrem o canal iônico (setas, na figura central). A reorganização das subunidades (setas, figura do lado direito) fecha novamente o canal, embora os domínios S1S2 permaneçam na conformação de fenda fechada.



Fonte: Adaptada de Madden, 2002.

Os receptores do tipo AMPA possuem quatro tipos possíveis de subunidades (GluR1-GluR4 ou GluA1-GluA4). Dentre essas subunidades, a GluR2 (ou GluA2 mais recentemente) vem sendo amplamente estudada. Sua sequência de resíduos, iniciando no domínio amino-terminal e encerrando-se no domínio carboxi-terminal, pode ser observada na Figura 1.3.

Figura 1.3 – Sequência de resíduos da subunidade GluR2. Os resíduos estão enumerados de acordo com Armstrong e Gouaux (2000). Em destaque “r”, a Arg485.

```

-20 mqkimhisvl lspvlwglif gvssnsiqig glfprgadqe ysafrvgnvq fstsefrltp
 40 hidnlevans favtnafcsq fsergvyaifg fydkksvnti tsfcgtlhvs fitpsfptdg
100 thpfviqmrp dlkgallsli eyyqwdkfay lydsdrglst lqavldsaae kkwqvtainv
160 gninndkkde myrslfqdle lkkerrvild cerdkvndiv dqvitigkhv kgyhyiianl
220 gftdgdllki qfgganvsgf qivdyddslv skfierwstl eekeypgaht ttikytsalt
280 ydavqvmta frnlrkqrie isrrgnagdc lanpavpwgq gveieralkq vqveglsgni
340 kfdqngkrin ytinimelkt ngprkigyws evdkmwvtlt elpsgndtsg lenktvvt
400 ilespyvmmk knhemlegne ryegycvdl aeiakhcgfk ykltivgdgk ygardadtki
460 wngmvgelvy gkadiaiapl titlvreevi dfskpfmslg isimikkpqq skpgvtsfld
520 playeiwnci vfayigsvv lflvsrfspy ewhteefedg retqssesn efgifnslwf
580 slgafmrqgc disprslsgr ivggvwfft liiissytan laaftverm vspiesaedl
640 skqteiaygt ldsgstkeff rrskiavfdk mwtymrsaep svfvrttaeg varvrkskgk
700 yayllestmn eyieqrkpcd tmkvvggnlds kgygiatpkg sslrtpvnla vlklsegqvl
760 dklnknwyyd kgecgakdsg skektsalsl snvagvfyl vgglglamlv aliefcyksr
820 aeakrmkvak naqninpsss qnsqnfatyk egnvygies vki

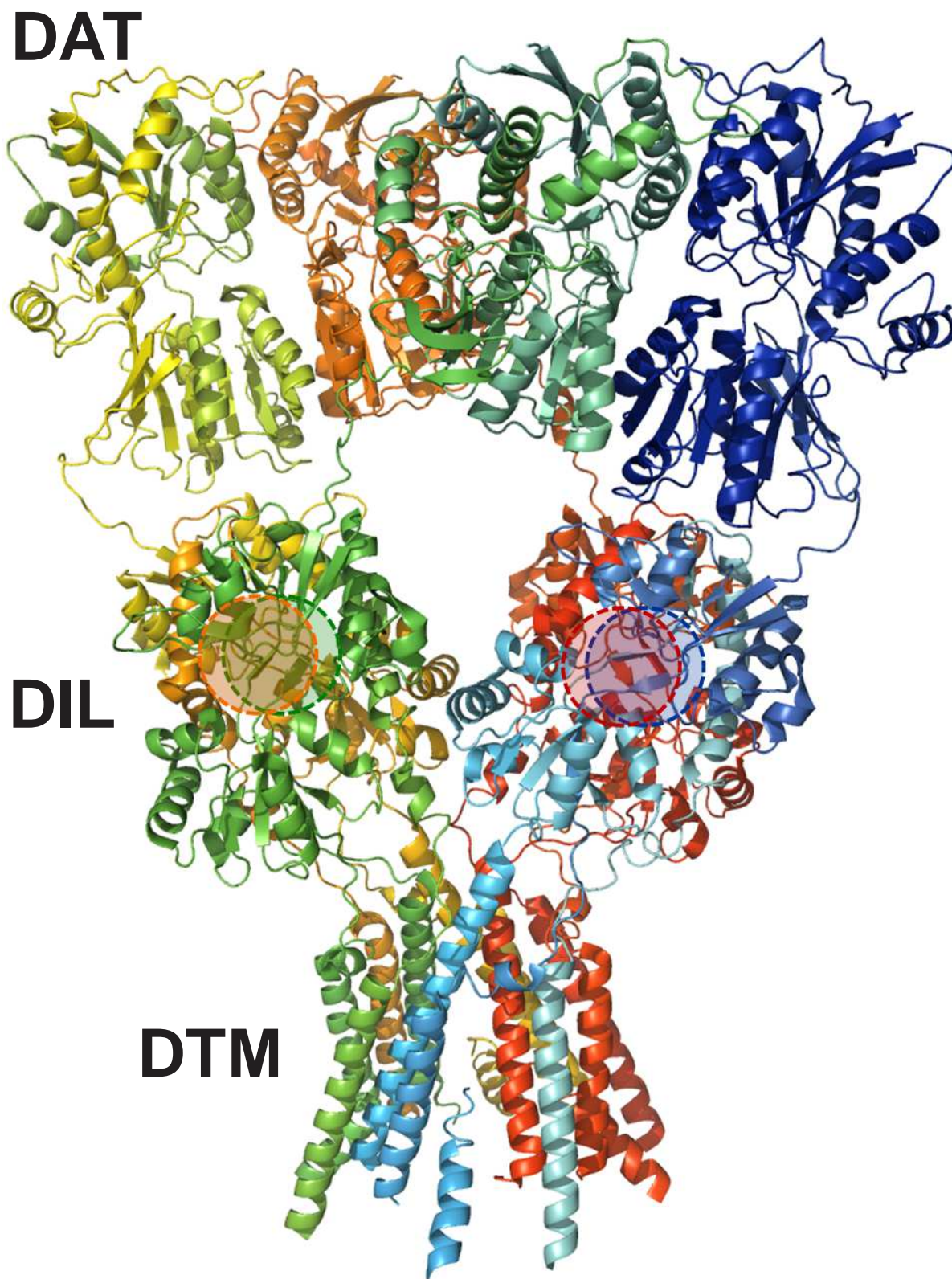
```

Fonte: Adaptado de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/AAA41240.1>

Para se formar um canal iônico são necessárias quatro destas subunidades. A proteína então formada possui quatro sequências polipeptídicas que podem ser todas iguais (homotetramérica) ou diferentes (heterotetramérica), sendo que todas as subunidades devem pertencer à mesma família de receptores. Dessa forma, é possível construir um canal iônico (receptor) do tipo AMPA composto por quatro subunidades GluR2. Na Figura 1.4 tem-se um desenho esquemático do canal iônico do tipo AMPA composto por quatro subunidades GluR2 ressaltadas pelas diferentes cores, azul, amarelo, verde e vermelho. É perceptível em cada subunidade o DAT, o DIL e DTM.



Figura 1.4 – Desenho esquemático ilustrando a estrutura do receptor GluR2 homotetramérico. Quatro subunidades coloridas de azul, verde, amarelo e vermelho, compostas pelos domínios DAT, DIL e DTM. Figura montada a partir do PDB identificado como 3KG2 com auxílio do programa Pymol.



Fonte: Martins, 2012.

## 1.1 Estado da arte estrutural da interação GluR2-ligante

A interação de agonistas com o DIL da GluR2 pode ser descrita como o mecanismo de uma "planta carnívora". No estado de repouso (estrutura apo, código do PDB 1FTO), o DIL está presente numa forma aberta (ARMSTRONG, GOUAUX, 2000), o que pode ser visto na Figura 1.2. Quando um agonista se liga ao DIL, uma mudança rotacional ocorre na conformação, resultando no fechamento dos domínios S1 e S2 ao redor de uma região de dobradiça central (ARMSTRONG, GOUAUX, 2000). A ligação do agonista ao DIL resulta na abertura do canal iônico (ativação do receptor).

A interação ligante-GluR2 e sua correlação com a abertura do canal iônico é estudada a partir de três vertentes: estudos farmacológicos, estudos cristalográficos e estudos computacionais. As propriedades farmacológicas de grande interesse são: (a) a afinidade, que é a capacidade que um ligante tem de se ligar ao receptor; (b) a eficácia, propriedade intrínseca a um determinado ligante que determina que bom agonista ele é; e (c) a potência, uma expressão da atividade de um ligante em termos da concentração ou quantidade necessária para produzir um efeito definido (BRUNTON *et al.*, 2007). Os estudos cristalográficos buscam uma explicação para como determinado ligante age sobre a proteína, e tentam explicar o que causa a abertura total, parcial ou não-abertura do canal iônico, dependendo do ligante. Na atualidade, os estudos cristalográficos são feitos paralelamente aos estudos farmacológicos. Já a terceira vertente, o estudo computacional, vem sendo feito a partir dos resultados cristalográficos e busca, da mesma forma que a cristalografia, entender o mecanismo de funcionamento da abertura do canal iônico.

Em sua revisão, Pøhlsgaard *et al.* (2011) reuniram, em duas tabelas, várias informações obtidas a partir de estudos farmacológicos e cristalográficos, feitos por diversos autores, da proteína GluR2 e alguns de seus ligantes. Algumas dessas informações estão transcritas na Tabela 1.1 para diversos ligantes estudados. Dentre estes, tem-se agonistas totais, agonistas parciais e antagonistas. Um agonista parcial, mesmo quando ligado a todos os receptores, produz apenas fração da resposta máxima que é causada pelo agonista total. Trazendo os conceitos de agonismo e antagonismo para o caso de um canal iônico, o agonista causa abertura total do canal permitindo a passagem do maior fluxo iônico possível; o agonista parcial abre o canal, porém de forma menos eficiente; e o antagonista, embora interaja com a proteína, não abre o canal.

Tabela 1.1 – Dados estruturais e farmacológicos da interação da GluR2 com o ligante (agonista/antagonista).

Ligante	Afinidade (μM) ao DIL	Afinidade (μM) à proteína	Potência (μM)	Eficácia relativa (%)	Encerramento do domínio (graus)	Distância linker-linker (Å)	Códigos do PDB
<b>Agonistas</b>							
ACPA	0,02	0,02	0,25	90	20,7-20,9	35,7	1M5E
Glutamato	0,82	0,49	5,7	100	19,1-21,1	35,5	1FTJ
Glutamato	-	-	-	-	18,4-21,0	35,4-35,6	2UXA
Glutamato	-	-	-	-	19,2-21,3	35,3-35,6	3DP6
Glutamato	-	-	-	-	22,4	-	2CMO
Glutamato	-	-	-	-	22,7	-	3KGC
Quisqualato	0,02	0,0009	1,2	93	20,4-21,3	36,2	1MM6
Quisqualato	-	-	-	-	19,1-21,1	35,4-35,7	1MM7
(S)-TDPA	0,32	0,27	20	-	19,1-20,2	35,2-35,4	3BFT
(R)-TDPA	0,53	0,23	6,6	-	18,7-20,3	35,1-36,9	3BFU
<b>Análogos do AMPA</b>							
AMPA	0,02	0,01	3,5	88	20,3-21,0	35,6-35,8	1FTM
ATPA	3,5	2,1	49	82	21,0-21,1	36,1	1NNP
ATPA	-	-	-	-	21,5	35,8	1NNK
2-Bn-Tet-AMPA/ glutamato	1,6	0,75	95	84	20,8-21,5	35,6	2P2A
Des-Me-AMPA	0,17	0,09	900	-	19,0-20,5	35,6-35,7	1MS7
Des-Me-AMPA	-	-	-	-	18,8-20,6	34,8-36,6	1MQD
2-Me-Tet-AMPA	0,01	0,03	0,92	100	20,1-21,9	35,7-36,2	1M5B
<b>Agonistas parciais</b>							
4-AHCP	0,19	0,18	17,5	38	16,5	34,1	1WVJ
Br-HIBO	0,5	0,65	22	70	17,2	34,5	1M5C
CPW399	0,39	0,22	13,9	43	17,0	33,8	1SYH
Cainato	14,5	9	130	21	13,1	33,0	1FW0
Thio-ATPA	0,89	0,63	13	78	17,8	34,8	2AIX
<b>Análogos da Willardiina</b>							
Bromo-Willardiina	0,30	0,10	0,84	50	16,7	34,4	1MQH
Bromo-Willardiina	-	-	-	-	18,5-19,8	35,1	1MY3
Fluoro-Willardiina	0,02	0,03	0,19	72	16,5	34,7	1MQI
Iodo-Willardiina	0,52	0,18	1,51	48	18,5-18,7	-	1MQG
Iodo-Willardiina	-	-	-	-	18,2-18,8	34,7-34,8	1MY4
Willardiina	4,76	0,90	6,34	71	17,9	35,2	1MQJ
<b>Antagonistas</b>							
ATPO	12,2	16	-	-	2,5-5,1	27,5-28,0	1N0T
CNQX	0,68	0,24	-	-	6,0-8,1	28,1-28,5	3B7D
DNQX	1,00	0,09	-	-	3,4-6,5	28,3	1FTL
FQX	-	7,6	-	-	3,4-5,5	27,9-28,1	3BKI
NS1209	0,39	0,03	-	-	-5,4	32,8	2CMO
UBP277	135	23,8	-	-	-4,3-(-6,4)	27,2	3H03
UBP282	292	10,3	-	-	-5,6-(-9,6)	21,9-24,4	3H06
ZK200775	-	0,12	-	-	-	33,2	3KGC

Fonte: Adaptada de Pøhlsgaard *et al.*, 2011.

Na Tabela 1.1 tem-se a afinidade de cada ligante ao DIL e à proteína completa. A afinidade se baseia no equilíbrio de dissociação do complexo proteína-ligante, e é medida a partir da constante de dissociação  $K_d$  (constante de dissociação para os agonistas, chamada de  $K_i$  quando refere-se a um inibidor, antagonista). Quanto menor o  $K_d$  de um ligante, maior é a sua afinidade.

Outra propriedade farmacológica fornecida na Tabela 1.1 é a potência. No caso, a potência apresentada é definida como sendo o  $EC_{50}$ , que indica a concentração de ligante necessária para induzir a metade da resposta máxima do receptor (PØHSGAARD *et al.*, 2011). Por fim, dentre as propriedades farmacológicas, tem-se a eficácia relativa que, para o sistema em questão, é determinada por estudos eletrofisiológicos. Nesses estudos, a corrente iônica máxima ( $I_{m\acute{a}x}$ ) causada pela abertura do canal, quando o ligante está interagindo com o DIL, é medida por meio de microeletrodos. A seguir ela é comparada à  $I_{m\acute{a}x}$  causada pelo glutamato, agonista natural da proteína que é utilizado como referência de eficácia 100%, para se obter a eficácia relativa de cada ligante. Assim, a partir da eficácia relativa, é possível determinar se uma dada molécula é um agonista parcial ou total da proteína. A não-resposta eletrofisiológica, mesmo o ligante estando ligado ao DIL, indica que a molécula é um antagonista, ou seja, interage com a GluR2, porém não causa a abertura do canal iônico (FRANSEN, *et al.*, 2005; RANG, 2006).

Outras informações apresentadas na Tabela 1.1 como o encerramento do domínio, a distância *linker-linker* e os códigos do PDB estão relacionadas aos estudos cristalográficos a partir dos quais é possível determinar a estrutura tridimensional da proteína e a posição dos ligantes. Inicialmente as investigações estruturais da GluR2 limitaram-se às construções individuais dos domínios extracelulares DIL (ARMSTRONG *et al.*, 1998; BEICH-FRANSEN *et al.*, 2008) e DAT (CLAYTON *et al.*, 2009; JIN *et al.*, 2009), que são hidrofílicos. No entanto, o receptor GluR2 homotetramérico completo já foi cristalizado em complexo com o antagonista ZK200775 e teve sua estrutura determinada com uma resolução de 3,6 Å (SOBOLEVSKY *et al.*, 2009) – ver Figura 1.4.

As várias estruturas do DIL da GluR2 interagindo com os diferentes ligantes levaram a uma melhor compreensão das mudanças conformacionais do DIL causadas pela interação com agonistas e antagonistas. Além disso, estas estruturas têm fornecido pistas para a relação entre as mudanças estruturais e a ativação dos canais e a dessensibilização. A partir desses resultados cristalográficos, pode-se observar o encerramento do domínio apresentado na Tabela 1.1, que é referente a quanto o DIL se fecha devido à presença do ligante. Para se



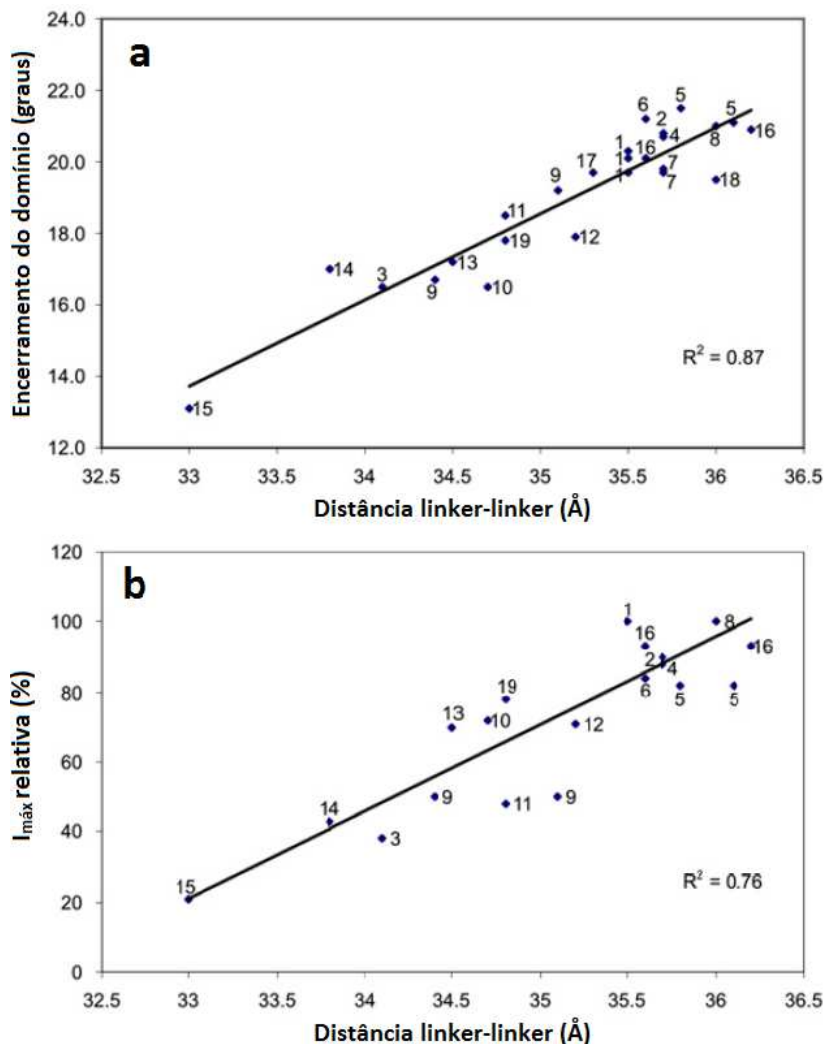
determinar esse encerramento, adota-se o estado apo (estado no qual a proteína não está interagindo com nenhum ligante, PDB 1FTO) como referência e calcula-se o fechamento do DIL na presença de cada ligante fazendo uso do programa DynDom (HAYWARD, BERENDSEN, 1998). Da mesma forma, essas estruturas tornam possível medir a distância *linker-linker*, distância entre os carbonos C $\alpha$ , carbono ao qual estão ligados os grupos carboxílicos e amina do aminoácido, dos resíduos de isoleucina número 663 (Ile663) de cada subunidade que formam um dímero.

Com o entendimento de todos os parâmetros obtidos por meio dos estudos farmacológicos e cristalográficos, a análise da Tabela 1.1 fica mais fácil. A reunião desses resultados experimentais feita por Pøhlsgaard *et al.* (2011) mostra uma excelente correlação entre o encerramento do domínio do DIL da GluR2 (induzido por agonistas e agonistas parciais), a distância *linker-linker* Ile633-Ile633, e a eficácia do ligante obtida a partir de experiências eletrofisiologia (HOGNER *et al.*, 2002; JIN *et al.*, 2003; FRANDSEN *et al.*, 2005), como é mostrado nos gráficos apresentados na Figura 1.5. Estes estudos proporcionaram uma forte evidência de que as alterações conformacionais devido ao grau de fechamento do domínio se propagam para os segmentos do canal, M1, M2 e M3 e levam à ativação do receptor.

Observa-se que os agonistas parciais induzem um encerramento intermediário do DIL que varia de 13° a 19°, enquanto os agonistas totais levam ao fechamento máximo do domínio S1S2 que varia de valores superiores a 19° até 22° (Tab. 1.1 e Fig. 1.5). O cainato é o agonista parcial da GluR2 mais bem estudado (foi isolado pela primeira vez a partir da alga vermelha *Digenea simplex*) e ativa seletivamente os receptores do tipo cainato, induzindo 13 graus de encerramento do DIL da GluR2 – o menor observado entre os agonistas parciais. Já os antagonistas FQX, CNQX, DNQX e ATPO conduzem a um pequeno encerramento do domínio S1S2 que varia de 2,5° a 8,1°, enquanto que os antagonistas (S)-NS1209, UBP277, UBP282 e ZK200775 causam uma hiperextensão de 4.3°-9.6° em comparação à estrutura apo (molécula A do PDB 1FTO). No entanto, tem sido demonstrado por dinâmica molecular que facilmente o DIL apo da GluR2 adota conformações de baixa energia, que são mais abertas do que a observada na estrutura do cristal (LAU, ROUX, 2007). Portanto, as conformações do estado apo podem ser limitadas pela rede cristalina e artificialmente fechadas, e assim surgem indagações sobre se as conformações mais abertas observadas com alguns dos antagonistas são verdadeiramente hiperestendidas ou podem ser mais representativas do estado aberto da GluR2 (PØHSGAARD *et al.*, 2011).

Com relação à eficácia dos diversos tipos de ligantes, percebe-se que os agonistas possuem uma eficácia relativa ao glutamato de pelo menos 80%. Já para os agonistas parciais, aquele mais eficaz é a Fluor-Willardiina, com eficácia de 72%. Os antagonistas inibem a abertura do canal, logo não há corrente iônica do meio extracelular para o meio intracelular, de modo que sua eficácia então pode ser considerada zero.

Figura 1.5 – (a) Gráfico do encerramento do DIL da GluR2 versus a distância linker-linker (Ile633-Ile633) quando da interação com agonistas. (b) Gráfico da eficácia relativa versus a distância linker-linker (Ile633-Ile633) quando da interação com agonistas. 1: Glutamato; 2: ACPA; 3: 4-AHCP; 4: AMPA; 5: ATPA; 6: 2-Bn-Tet-AMPA; 7: Des-Me-AMPA; 8: 2-Me-Tet-AMPA; 9: Bromo-Willardiina; 10: Fluoro-Willardiina; 11: Iodo-Willardiina; 12: Willardiina; 13: Br-HIBO; 14: CPW399; 15: cainato; 16: quisqualato; 17: (S)-TDPA; 18: (R)-TDPA; 19: Tio-ATPA (ver Tab. 1.1).



Fonte: Adaptada de Pøhlsgaard *et al.*, 2011.

Outra vertente que busca entender o processo de ativação, dessensibilização e inibição da GluR2 são os estudos computacionais feitos a partir dos dados cristalográficos. Desde a

publicação dos primeiros dados cristalográficos da GluR2 complexada com seus ligantes (ARMSTRONG, *et al.*, 1998; ARMSTRONG, GOUAUX, 2000), um número considerável de estudos computacionais vêm sendo publicados empregando diferentes níveis de cálculo, compreendendo a dinâmica molecular (*molecular dynamics* - MD) e cálculos semiempíricos, chegando à estudos que empregam a teoria do funcional da densidade (*Density Functional Theory* - DFT). A seguir, será apresentado um resumo dos estudos computacionais já realizados envolvendo o sistema GluR2-ligante.

## 1.2 Estudos computacionais do sistema GluR2-ligante

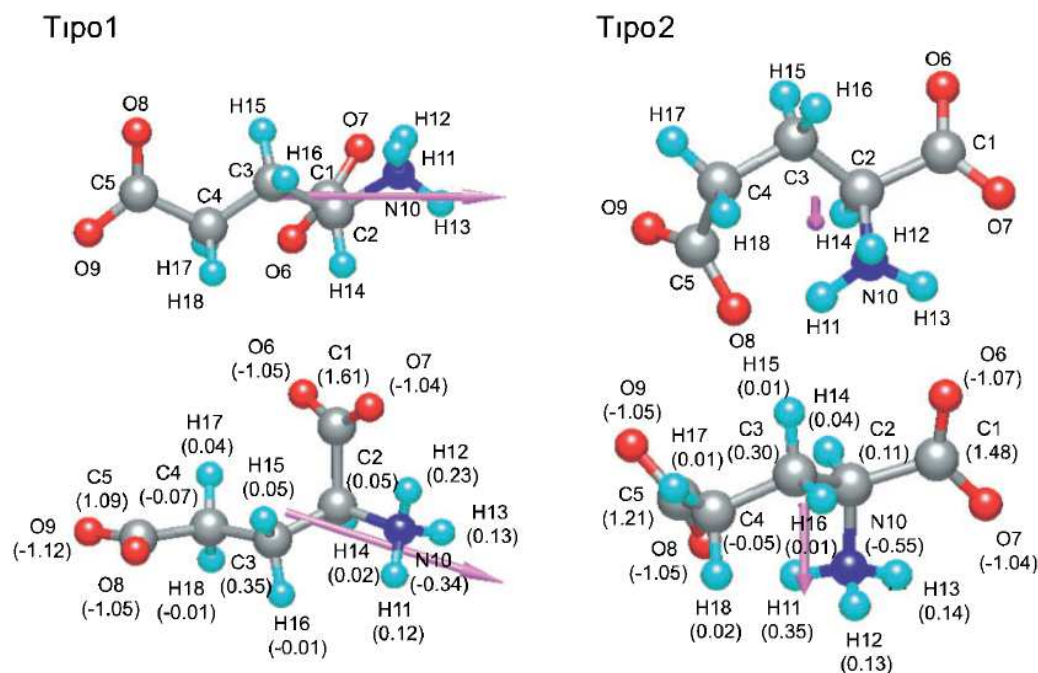
Baseados nos dados cristalográficos obtidos por Armstrong *et al.* (1998), Kubo *et al.* (2001) realizaram um dos primeiros estudos computacionais da GluR2 com seus ligantes. Utilizando métodos semiempíricos e *ab initio*, eles mostraram que a interação do cainato com a GluR2 acontece por meio de 2 modos vibracionais locais com alta frequência. A interação foi formada entre a vibração de alongamento simétrica do grupo carboxílico do agonista e a vibração de flexão do grupo guanidina da Arg485 da GluR2. Com o estudo dos modos vibracionais do glutamato (no vácuo), e com a semelhança destes com os obtidos para o cainato, os autores concluíram que o glutamato interage com o receptor de forma semelhante ao cainato. Este fato não se repete para o antagonista CNQX (6-ciano-7-nitroquinoxalina-2,3-diona), também estudado. Dessa forma, os resultados de Kubo *et al.* (2001) sugerem que o modo como os agonistas interagem com a proteína diverge bastante da maneira como os antagonistas interagem.

Dando continuidade ao estudo de Kubo *et al.* (2001), Odai *et al.* (2003) investigaram, também com métodos semiempíricos e *ab initio*, os possíveis arranjos estruturais para o glutamato, considerando-o em meio aquoso. As duas estruturas mais estáveis encontradas (tipo 1 e tipo 2), como mostra a Figura 1.6, possuem energias muito próximas tornando possível sua interconversão. Esse resultado foi baseado nos dados cristalográficos de Armstrong e Gouaux (2000), que apresenta o glutamato em uma estrutura intermediária aos tipos 1 e 2.

Nos trabalhos subsequentes, os resultados mostraram que os ligantes glutamato, AMPA, NMDA, cainato, DNQX, CNQX (6-ciano-7-nitroquinoxalina-2,3-diona) e APV (ácido 2-amino-5-fosfonopentanoico) possuem potencial eletrostático negativo. Em contrapartida, no sítio de ligação da GluR2, principalmente próximo ao resíduo Arg485, o potencial

eletrostático é positivo, excetuando-se uma pequena região próxima ao resíduo Glu657 (KUBO *et al.*, 2003a). Dessa forma, sugeriu-se que a interação GluR2-ligante é regida por atrações eletrostáticas. Adicionando-se a essa análise, os estudos dos orbitais HOMO do glutamato (orbital molecular ocupado de mais alta energia) e LUMO (orbital molecular não ocupado de menor energia) e do sítio de ligação da GluR2 revelam que não há grande transferência de carga entre o DIL da proteína e o ligante (KUBO *et al.*, 2003a; 2003b). Como complemento, por meio da análise de estudos mecânico-quânticos, Kubo *et al.* (2003b) sugeriram que a GluR2 pode ser um tipo de sistema oscilatório, que requer uma injeção de energia nos modos específicos de vibração de certos resíduos de aminoácidos da proteína, dentre os quais cita-se a Arg485, para que seja desencadeada a sua ativação. Essa energia, assim como indicam, seria fornecida pela colisão do agonista com esses resíduos.

Figura 1.6 – As duas formas mais estáveis para o ácido glutâmico em meio aquoso. A estrutura geométrica e o momento de dipolo, ilustrado pela seta, para cada forma são vistos em duas direções diferentes.



Fonte: Odai *et al.*, 2003.

Paralelamente aos estudos descritos anteriormente, simulações de dinâmica molecular com o DIL da proteína no estado apo, ligado ao cainato e ao glutamato, na ausência e na presença das moléculas de água encontradas nos arquivos PDB (MENDIETA *et al.*, 2001; ARINAMINPATHY *et al.*, 2002, 2006; LAU, ROUX, 2007) foram realizadas, dando início a duas vertentes de investigação do sistema GluR2. A primeira busca entender o mecanismo

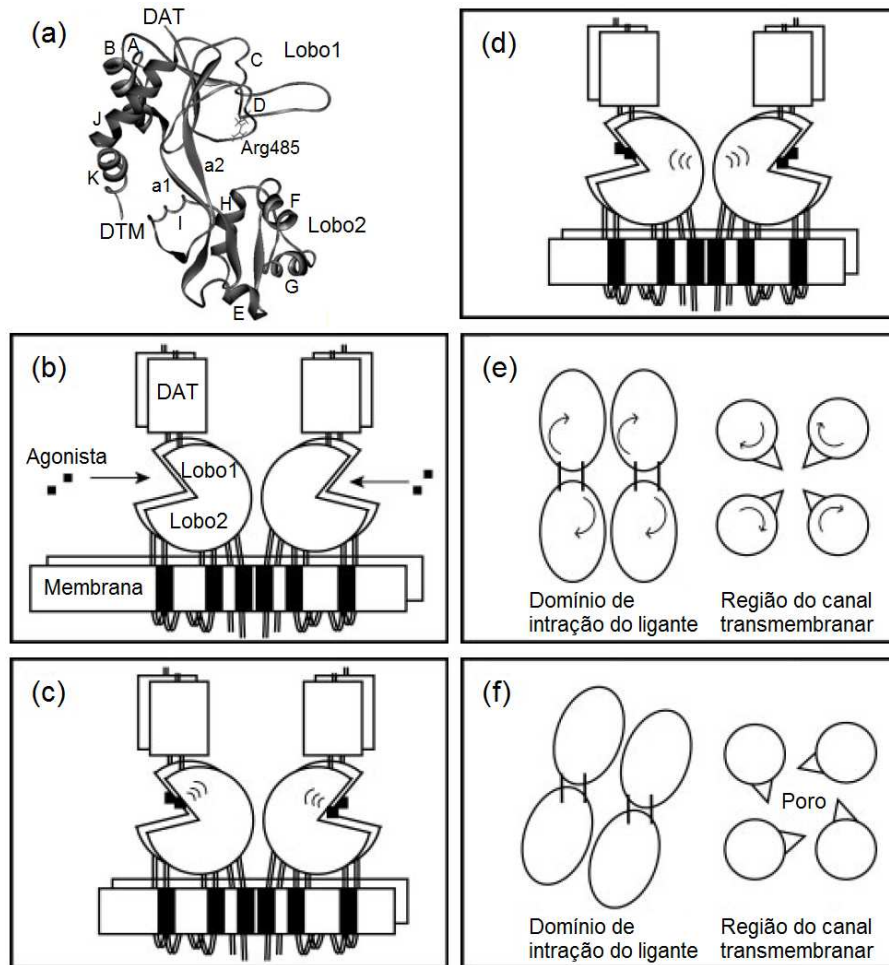
de ativação do receptor GluR2, e a segunda visava o entendimento dos processos de ligação do glutamato (e de outros ligantes) e o fechamento da fenda.

Mendieta *et al.* (2001) focaram no mecanismo de ativação do canal iônico. Eles sugeriram que os movimentos de abertura/fechamento da articulação do domínio S1S2 são acoplados a alterações conformacionais na região de inserção dos segmentos transmembranais, o que causaria a abertura do canal iônico. Já Kubo *et al.* (2004), tendo a Arg485 como a âncora do glutamato, investigaram a dinâmica em picossegundos do comportamento do DIL em resposta à excitação vibracional desse resíduo quando da ligação do glutamato. Como resultado obtiveram que a energia de excitação de vibração da Arg485 no sítio de ligação inicialmente fluiu para Lys730, e depois para a hélice J na interface da subunidade do domínio S1S2. A Figura 1.7 mostra em (a) a estrutura do DIL e ilustra em (b)-(f) o modelo de ativação do receptor segundo Kubo *et al.* (2004).

Arinaminpathy *et al.* (2002) estudaram as alterações do domínio de ligação. Eles observaram que não só o grau de encerramento do domínio depende de interações com o ligante, mas também que a interação proteína-ligante influencia o movimento do domínio S2 em relação ao S1. Para a GluR2, parece que a interação com agonista não só resulta em fechamento de domínio (como revelado cristalograficamente), mas também resulta numa diminuição na mobilidade de domínio (como revelado nas simulações) e que a redução da mobilidade é maior para um agonista total do que para um agonista parcial. As interações-chave encontradas para o sistema ocorrem entre ambos os ligantes e os resíduos proteicos do subdomínio S1 (Arg485, Thr480, e Pro478), e os resíduos do subdomínio S2 (Ser654, Thr655, e Glu705), dentre as quais a mais relevante é a com Arg485. Outro dado importante obtido é que a ligação do glutamato ao DIL da proteína pode ser reforçada, para além da situação presente no cristal, por rotação da cadeia lateral da Thr480. Speranskiy e Kurnikova (2005) investigaram, por dinâmica molecular, a importância das moléculas de água e de alguns resíduos para a interação GluR2-glutamato, para a proteína natural (*wild-type* - WT) e sua mutante E705D (na qual o Glu705 é trocado por um aspartato). Com os cálculos de energia de interação proteína-ligante para situações em que certos resíduos, partes das moléculas, ou mesmo moléculas de água, não possuíam cargas parciais, foi possível analisar a relevância de cada estrutura na interação analisada. O que observaram foi a grande importância das cargas parciais presentes no ligante, nas moléculas de água e principalmente na Arg485. Na Tabela 1.2 estão os valores de energia de interação que Speranskiy e

Kurnikova (2005) obtiveram para cada caso em que retiraram as cargas parciais como descrito anteriormente.

Figura 1.7 – Modelo da ativação do receptor de glutamato. (a) Estrutura do DIL da GluR2, na qual as letras A-K representam  $\alpha$ -hélices e a1 e a2 são articulações. (b) Ligação do agonista. (c) Excitação vibracional da Arg485 no sítio de ligação. (d) Transferência da energia vibracional para a hélice J. (e) Rotação da subunidade. (f) Abertura do canal. Em (b)-(d) a visão é paralela à superfície da membrana celular. Em (e) e (f) a visão é perpendicular à membrana.



Fonte: Adaptada de Kubo *et al.*, 2004.

Embora aparentemente o Glu705 não seja tão importante para a interação direta da GluR2 com o ligante, pois a ausência de cargas parciais neste resíduo estabiliza levemente a interação proteína-ligante, ele desempenha um papel importante na formação e estabilização da conformação fechada. O Glu705 forma uma ponte salina com o resíduo Lys730 que assegura o seu papel essencial no processo de ligação do ligante, resultado que foi, em seguida, confirmado por Mamonova *et al.* (2008).



Posteriormente, foi possível observar novamente que a mobilidade do DIL é maior quando este está ligado ao cainato (agonista parcial) que ao glutamato, acrescentando-se o fato de que o glutamato exibe pouca alteração na sua orientação e conformação dentro do sítio de ligação durante as simulações de MD. Em contraste, o cainato parece possuir um pouco mais de liberdade, talvez devido à natureza mais aberta da fenda. Porém, todas as interações-chave relatadas na estrutura cristalográfica foram mantidas durante toda a simulação. Simulações de dinâmica molecular também revelaram que as moléculas de água são capazes de penetrar no sítio de ligação e interagir com o ligante e com a proteína dentro e em torno dos subsítios, já descritos por Armstrong e Goux (2000) e mostrados na Figura 1.8, que ressalta os sítios (A, B, D, E, e F) nos quais as moléculas de água foram encontradas ao longo da duração das simulações (ARINAMINPATHY *et al.*, 2006).

Tabela 1.2 – Energia de ligação GluR2-glutamato experimental e calculada, em kcal/mol. \*A energia experimental apresentada não foi encontrada no artigo que os autores sugerem como referência (DEMING *et al.*, 2003).

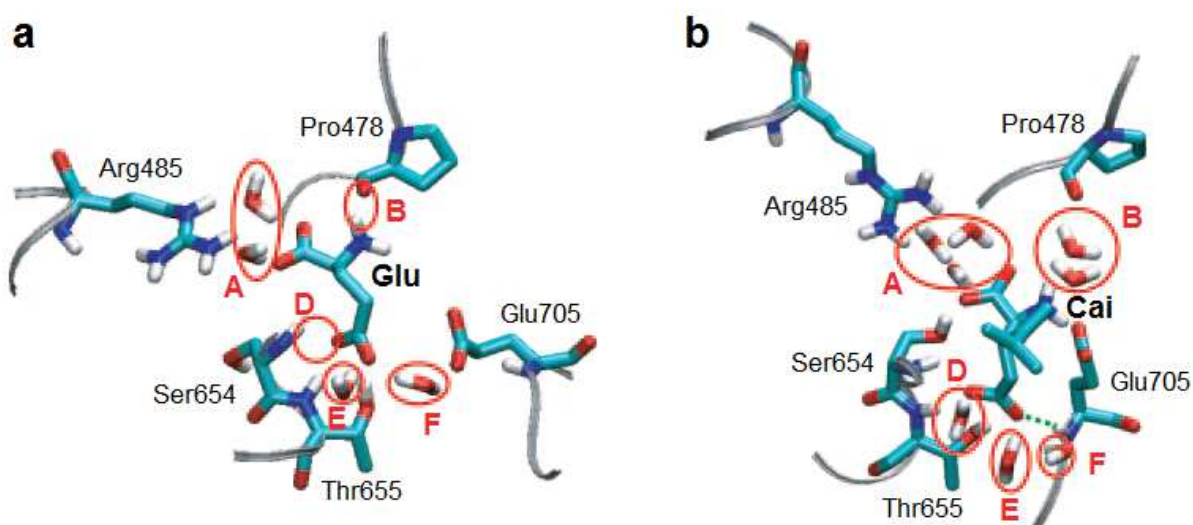
	WT	E705D
Experimental GluR2	-8,62±0,28	
Calculada	-12,98±3,91	-8,16±3,77
Calculada sem cargas parciais em		
Grupo $\alpha$ -carboxil do ligante	-0,69	4,01
Grupo $\gamma$ -carboxil do ligante	-1,13	4,82
Grupo $\alpha$ -amino do ligante	-6,93	-5,26
Água W1-W5	-3,50	-1,98
Arg485	0,09	5,80
Glu705 (ou Asp705)	-14,81	-9,09
Ser654	-8,91	-1,51
Thr655	-7,14	-1,72

Fonte: Adaptada de Speranskiy e Kurnikova, 2005.

Em contraste com interações proteína-ligante na simulação GluR2-glutamato (que são diretas), na simulação GluR2-cainato a maioria das interações são mediadas por água. De fato, moléculas de água frequentemente interrompem a interação direta do cainato com a Arg485. Assim, os autores concluíram que a mobilidade da água no interior do sítio de ligação pode ser correlacionada com o grau de encerramento do domínio e com o ligante presente, podendo inclusive ser um discriminador entre agonismo total e parcial (ARINAMINPATHY *et al.*, 2006). As moléculas de água são ainda mais relevantes quando se trata do estado apo da proteína (LAU, ROUX, 2007). Outro estudo de MD mostra que, na ausência do ligante, o domínio S1S2 facilmente adota uma conformação ainda mais aberta do

que a observada nas estruturas cristalográficas da GluR2 no estado apo. Os autores sugerem que as moléculas de água presentes na fenda ajudam na estabilização do DIL em conformações mais abertas, ao formarem um cluster (camada) em torno do grupo guanidínio da Arg485 (LAU, ROUX, 2007).

Figura 1.8 – O papel das moléculas de água no sítio de ligação: (a) na simulação de GluR2-glutamato (no tempo  $t = 10,1$  ns) e (b) na simulação GluR2-cainato (no tempo  $t = 17,1$  ns). As regiões A e B são cercadas por resíduos do subdomínio S1, e regiões D, E, e F são cercadas por resíduos do subdomínio S2. As regiões A, B, D, E, e F, na qual as moléculas de água foram encontradas ao longo da duração das simulações, estão marcadas.



Fonte: Adaptada de Arinaminpathy *et al.*, 2006.

Estudos mais recentes buscaram entender o comportamento das moléculas de água no sítio de ligação. Vijayan *et al.* (2010) demonstraram que todas, com exceção de uma das moléculas de água no interior do sítio de ligação, podem ser trocadas com a solução na escala de tempo de nanosegundos. Suas simulações também revelaram um comportamento distinto das duas moléculas de água (presentes nos sítios D e E, determinados dessa forma por Arinaminpathy *et al.*, 2006 – ver Figura 1.8). A água no sítio E parece "preencher uma lacuna" na parte inferior do sítio de ligação para melhorar a afinidade com o glutamato, enquanto que a água no sítio D pode ter um papel distinto na modulação da abertura de fenda no GluR2 (VIJAYAN *et al.*, 2010). Na Tabela 1.3, estão as energias de interação encontradas (em kcal/mol) para o ligante, glutamato, com a proteína e as moléculas de água considerando ( $L-W_{\text{Stodas-P}}$ ) e desconsiderando a água no sítio E ( $L-W_{\text{Stodas-WE-P}}$ ), mostrando uma contribuição de  $-2,3$  kcal/mol da água na posição E, que fica sendo considerada como parte integrante da proteína ou do ligante.



Com relação à interação GluR2-glutamato, Lau e Roux (2007) descrevem também uma sequência de acontecimentos, desde antes do ligante (no caso o glutamato) entrar no sítio de interação até o fechamento do DIL da GluR2. No estado 1, a fenda de ligação (S1S2) está aberta o suficiente para que o ligante glutamato acesse facilmente seus parceiros de ligação cristalograficamente observados em S1 (Pro478, Thr480 e Arg485), sendo a primeira interação com a Arg485, sem necessariamente interagir com resíduos do S2. O primeiro passo, então, é o deslocamento das moléculas de água agrupadas em torno da Arg485. Sequencialmente, o encerramento da fenda é impulsionado pela formação de ligações de hidrogênio adicionais entre o ligante e os resíduos de S2, enquanto o ligante permanece firmemente ligado a S1. Os autores caracterizaram a transição do estado 1 para o 2, aproximando-se da conformação do cristal, pela formação de ligações de hidrogênio entre o glutamato e os resíduos S654 e Glu705. No cristal apo, as cadeias laterais de Glu705 e Lys730 interagem, e a ruptura dessa interação para formar a ligação de hidrogênio entre o ligante glutamato e Glu705 é compatível com a sugestão de um interruptor conformacional envolvendo Glu705 e Lys730 (ARMSTRONG, GOUAUX, 2000; ARMSTRONG *et al.*, 2003). Seguindo-se a esses acontecimentos, o estado passa de 2 para 3 com a formação de uma ligação de hidrogênio entre as cadeias laterais de E402 e T686, e finaliza chegando ao estado 4, com o domínio S1S2 totalmente fechado, por meio da mudança na ligação de hidrogênio do glutamato com a Ser654.

Tabela 1.3 – Energias de interação, em kcal/mol, do ligante, glutamato, com a proteína e as águas. L; ligante (glutamato),  $W_{\text{StodasP}}$ ; todas as água e a proteína,  $W_{\text{Stodas-WE}}$ ; todas as águas e a proteína com exceção da água (W) na posição E.

Subunidade	L- $W_{\text{StodasP}}$	L- $W_{\text{Stodas-WE}}$	Contribuição WE
GluR2	-179,86	-177,55	-2,31

Fonte: Adaptada de Vijayan *et al.*, 2010.

Ligações de hidrogênio intraproteicas também estão relacionadas à forma como a proteína interage com seus ligantes e à estabilização do domínio S1S2 em suas diferentes conformações durante a transição do estado aberto para o fechado (LAU, ROUX, 2007). Simulações de MD revelaram diferenças significativas no tempo-de-vida de ligações de hidrogênio interdomínios no estado apo-aberto e no estado fechado com e sem ligante entre os resíduos Gly451(S1)-Ser652(S2), Glu705(S2)-Tyr732(S1) e Glu402(S1)-Thr686(S2). A Tabela 1.4 mostra o tempo-de-vida das ligações de hidrogênio entre estes pares de resíduos

em cada situação estudada por Mamonova *et al.* (2008). Percebe-se, também, que a fenda pode assumir conformação fechada mesmo no estado apo, embora a conformação aberta de S1S2 seja termodinamicamente mais provável (MAMONOVA *et al.*, 2008). Mais recentemente, Okada *et al.* (2012) reforçaram a importância das interações Glu402-Thr686 e Glu705-Tyr732, inferindo que a última tem papel crucial na transição do estado semi-aberto para o estado fechado. Eles especulam também que uma das funções dos resíduos Ser654, Thr655, Thr686 e Glu402 é fazer a conversão do DIL entre estes dois estados, e que a função do resíduo Tyr450 é guiar a regulação da orientação do glutamato após interação com seu anel de benzeno para induzir a interação atrativa cátion- $\pi$ .

Tabela 1.4 – Interações-chave entre os subdomínios S1 e S2 em simulações MD. <sup>a</sup>O tempo-de-vida é calculado como percentual do tempo total de simulação, quando dada ligação está presente.

Ligação de hidrogênio	Tempo-de-vida da ligação de hidrogênio (%)		
	Apo aberto	Fechado	Apo fechado
G451-S652	–	81	71
E705-Y732	44	100	80
E402-T686	–	99	99

Fonte: Adaptada de Mamonova *et al.*, 2008.

Além do entendimento de como ocorre a interação GluR2-ligante e como ela causa o encerramento do DIL, a outra questão que detém a atenção da comunidade científica, que está relacionada às interações intraproteicas, é como diferenciar agonistas parciais de agonistas totais. Postila *et al.* (2011), complementando os estudos de Arinaminpathy *et al.* (2002, 2006), afirmam que agonistas parciais não impedem o encerramento total da fenda e sim desestabilizam a conformação fechada do DIL. Postila *et al.* (2011) justificam essa desestabilização do domínio fechado devido ao rompimento, causado pelo agonista parcial, da ligação de hidrogênio entre os resíduos Gly451 (subdomínio S1) e Ser652 (subdomínio S2), que eles não observaram para agonistas totais. Porém, as análises feitas por Okada *et al.* (2012) indicaram que a ligação de hidrogênio entre Gly451 e Ser652 não é crucial para formar o estado fechado do DIL, embora Mamonova *et al.* (2008) tenham salientado que esta ligação pode desempenhar um papel enrijecedor na estrutura do complexo, causando um fechamento maior da fenda. Dessa forma a observação da existência ou não da interação Gly451-Ser652 pode não ser de confiança para determinar a forma de agonismo dos ligantes.

Outro estudo, referente a modos de interação (SAHAI, BIGGIN, 2011), revela que há diferenças na forma de interação não apenas entre agonistas totais e parciais, mas também entre agonistas totais. Contrariamente a todas as expectativas, os dois agonistas glutamato e AMPA, apresentam dois modos distintos de interação com a GluR2. Aparentemente as diferenças estão relacionadas com a posição das moléculas de água no interior do sítio de ligação. Porém, mais estudos são necessários para determinar o que causa tal diferença. Os autores ainda calcularam a energia de interação da proteína com estes ligantes (glutamato, -380,13 kcal/mol, e AMPA, -329,53 kcal/mol).

Analisando a literatura, observa-se que muito há para se desvendar a respeito da forma de interação e ativação da GluR2. Com o avanço do poder computacional, torna-se possível a utilização de métodos de cálculo mais refinados. Assim, a finalidade desta dissertação é estudar *ab initio* a interação da GluR2 com quatro de seus ligantes: seus agonistas totais, glutamato e AMPA; seu agonista parcial, cainato e seu antagonista DNQX – ver Fig. 1.1. Os resultados, obtidos com base na bioquímica molecular quântica, permitem estabelecer entre relação entre a energia de interação destes ligantes com a GluR2 e a sua eficácia na ativação da mesma, além de um perfil detalhado de como estes ligantes interagem com os seus resíduos. Utilizando o método de fragmentação molecular com capas conjugadas (MFCC) e uma descrição com base da teoria do funcional da densidade (DFT) das interações moleculares no sítio de ligação, é possível analisar a interação dos ligantes com cada um dos resíduos próximos e pós-próximos da GluR2.

Detalhes dos protocolos desenvolvidos de acordo com os métodos empregados são apresentados no Capítulo 2, que inicia descrevendo a cristalografia de Raios-X e suas limitações, essencial para a determinação da estrutura 3D da proteína que é utilizada como ponto de partida para o presente trabalho; é relevante destacar que os hidrogênios ausentes do PDB da GluR2 utilizado são colocados fazendo-se a minimização da energia total do sistema ligante-GluR2 de forma semi-clássica. Sequencialmente, é abordada a forma como foi tratado o estado de protonação dos ligantes estudados, pois sua estrutura no pH do meio é de extrema relevância para uma boa representação do sistema. Finalmente, descreve-se o método de fragmentação molecular MFCC utilizado para se descrever a interação dos ligantes com os resíduos próximos e pós-próximos da GluR2; considerações sobre a blindagem dos resíduos pós-próximos utilizada nos cálculos são também realizadas. O Capítulo 2 se encerra com a descrição de detalhes dos métodos computacionais empregados.

No Capítulo 3 os resultados obtidos são expostos e discutidos. Obtém-se a energia total de interação ligante-GluR2, determinando-se como ela varia de acordo com a distância dos resíduos próximos e pós-próximos aos centroides dos ligantes. Obtém-se que a intensidade de ativação e antagonismo segue a ordem AMPA > glutamato > cainato > DNQX (somente quando um raio do sítio de ligação suficientemente grande é considerado), o que explica dados experimentais publicados sobre a ativação e antagonismo do receptor glutamatérgico GluR2. Discute-se também a relevância da blindagem dos resíduos pós-próximos que interagem com os ligantes, bem como se faz uma análise da energia de interação dos resíduos (próximos e pós-próximos) considerados com os átomos dos ligantes (resultados apresentados nos gráficos BIRD), sem e com mediação das moléculas de água existentes no sítio de ligação (o que permite se determinar *ab initio* a relevância da água na energética da interação ligante-GluR2). Obtém-se que para o glutamato os resíduos atrativos mais relevantes são Arg485, Lys730 (mediado pela água W39), Ser654, Leu650 mediado por W69, e Lys656 mediado por W22; os resíduos repulsivos mais relevantes para o glutamato são Glu402 (pós-próximo) mediado por W36, Glu657 e Asp651 (pós-próximos). Obtém-se que para o AMPA os resíduos atrativos mais relevantes são Arg485, Thr655 mediado por W134, Lys730 mediado por W137, Lys656 mediado por W138, Lys449 e Arg684 (pós-próximos); os resíduos repulsivos mais relevantes para o AMPA são Glu402 mediado por W3, Asp651 mediado por W96 e W139 (pós-próximo), e Glu657 (pós-próximo) mediado por W140. Obtém-se que para o cainato os resíduos atrativos mais relevantes são Arg485, Ser654, Thr655 e Arg684 (pós-próximo); os resíduos repulsivos mais relevantes para o Cainato são Glu402, Glu657 mediado por W78 (pós-próximo) e Asp651. Obtém-se que para o DNQX os resíduos atrativos mais relevantes são Arg485, Glu705 e Tyr450 mediado por W26 e W137; o resíduo repulsivo mais relevante para o DNQX é Leu498.

O Capítulo 4 encerra a presente dissertação, apresentando conclusões relativas aos resultados obtidos. Também indica as perspectivas para o desenvolvimento de futuras pesquisas relacionadas ao trabalho desenvolvido nesta dissertação. A principal meta realizada foi a realização da primeira descrição, baseada na química quântica, do mecanismo de ativação e antagonismo dos neurotransmissores glutamato, AMPA, cainato e DNQX no receptor GluR2. O principal resultado obtido foi se obter-se a energia total de interação ligante-GluR2 em função da distância dos centroides dos ligantes aos resíduos, o que permitiu correlacioná-la à intensidade de ativação e antagonismo dos neurotransmissores em questão. Demonstrou-se que ela segue a ordem AMPA>glutamato>cainato>DNQX somente quando

um raio do sítio de ligação suficientemente grande é considerado, o que explica: (i) dados experimentais publicados sobre a ativação e antagonismo do receptor glutamatérgico GluR2; (ii) que os resíduos pós-próximos podem ser importantes para determinar a funcionabilidade do receptor. Entre as perspectivas de pesquisas a serem desenvolvidas como frutos deste trabalho destacamos (a) considerar como a constante dielétrica inerente a GluR2 pode alterar o perfil da sua interação com os ligantes no sítio de ligação; (b) como o agonismo de um neurotransmissor glutamatérgico (por exemplo, o glutamato) varia quando ele se liga a receptores GluR diferentes; (c) como os monômeros GluR interagem entre si para a formação de homodímeros e heterodímeros, determinando como o sítio de ligação pode ser influenciado por isto e quais os principais resíduos envolvidos do ponto de vista energético. Em suma, uma plêiade de perspectivas relacionadas aos resultados obtidos reluzem, entre as quais podemos finalmente destacar a possibilidade do desenvolvimento de agonistas dopaminérgicos com especificidades voltadas à diminuição de efeitos colaterais quando utilizados no tratamento de doenças relacionadas à neurotransmissão glutamatérgica.

O Apêndice A desta dissertação, **Do Sistema de Órgãos do Corpo Humano aos Neurotransmissores**, fornece uma base para situar o leitor no domínio da Neurobioquímica. Por sua vez, o Apêndice B, **Fundamentos Teóricos**, trás uma abordagem sucinta para o leitor que abrange desde os métodos clássicos até a DFT, capaz de lhe fornecer uma ideia dos fundamentos da física e química teórica que permeiam o trabalho realizado nesta dissertação. O Apêndice C desta dissertação, **Resumos em Congressos e Artigos Publicados**, trás os resumos dos trabalhos apresentados em congressos e o artigo submetido para publicação relacionado com o trabalho desenvolvido para a finalização desta dissertação.

---

**REFERÊNCIAS**

- ARINAMINPATHY, Y.; SANSOM, M. S. P.; C. BIGGIN, P. C. Molecular Dynamics Simulations of the Ligand-Binding Domain of the Ionotropic Glutamate Receptor GluR2. **Biophys. J.**, vol. 82, p. 676-683, 2002.
- ARINAMINPATHY, Y.; SANSOM, M. S. P.; C. BIGGIN, P. C. Binding site flexibility: molecular simulation of partial and full agonists within a glutamate receptor, **Mol. Pharmacol.**, vol. 69, p. 11-18, 2006.
- ARMSTRONG, N; SUN, Y.; CHEN, G. Q.; GOUAUX, E. Structure of a glutamate-receptor ligand-binding core in complex with kainite. **Letters to Nature**, vol. 395, p. 913-917, 1998.
- ARMSTRONG, N; GOUAUX, E. Mechanisms for activation and antagonism of an AMPA-sensitive glutamate receptor: crystal structures of the GluR2 ligand binding core. **Neuron**, vol. 28, p. 165-181, 2000.
- BEICH-FRANDSEN, M.; PICKERING, D. S.; MIRZA, O.; JOHANSEN, T. N.; GREENWOOD, J.; VESTERGAARD, B.; SCHOUSBOE, A.; GAJHEDE, M.; LILJEFORS, T.; KASTRUP, J. S. Structures of the ligand-binding core of iGluR2 in complex with the agonists (R)- and (S)-2-amino-3-(4-hydroxy-1,2,5-thiadiazol-3-yl)propionic acid explain their unusual equipotency. **J. Med. Chem.**, vol. 51, p. 1459-1463, 2008.
- BRÄUNER-OSBORNE, H.; EGEBJERG, J.; NIELSEN E. Ø.; MADSEN, U.; KROGSGAARD-LARSEN, P. Ligands for glutamate receptors: design and therapeutic prospects. **J. Med. Chem.**, vol. 43, p. 2609-2645, 2000.
- BRUNTON, L.; BLUMENTHAL, D. K.; BUXTON, I. L. O.; PARKER, K. L. **Goodman and Gilman's Manual of Pharmacology and Therapeutics**. 11<sup>th</sup> Ed., McGraw-Hill Companies, 2007.
- CLAYTON, A.; SIEBOLD, C.; GILBERT, R. J. C.; SUTTON, G. C.; HARLOS, K.; MCLLHINNEY, R. A. J.; JONES, E. Y.; ARICESCU, A. R. Crystal Structure of the GluR2 Amino-Terminal Domain Provides Insights into the Architecture and Assembly of Ionotropic Glutamate Receptors. **J. Mol. Biol.**, vol. 392, p. 1125-1132, 2009.
- DEMING, D.; CHENG, Q.; JAYARAMAN, V. Is the isolated ligand binding domain a good model of the domain in the native receptor? **J. Biol. Chem.**, Vol. 278, p. 17589-17592, 2003.
- FRANDSEN, A.; PICKERING, D. S.; VESTERGAARD, B.; KASPER, C.; NIELSEN, B. B.; GREENWOOD, J. R.; CAMPIANI, G.; FATTORUSSO, C.; GAJHEDE, M.; SCHOUSBOE, A.; KASTRUP, J. S. Tyr702 is an important determinant of agonist binding and domain closure of the ligand-binding core of GluR2. **Mol. Pharmacol.**, vol. 67, p. 703-713, 2005.
- HAYWARD, S.; BERENDSEN, H. J. C. Systematic analysis of domain motions in proteins from conformational change; new results on citrate synthase and T4 lysozyme. **Proteins**, vol. 30, p. 144-154, 1998.
- HOGNER, A.; KASTRUP, J. S.; JIN, R.; LILJEFORS, T.; MAYER, M. L.; EGEBJERG, J.; LARSEN, I. K.; GOUAUX, E. Structural basis for AMPA receptor activation and ligand selectivity: crystal structures of five agonist complexes with the GluR2 ligand-binding core. **J. Mol. Biol.**, vol. 322, p. 93-109, 2002.
- JIN, R.; BANKE, T. G.; MAYER, M. L.; TRAYNELIS, S. F.; GOUAUX, E. Structural basis for partial agonist action at ionotropic glutamate receptors. **Nat. Neurosci.**, vol. 6, p. 803-810, 2003.
- JIN, R.; SINGH, S. K.; GU, S.; FURUKAWA, H.; SOBOLEVSKY, A. I.; ZHOU, J.; JIN, Y.; GOUAUX, E. Crystal structure and association behaviour of the GluR2 amino-terminal domain. **The EMBO J.**, vol. 28, p. 1812-1823, 2009.
- KUBO, M.; ODAI, K.; SUGIMOTO, T.; ITO, E. Quantum Chemical Study of Agonist-Receptor Vibrational Interactions for Activation of the Glutamate Receptor. **J. Biochem.**, vol. 129, p. 869-874, 2001.
- KUBO, M.; SHIOMITSU, E.; ODAI, K.; SUGIMOTO, T.; SUZUKI, H.; ITO, E. Quantum chemical study of ligand-receptor electrostatic interactions in molecular recognition of the glutamate receptor. **J. Mol. Struct. (Theochem)**, vol. 634, p. 145-157, 2003a.

KUBO, M.; SHIOMITSU, E.; ODAI, K.; SUGIMOTO, T.; SUZUKI, H.; ITO, E. Agonist-specific vibrational excitation of glutamate receptor. **J. Mol. Stru. (Theochem)**, vol. 639, p. 117-128, 2003b.

KUBO, M.; SHIOMITSU, E.; ODAI, K.; SUGIMOTO, T.; SUZUKI, H.; ITO, E. Picosecond dynamics of the glutamate receptor in response to agonist-induced vibrational excitation. **Proteins**, vol. 54, p. 231-236, 2004.

LAU, A. Y.; ROUX, B. The Free Energy Landscapes Governing Conformational Changes in a Glutamate Receptor Ligand-Binding Domain. **Structure**, vol. 15, p. 1203-1214, 2007.

MADDEN, D. R. The structure and function of glutamate receptor ion channels. **Nature Rev. Neurosci.**, vol. 3, p. 91-101, 2002.

MAMONOVA, T.; SPERANSKIY, K.; KURNIKOVA, M. Interplay between structural rigidity and electrostatic interactions in the ligand binding domain of GluR2. **Proteins**, vol. 73, p. 656-671, 2008.

MARTINS, A. C. V. **Explicando *Ab initio* a Intensidade de Ativação e Antagonismo do Receptor Glutamatérgico GluR2**. 2012. 168 p. Dissertação (Mestrado em Química), Programa de Pós-Graduação em Química, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2012.

MENDIETA, J.; RAMÍREZ, G.; GAGO, F. Molecular Dynamics Simulations of the Conformational Changes of the Glutamate Receptor Ligand-Binding Core in the Presence of Glutamate and Kainate. **Proteins**, vol. 44, p. 460-469, 2001.

ODAI, K.; SUGIMOTO, T.; KUBO, M.; ITO, E. Theoretical Research on Structures of  $\gamma$ -Aminobutyric Acid and Glutamic Acid in Aqueous Conditions. **J. Biochem.**, vol. 133, p. 335-342, 2003.

OKADA, O.; ODAI, K.; SUGIMOTO, T.; ITO, E. Molecular dynamics simulations for glutamate-binding and cleft-closing processes of the ligand-binding domain of GluR2. **Biophys. Chem.**, vol. 162, p. 35-44, 2012.

POSTILA, P. A.; YLILAURI, M.; PENTIKÄINEN, O. T. Full and Partial Agonism of Ionotropic Glutamate Receptors Indicated by Molecular Dynamics Simulations. **J. Chem. Inf. Model.**, vol. 51, p. 1037-1047, 2011.

PØHSGAARD, J.; FRYDENVANG, K.; MADSEN, U.; KASTRUP, J. S. Lessons from more than 80 structures of the GluA2 ligand-binding domain in complex with agonists, antagonists and allosteric modulators. **Neuropharmacology**, vol. 60, p. 135-150, 2011.

RANG, H. P. The receptor concept: pharmacology's big Idea. **Brit. J. Pharm.**, vol. 147, p. S9-S16, 2006.

SAHAI, M. A.; BIGGIN, P. C. Quantifying Water-Mediated Protein-Ligand Interactions in a Glutamate Receptor: A DFT Study. **J. Phys. Chem. B**, vol. 115, p. 7085-7096, 2011.

SOBOLEVSKY, A. I.; ROSCONI, M. P.; GOUAUX, E. X-ray structure, symmetry and mechanism of an AMPA-subtype glutamate receptor. **Nature**, vol. 462, p. 745-756, 2009.

SPERANSKIY, K.; KURMIKOVA, M. On the binding determinants of the glutamate agonist with the glutamate receptor ligand binding domain. **Biochemistry**, vol. 44, p. 11508P11517, 2005.

STAWSKI, P.; JANOVJAK, H.; TRAUNER, D. Pharmacology of ionotropic glutamate receptors: A structural perspective. **Bioorg. Med. Chem.**, vol. 18, p. 7759-7772, 2010.

TRAYNELIS, S. F.; WOLLMUTH, L. P.; MCBAIN, C. J.; MENNITI, F. S.; VANCE, K. M.; OGDEN, K. K.; HANSEN, K. B.; YUAN, H.; MYERS, S. J.; DINGLEDINE, R.; SIBLEY, D. Glutamate Receptor Ion Channels: Structure, Regulation, and Function. **Pharmacol. Rev.**, vol. 62, p. 405-496, 2010.

VIJAYAN, R.; SAHAI, M. A.; CZAJKOWSKI, T.; BIGGIN, P. C. A comparative analysis of the role of water in the binding pockets of ionotropic glutamate receptors. **Phys. Chem. Chem. Phys.**, vol. 12, p. 14057-14066, 2010.







# CAPÍTULO 2

## Métodos e Simulações Computacionais



A interação da GluR2 com seus ligantes vem sendo estudada por vários métodos. Como ponto de partida, foram utilizados os resultados obtidos a partir do método de difração de raios-X por Armstrong e Gouaux (2000) e foram realizados estudos computacionais empregando a técnica de fragmentação molecular com capas conjugadas proposta por Zhang e Zhang (2003). As técnicas computacionais adotadas foram baseadas na abordagem da Teoria do Funcional da Densidade e optou-se por trabalhar inicialmente com a aproximação de densidade local (LDA) elevando-se posteriormente o nível de cálculo ao se empregar a aproximação generalizada do gradiente com correção da dispersão (GGA+D).

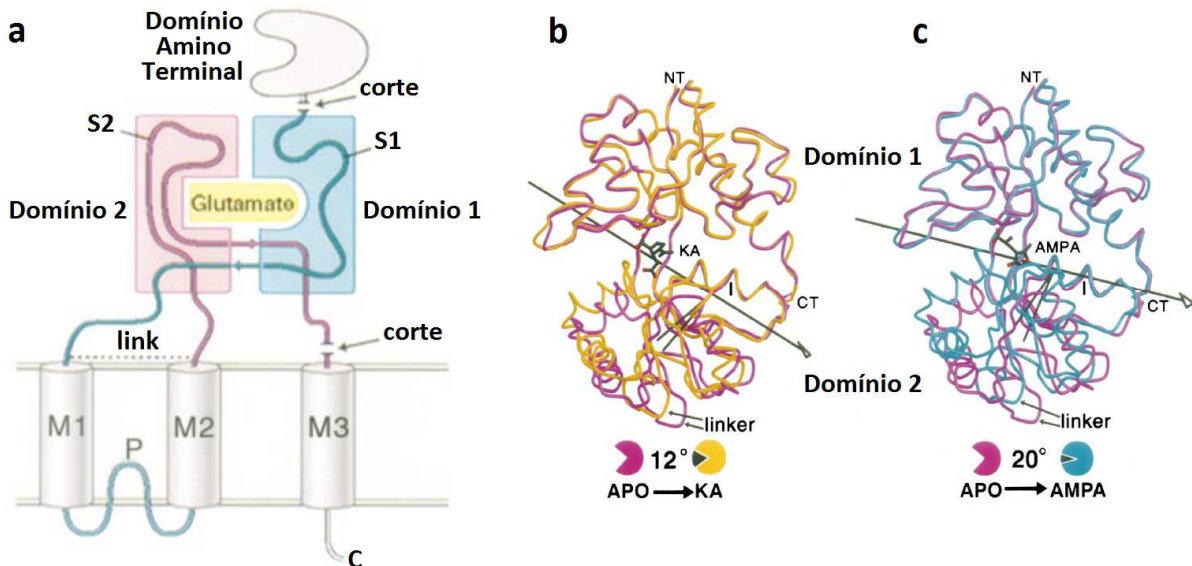
## 2.1 Inicialização: difração de raios-X da GluR2 e seus ligantes

No desenvolvimento do presente trabalho foram utilizados, para os cálculos, as estruturas obtidas por difração de raio-X a partir dos estudos cristalográficos de Armstrong e Gouaux (2000). Os autores obtiveram as estruturas cristalinas do domínio de interação do ligante da subunidade protéica GluR2 no estado apo, na presença dos agonistas glutamato e AMPA, do agonista parcial cainato e do antagonista DNQX.

A proteína teve sua construção reprojeta para a obtenção da estrutura do DIL, suprimindo a região amino-terminal e as partes intramembrana M1, M2 e M3. As sequências peptídicas conectadas a M1 e M2 foram reconectadas utilizando o dipeptídeo Gly-Thr. A Figura 2.1 (a) mostra um esboço da estrutura da GluR2 completa e ilustra o que foi feito para se obter apenas o DIL que é composto pelos subdomínios 1 e 2 (domínio 1, que em sua maior parte é constituído pelo segmento 1, S1, e domínio 2 que por sua vez é composto predominantemente pelo segmento 2, S2, como é ilustrado na Figura 2.1 (a)).

Armstrong e Gouaux (2000) submeteram os cristais obtidos à técnica de difração de raios-X, na qual a incidência do feixe no cristal interage com os átomos presentes originando o fenômeno de difração que torna possível a localização da posição atômica. Os resultados da difração deram origem aos quatro arquivos depositados no *Protein Data Bank* (PDB) com os códigos 1FTJ, 1FTM, 1FW0 e 1FTL referentes, respectivamente, a proteína co-cristalizada com glutamato de resolução 1,9 Å, com AMPA de resolução 1,7 Å, com cainato de resolução 1,9 Å, com DNQX de resolução 1,8 Å e no estado apo (sem a presença de nenhum ligante no sítio de interação) de resolução 2,0 Å. Os resultados da difração são resumidos na Tabela 2.1.

Figura 2.1 – O domínio de interação do ligante. Em (a) tem-se a estrutura da GluR2 ressaltando o domínio de interação do ligante e como este foi tratado para se obter os dados cristalográficos, em (b) e (c) tem-se o encerramento relativo do DIL e respectivos eixos: (b) sobreposição dos dados cristalográficos obtidos para o DIL no estado apo e ligado ao cainato (KA); (c) sobreposição dos dados cristalográficos obtidos para o DIL no estado apo e ligado ao AMPA. As setas em (b) e (c) indicam o grau de encerramento do domínio (quanto mais horizontal, maior o encerramento).



Fonte: Armstrong e Gouaux, 2000.

Tabela 2.1 – Resumo da difração com alta resolução dos cristais da variante S1S2 em complexo com uma série de ligantes.

Coleta de Dados Estatísticos									
Ligante	Grupo Esp.	Célula Unit. (Å)	No. por u.a. <sup>a</sup>	Lambda (Å)	$d_{min}$ (Å) <sup>c</sup>	Total Obs.	Único Obs.	$R_{merge}^{hd}$ (%)	Completeness <sup>d</sup> (%)
Glutamato	P2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> 2	$a = 114,0, b = 163,4, c = 47,4$	3	1,54	1,9 (1,97)	391030	69601	4,2 (19,9)	98,3 (87,8)
AMPA	P2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> 2	$a = 113,8, b = 163,2, c = 47,2$	3	0,979	1,7 (1,76)	503581	91073	6,8 (10,8)	93,5 (67,7)
Cainato (I)	P2 <sub>1</sub>	$a = 43,4, b = 63,1, c = 46,4, \beta = 92,3^\circ$	1	0,918	1,6 (1,66)	154641	31151	3,0 (5,9)	94,4 (70,4)
Cainato (J)	P2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> 2	$a = 57,3, b = 89,0, c = 48,9$	1	1,54	1,9 (1,97)	96421	18725	3,3 (13,7)	92,0 (61,9)
Se-Met DNQX	P2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub>	$a = 62,2, b = 92,6, c = 195,2$	4						
(e1-borda)				0,9795	2,5 (2,59)	138851	29669	5,9 (10,6)	74,4 (29,5)
(e2-pico)				0,9790	2,5 (2,59)	133161	29001	7,4 (10,9)	72,9 (28,9)
(e3-remoto)				0,9687	2,5 (2,59)	158110	30771	7,4 (10,1)	77,4 (36,4)
DNQX	P2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub>	$a = 62,2, b = 93,7, c = 97,4$	2	0,979	1,8 (1,86)	298773	50796	5,3 (8,4)	95,0 (83,8)
Apo	P2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub>	$a = 62,2, b = 91,6, c = 98,4$	2	1,54	2,0 (2,07)	153854	37087	3,6 (14,8)	95,9 (73,7)

<sup>a</sup> Número de moléculas proteicas por unidade assimétrica (u.a.).

<sup>b</sup>  $R_{merge} = (\sum |I_i - \langle I_i \rangle|) / \sum I_i$ , sendo  $\langle I_i \rangle$  a média de todas as reflexões de simetria-equivalente.

<sup>c</sup> Valores em parênteses definem os limites de resolução mínima para a última camada de dados.

<sup>d</sup> Valores em parênteses são para a última camada de dados.

Fonte: Adaptada de Armstrong e Gouaux, 2000.

Os cristais obtidos para a proteína complexada com glutamato e complexada com AMPA continham três unidades do DIL da GluR2 nomeados A, B e C, dois dos quais (A e C)

formavam um dímero. Já para o DNQX a célula unitária possuía dois DIL (A e B) que formavam um dímero e para a proteína complexada com cainato só encontrava-se uma sequência proteica do DIL. E por fim, o cristal da proteína no estado apo possuía duas unidades do DIL (A e B). Os resultados do refinamento cristalográfico que os autores obtiveram (ARMSTRONG, GOUAUX, 2000) estão expostos na Tabela 2.2. Nela estão explicitados os números de átomos pertencentes às estruturas proteicas, o número de águas presentes em cada dado cristalográfico, o número de átomos pertencente aos ligantes, dentre outras informações pertinentes aos sistemas.

Tabela 2.2 – Estatísticas de refinamento cristalográfico para todos os complexos.

Estatísticas de Refinamento															
Complexo	Resol.(Å)	R <sub>work</sub> <sup>a</sup> (%)	R <sub>free</sub> <sup>b</sup> (%)	No. Átom. Prot.	No. Águas	No. Átom. Lig.	No. Íons	Desvios Rms							
								Média Valores-Ligação			Valores-Ligação				
								Global	Principal	Ligante	Ligação (Å)	Ângulos (°)	Ligação	Ângulos	
Glutamato	20-1,9	22,8	26,6	5894	265	30	5	20,26	19,15	13,72	0,011	1,517	2,4	3,4	
AMPA	20-1,7	20,9	24,8	5872	420	39	5	17,13	15,41	13,35	0,010	1,454	2,1	3,1	
Cainato (I)	20-1,6	21,6	26,1	1878	250	15	0	18,00	15,91	9,97	0,009	1,441	1,8	2,7	
Cainato (J)	20-2,0	24,5	30,8	1885	88	15	0	30,90	30,93	28,50	0,011	1,697	2,5	3,6	
DNQX	20-1,8	21,9	27,2	3851	363	36	5	14,74	13,07	26,08	0,010	1,421	2,1	3,0	
Apo	20-2,0	22,4	28,7	3868	246	0	0	16,65	15,64	-	0,011	1,586	2,8	3,8	

<sup>a</sup>R<sub>work</sub> =  $(\sum ||F_o| - |F_c||) / \sum |F_o|$ , sendo F<sub>o</sub> e F<sub>c</sub> fatores estruturais observado e calculado, respectivamente.

<sup>b</sup>10% das reflexões nos conjuntos de dados do DNQX, Apo, Cainato (J), e AMPA e 5% das reflexões nos conjuntos de dados do Glutamato e Cainato (I) foram usados para o cálculo do valor R<sub>free</sub>.

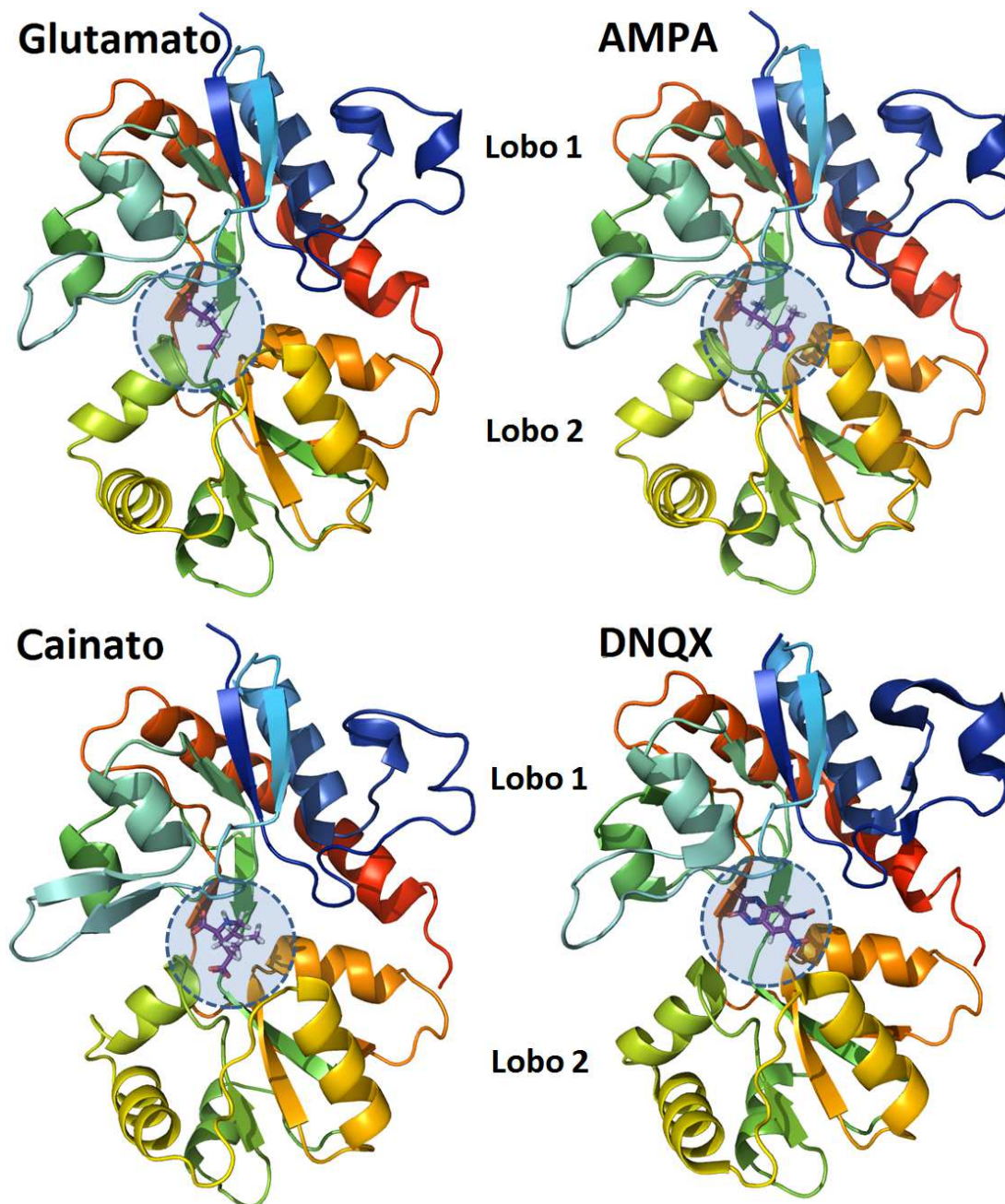
Fonte: adaptada de Armstrong e Gouaux, 2000.

A partir das análises dos dados cristalográficos que obtiveram, Armstrong e Gouaux (2000) concluíram que a presença do ligante no sítio de ligação causa o encerramento do domínio S1S2. O que eles observaram é que os agonistas totais (glutamato e AMPA) causam um encerramento de cerca de 20° do DIL que é maior que o causado pelo agonista parcial cainato de 12° e que por sua vez fecha o domínio mais que o antagonista DNQX que causa um encerramento de apenas 2,5°. Esses índices de encerramento foram obtidos a partir da sobreposição dos dados cristalográficos e análise das posições dos átomos de Ca da sequência proteica tendo-se como referencia (encerramento zero) o estado apo. O Ca é o carbono central do aminoácido ao qual se ligam os quatro grupos: grupo amina (NH<sub>2</sub>), grupo carboxílico (COOH), hidrogênio e um substituinte característico de cada aminoácido. A sobreposição dos DIL no estado apo e ligado a cainato pode ser observada na Figura 2.1 (b) e a sobreposição dos DIL no estado apo e ligado a AMPA na Figura 2.1 (c). Por meio de suas análises, eles



consideraram a Arg485 como o resíduo mais importante para a interação GluR2-ligante. Outros resíduos indicados como importantes na interação da GluR2 com seus agonistas totais e parcial são: Tyr450, Thr480, Ser652, Ser654, Thr655, Pro478 e Glu705. Já para o antagonista DNQX, os outros resíduos importantes são: Tyr450, Pro478, Thr480, Thr686, Tyr732.

Figura 2.2 – Cadeia A do domínio de interação do ligante complexado com cada um dos ligantes.



Fonte: Martins, 2012.

Como em alguns casos havia mais de uma cadeia proteica por célula unitária de cristal nos arquivos PDB, como objeto de estudo foram escolhidas, de forma arbitrária, as cadeias A de cada cristal que são mostradas na Figura 2.2. As sequências proteicas escolhidas são compostas por um total de 258 resíduos de aminoácidos, com exceção da cadeia cristalizada com o DNQX que possui 257 resíduos. Elas abrangem desde o resíduo Lys393 da GluR2 (para o sistema do DNQX ela tem início no resíduo Thr394) ao Lys506 (S1), sendo interrompido pelo dipeptídeo Gly-Thr, e continuando do resíduo Pro632 ao Cys773 (S2).

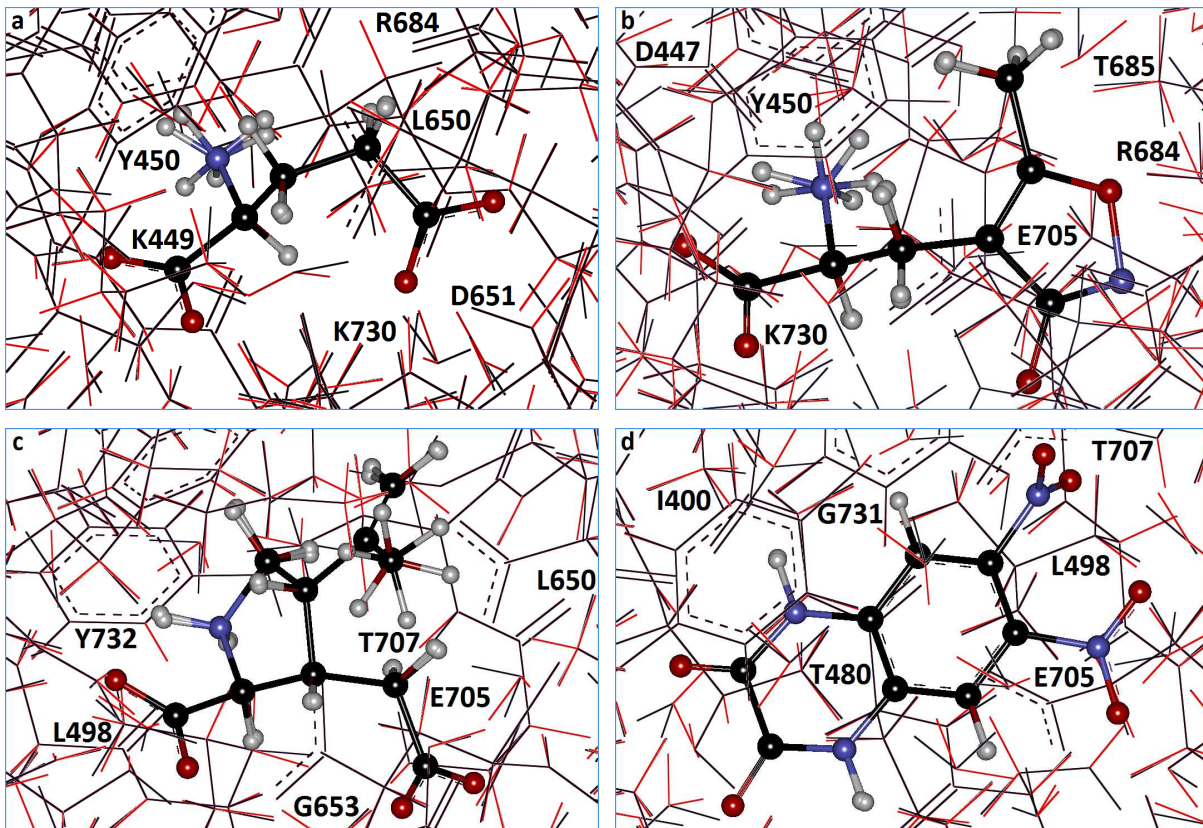
A maioria dos cristais macromoleculares não oferecem resolução suficiente para que a difração de raios-X possa detectar as posições dos átomos de hidrogênio. Essa limitação deve-se à mobilidade desses átomos na cadeia proteica e por isso a maioria dos arquivos de coordenadas cristalográficas do arquivo PDB incluem apenas as posições para os átomos não-hidrogenoides. Quando a cristalografia de proteínas é de alta resolução (1,2 Å ou menos) torna-se possível atribuir, por difração de raios-X, algumas posições dos átomos de hidrogênios a partir do mapa de densidade de elétrons (CREIGHTON, 1993).

## 2.2 Otimização da posição dos átomos de hidrogênio

Como os arquivos cristalográficos não possuíam os átomos de hidrogênio, estes foram adicionados a cada um dos sistemas de interesse e tiveram sua posição otimizada com auxílio do módulo FORCITE (ALLEN, TILDESLEY, 1987) implementado no pacote de programas *Materials Studio Modeling*. O programa adota a abordagem da física clássica e o campo de força escolhido para tal fim foi o CVFF (*Consistent Valence Force Fields*), que, de acordo com a literatura (LIFSON *et al.*, 1979; DAUBER-OSGUTHORPE *et al.*, 1988) é parametrizado especificamente para sistemas com biomoléculas (ex. aminoácidos e proteínas) e moléculas orgânicas.

O procedimento de otimização foi feito tendo como tolerâncias de convergência  $2,0 \times 10^{-5}$  kcal/mol para a variação total de energia,  $0,001 \text{ kcal } \text{Å}^{-1} \text{ mol}^{-1}$  para a força máxima por átomo e  $1,0 \times 10^{-5} \text{ Å}$  para o deslocamento atômico máximo. Durante a otimização das posições dos átomos de hidrogênio todos os outros átomos do sistema foram mantidos fixos. Na Figura 2.3 pode-se observar a diferença da posição dos átomos de hidrogênio antes (em vermelho) e depois (em preto) da otimização da posição dos átomos de hidrogênio para cada um dos sistemas.

Figura 2.3 – Posição dos átomos de hidrogênio antes, em vermelho, e depois da otimização, em preto, para os quatro sistemas: (a) GluR2-glutamato, (b) GluR2-AMPA (-1), (c) GluR2-cainato e (d) GluR2-DNQX.



Fonte: Martins, 2012.

### 2.3 Estado de protonação dos ligantes

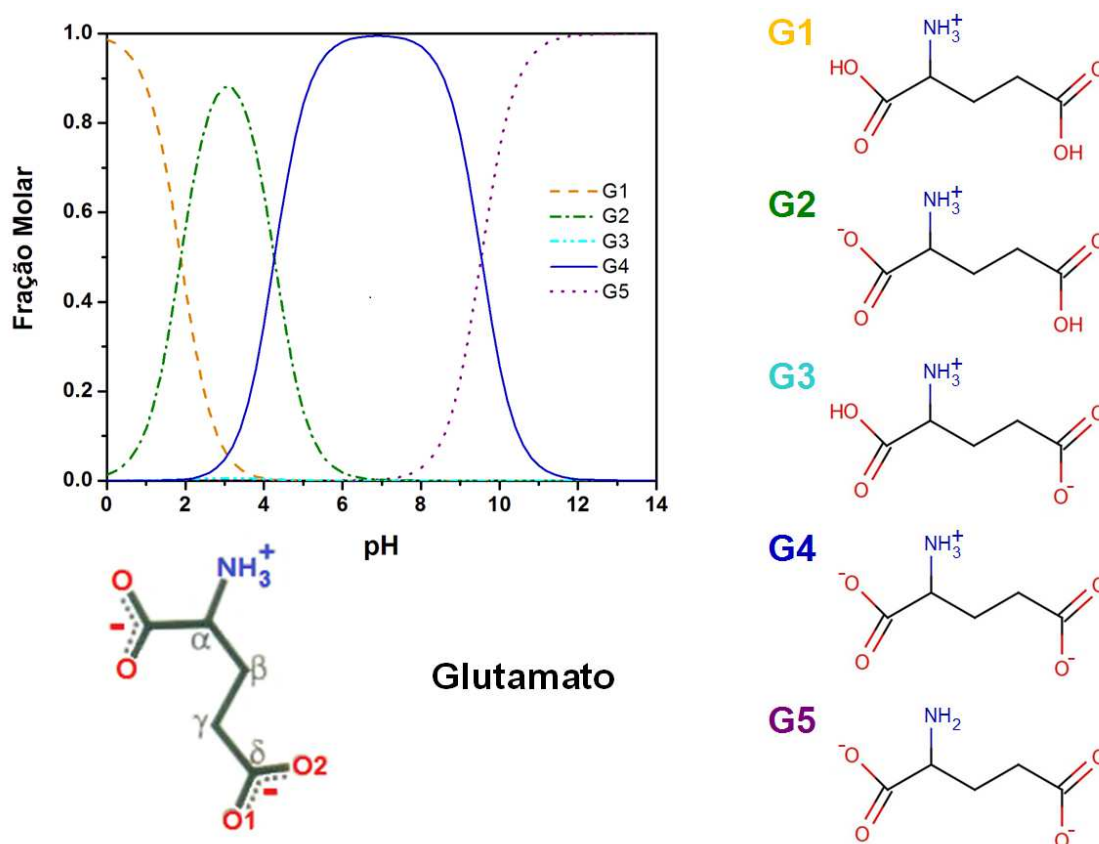
Dentre os ligantes, três são aminoácidos e o quarto (DNQX) possui hidrogênios ionizáveis. Assim, todos apresentam diversos estados de protonação que dependem diretamente do pH do meio em que se encontram. Portanto, é necessário verificar se os estados de protonação sugeridos por Armstrong e Gouaux (2000) realmente condizem com o encontrado no pH do meio extracelular cerebral.

Segundo Chesler (2003), estudos com microeletrodos, visando a determinação do pH extracelular do cérebro, indicaram que o fluido intersticial cerebral é ligeiramente mais ácido do que o sangue (pH do sangue é 7,4), com um pH aproximado de 7,3. Em certas regiões cerebrais, no entanto, o pH intersticial pode ser inferior, como, por exemplo, para o centro do cérebro, valores de pH de 7,1-7,2 têm sido relatados. Para fim de comparação, decidiu-se adotar o pH 7,3.



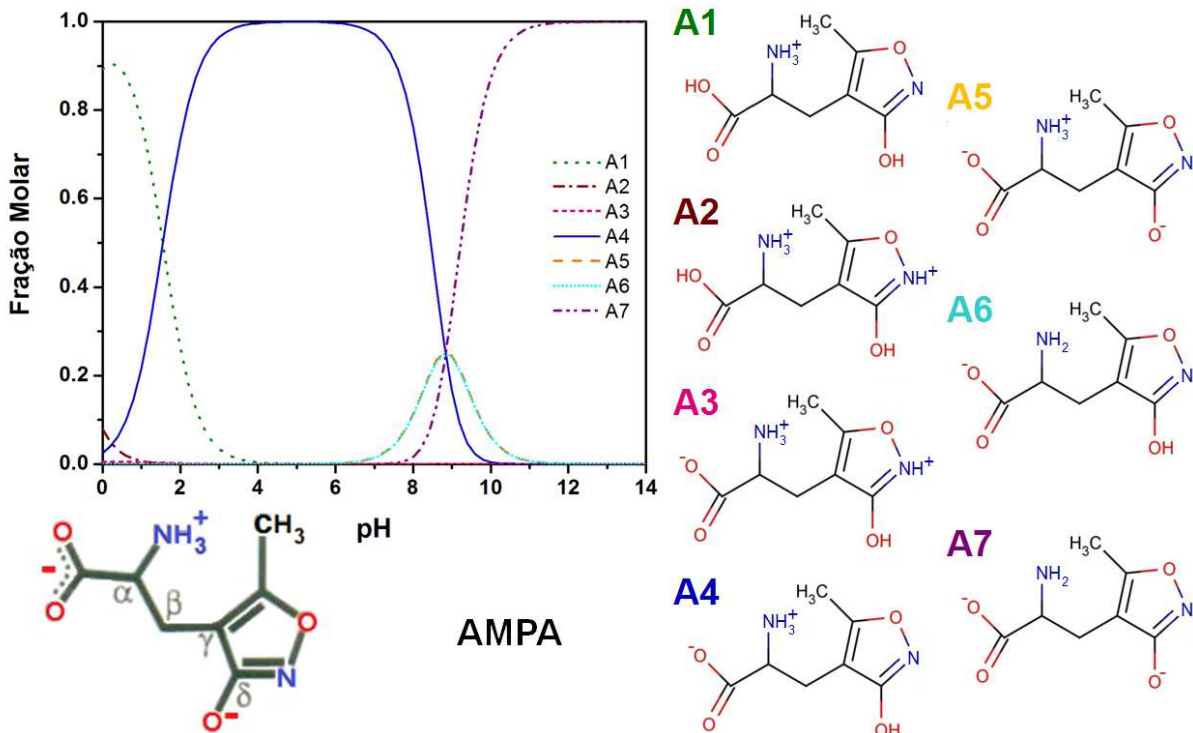
Então, para a verificação da possível estrutura de cada ligante no pH cerebral foi utilizado o *software* Marvin Sketch 5.3.2 que também possibilita analisar os diferentes pKa das moléculas. Os pKa foram avaliados à temperatura corporal, 310 K, adotando uma precisão de duas casas decimais em um intervalo entre 0 e 14 e o solvente foi simulado por meio da constante dielétrica da água. A distribuição da fração molar das formas de protonação dos ligantes em função do pH e suas respectivas estruturas observadas estão presentes nas Figuras 2.4 a 2.7.

Figura 2.4 – Distribuição de microestados para o glutamato em função do pH e as estruturas observadas.



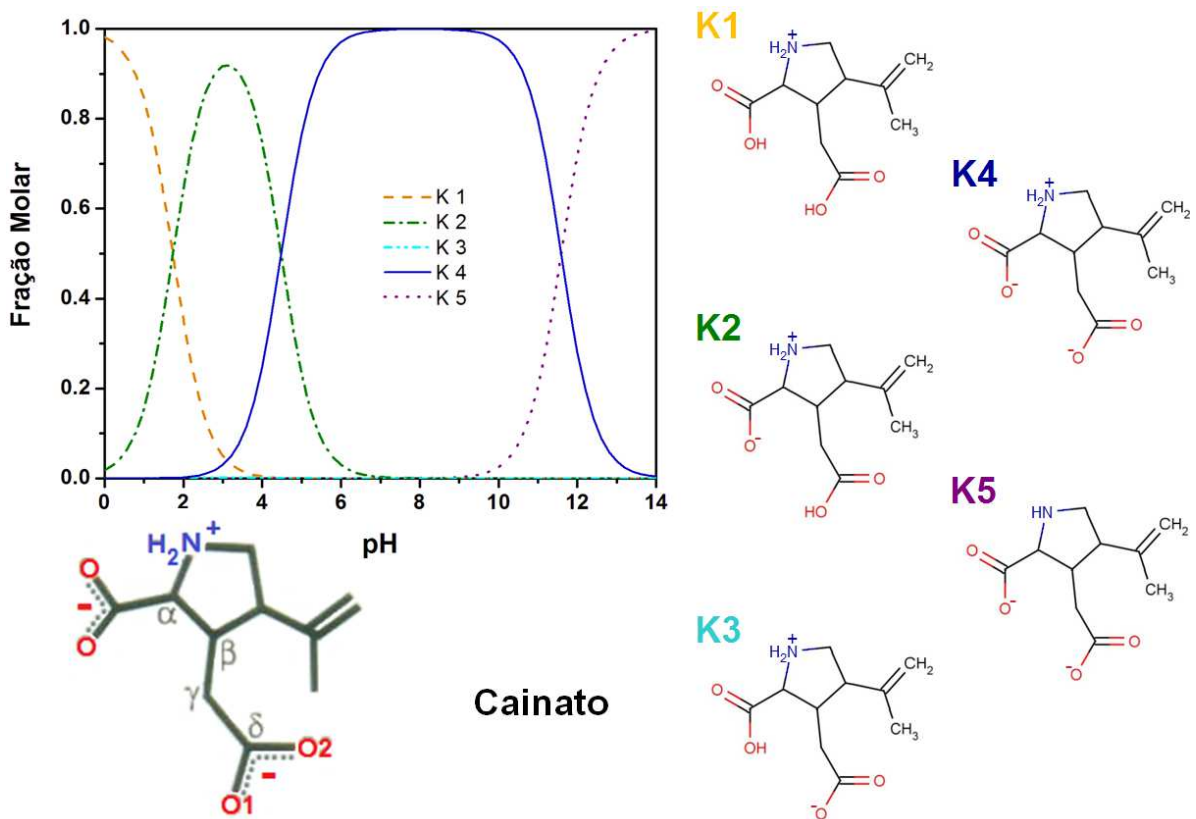
Fonte: Martins, 2012.

Figura 2.5 – Distribuição de microestados para o AMPA em função do pH e as estruturas observadas.



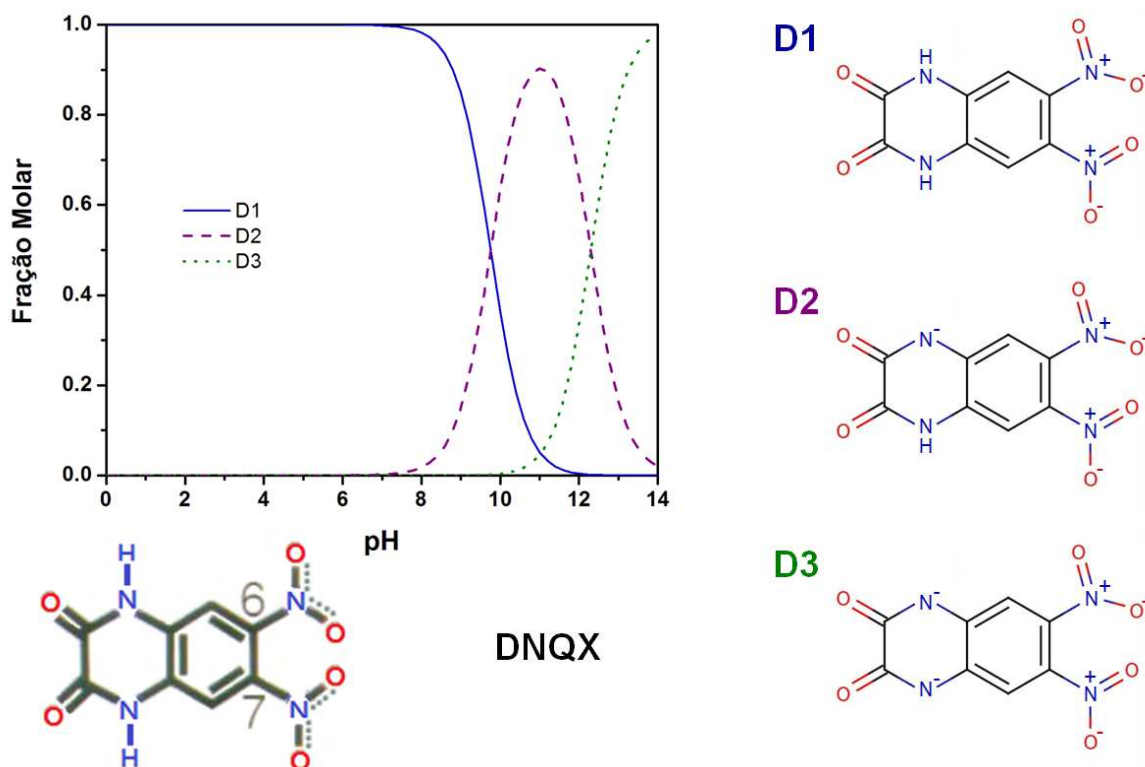
Fonte: Martins, 2012.

Figura 2.6 – Distribuição de microestados para o cainato em função do pH e as estruturas observadas.



Fonte: Martins, 2012.

Figura 2.7 – Distribuição de microestados para o DNQX em função do pH e as estruturas observadas.



Fonte: Martins, 2012.

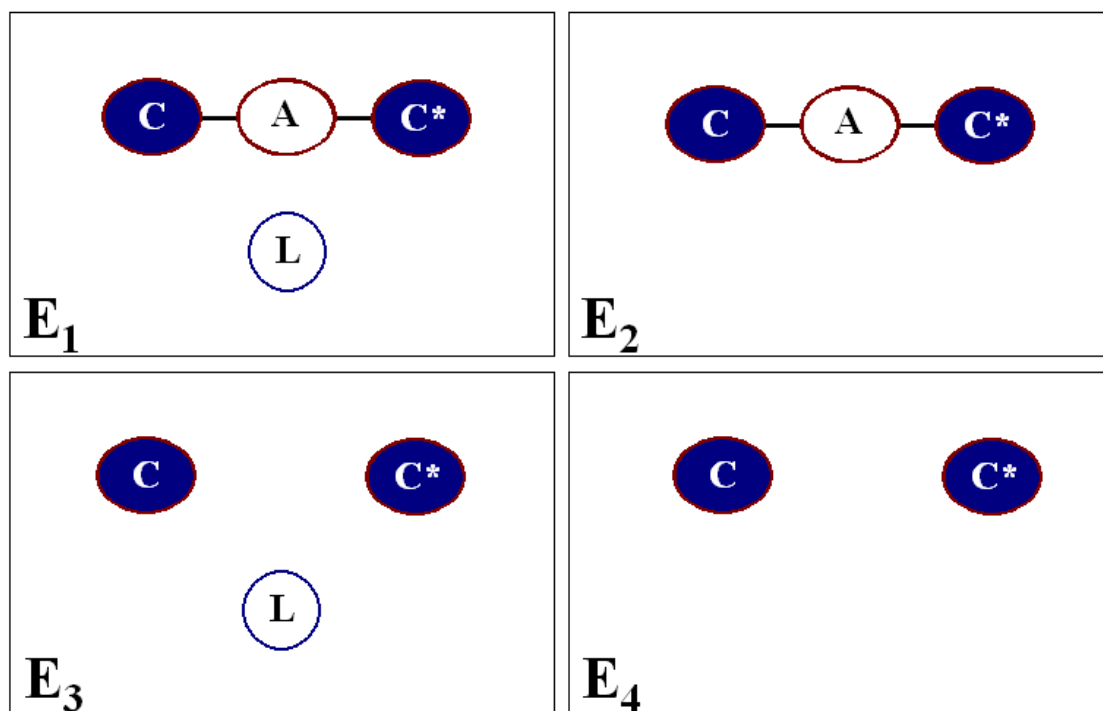
Cinco estruturas são possíveis dentro da faixa de pH de 0 à 14 para o glutamato, como visto na Figura 2.4, e no pH do cérebro a estrutura que apresenta maior fração molar é a G4. Já para o AMPA, de acordo com a Figura 2.5 há sete estruturas possíveis, sendo a mais abundante no pH 7,3 a estrutura A4. O cainato, assim como o glutamato, apresenta cinco estruturas possíveis entre pH 0 e 14 (Fig. 2.6), com a estrutura K4 sendo a mais abundante para pH fisiológico. Finalizando, para o DNQX são possíveis três estruturas dentro da faixa de pH estudada (Fig. 2.7), sendo a estrutura a D1 mais abundante no pH 7,3.

#### 2.4 Dividir para conquistar: a fragmentação molecular com capas conjugadas

As energias de interação dos ligantes com os resíduos da proteína foram calculadas empregando o esquema proposto por Zhang e Zhang (2003) de fragmentação molecular com capas conjugadas (MFCC). Essa estratégia visa reduzir o custo computacional tornando mais viável a utilização de métodos precisos como a DFT. O MFCC é uma abordagem muito útil para alcançar uma descrição precisa de sistemas biológicos por meio de cálculos quânticos

(GAO *et al.*, 2004; CHEN *et al.*, 2005; HE, ZHANG, 2005). A escolha adequada de capas conjugadas é crucial para a melhor descrição do sistema biológico, pois possibilita o cumprimento dos requisitos de valência química e imita o meio eletrônico local da proteína original dos fragmentos com capas (WU *et al.*, 2007). Para tanto, definiu-se as capas como sendo os resíduos de aminoácidos vizinhos, àquele de interesse, com a adição de hidrogênio para apassar ligações pendentes.

Figura 2.8 – Esquema que ilustra a montagem do MFCC. Sendo A o resíduo de aminoácido de interesse, C e C\* as capas e L o ligante. E<sub>1</sub>, E<sub>2</sub>, E<sub>3</sub> e E<sub>4</sub> são as energias respectivas a cada sistema ilustrado. A energia de interação (E<sub>I</sub>) de A com L é obtida a partir da equação  $E_I = E_1 + E_2 + E_3 - E_4$ .



Fonte: Martins,2012.

Nos cálculos do MFCC, a energia de interação entre cada um dos ligantes ( $L_i$ ) e cada resíduo de aminoácido ( $R_i$ ),  $E(L_i - R_i)$ , é dada de acordo com:

$$E(L_i - R_i) = [E(L_i - C_i R_i C_i^*) - E(C_i R_i C_i^*)] - [E(L_i - C_i C_i^*) - E(C_i C_i^*)] \quad (2.1)$$

A capa  $C_i(C_i^*)$  é obtida tomando-se o resíduo ligado covalentemente ao grupo amina (carboxila) de  $R_i$  com adição de átomos de hidrogênio, sempre que necessário apassar

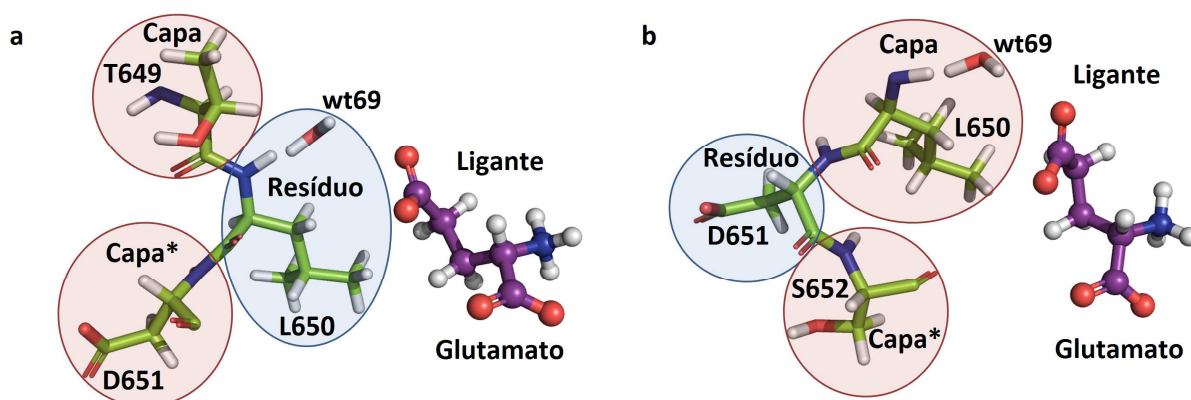
ligações pendentes. No lado direito da equação 2.1, o primeiro termo  $E_1$ ,  $E(L_i - C_i R_i C_i^*)$ , é a energia total do sistema formado pelo ligante e pelo resíduo com as capas. O segundo termo  $E_2$ ,  $E(C_i R_i C_i^*)$ , dá a energia total do resíduo apenas com as capas, enquanto o terceiro termo  $E_3$ ,  $E(L_i - C_i C_i^*)$ , é a energia total do sistema formado pelo ligante e conjunto de capas hidrogenado. Finalmente,  $E_4 - E(C_i C_i^*)$  - é a energia total do sistema formado somente pelas capas hidrogenadas. Um desenho esquemático é apresentado na Figura 2.8 ilustrando a equação 2.1.

## 2.5 Levando-se em conta moléculas de água

A literatura ressalta bem a importância das moléculas de água. Portanto, àquelas presentes no sítio de ligação foram consideradas como parte integrante da proteína e tiveram sua importância levada em consideração nos cálculos realizados. Para tanto, cada molécula foi anexada, como parte integrante, ao resíduo mais próximo com o qual estivesse fazendo ligação de hidrogênio. Caso a molécula de água não estivesse realizando nenhuma ligação de hidrogênio, ela era anexada ao resíduo mais próximo.

Assim, as moléculas de água podem aparecer nos cálculos de duas formas: ou anexadas ao resíduo de interesse, ou anexada a uma capa. As duas possibilidades estão ilustradas na Fig. 2.9 (a) e (b) respectivamente.

Figura 2.9 – Ilustração de como foi considerada a relevância das moléculas de água. (a) a molécula de água faz parte do resíduo de interesse; (b) a molécula de água faz parte de uma das capas.



Fonte: Martins, 2012.

Em ambos os casos apresentados na Fig. 2.9 mostra-se a molécula de água (wt) de numeração 69 (de acordo com o arquivo PDB). Ela foi considerada como integrante do resíduo Leu650. Em todos os cálculos em que este resíduo aparece a wt69 aparece com ele, sendo este resíduo o de interesse ou a capa.

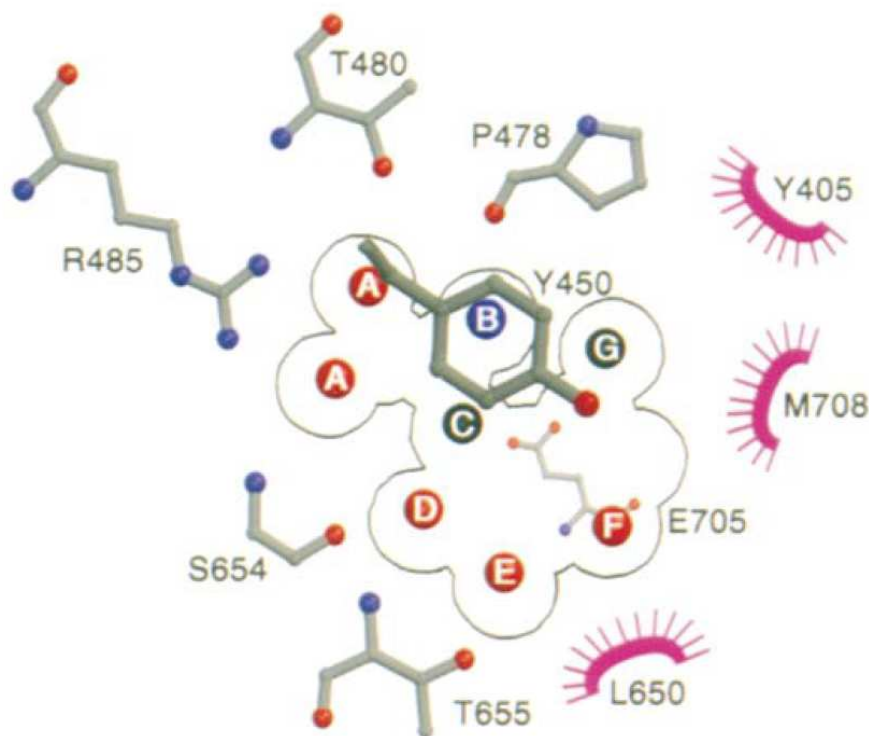
## 2.6 O sítio de ligação efetivo: variando-se a proximidade

Inicialmente, foi considerado apenas o sítio de interação de 5,5 Å, sendo este selecionado e feito todo o tratamento descrito no tópico 2.2. Na determinação dos resíduos que pertencem ao raio de interação, considerou-se a distância do centroide de cada ligante ao resíduo. Todos os resíduos do sítio de ligação mencionados por Armstrong e Gouaux (2000), ilustrados na Figura 2.10, fazem parte do raio de 5,5 Å que foi escolhido. Porém, surgiu o questionamento se o raio escolhido era suficiente para descrever o sistema. Desta forma, foi selecionado um raio extrapolado de 20 Å e foi repetido o tratamento: adição os átomos de hidrogênio e otimização de suas posições com os parâmetros descritos anteriormente.

Com a consideração do raio de 20 Å, percebeu-se que as cadeias proteicas em cada sistema apresentavam alguns resíduos com sua estrutura incompleta (alguns átomos dos resíduos não estavam presentes no PDB) e estes precisaram ser corrigidos manualmente. O sistema do glutamato possuía problemas nos resíduos: Asp456, Glu511, Arg661 e Arg684. No caso do AMPA os resíduos corrigidos foram: Asp456, Glu511, Lys663, Asp668, Arg684, Lys695, Lys761. Para o sistema do cainato foi necessário corrigir: Lys441, Asp454, Asp656, Lys471, Glu511, Glu514, Arg661, Lys663, Asp668, Arg675, Glu678, Ser680, Arg684, Lys695, Lys699, Lys738. E, finalizando, os resíduos corrigidos no sistema do DNQX foram: Lys410, Lys441, Asp454, Thr657, Lys658, Glu511, Glu657, Arg661, Arg675, Arg684, Lys716, Lys738. Os átomos que foram adicionados aos resíduos corrigidos tiveram suas posições otimizadas juntamente com os átomos de hidrogênio.

O centroide dos ligantes (centro geométrico) foi usado, como padronização, para definir o centro do raio de interação proteína-ligante. Partindo do raio de 3 Å, este foi aumentado até se obter uma convergência dos valores de energia total que é calculada somando-se a energia de todos resíduos presentes no raio em questão. Dessa forma, mostrou-se necessário considerar resíduos a uma distância de 13 Å do centroide do ligante. Para o glutamato, 89 resíduos fazem parte do raio de 13 Å, para o AMPA são 88 resíduos e para o cainato e DNQX são um total de 81 resíduos.

Figura 2.10 – Esquema do sítio de ligação do agonista. Para simplificar todos os resíduos, com exceção da Tyr450 e Glu705 foram colocados no plano do papel.



Fonte: Armstrong e Gouaux, 2000.

Como resultados, foram obtidas as energias totais de interação da proteína com cada ligante pertencente aos raios do intervalo de 3 a 13 Å, e a energia de interação de cada resíduo de aminoácido proteico com cada ligante. A energia total de interação proteína-ligante, para cada raio considerado, foi obtida somando-se a contribuição individual de cada resíduo e mostrada em um gráfico da energia *versus* raio de interação para cada funcional utilizado (Fig. 3.3). As energias de interação individuais dos resíduos são apresentadas nas Tabelas 3.3 a 3.10, e algumas das mais importantes foram grafadas nos painéis BIRD (acrônimo dos termos em inglês para: sítio de ligação, energia de interação e domínio de resíduos) que são mostrados nas Figuras 3.6 a 3.9.

Com a consideração de resíduos mais distantes do ligante surgiu a questão da blindagem causada a estes, por parte dos resíduos mais próximos. Viu-se a necessidade de considerá-la em todos os cálculos de interação resíduo-ligante para resíduos que sofriam tal interferência.



## 2.7 A blindagem da vizinhança pós-próxima

No cálculo da energia de interação entre resíduo de aminoácido e ligante, é importante considerar o efeito da blindagem parcial causada pela presença de aminoácidos carregados nas vizinhanças do resíduo de interesse. A blindagem é utilizada para melhorar a precisão na estimativa da energia de interação quando há interações de longo alcance de resíduos mais distantes com o ligante, as quais estão presentes em sistemas com ligantes e aminoácidos na forma zwitteriônica.

A blindagem faz-se necessária principalmente para reduzir os efeitos das interações de longo alcance, tais como fortes interações iônicas do ligante com os resíduos de aminoácidos carregados. Como o método MFCC leva em conta apenas as interações dos primeiros vizinhos do resíduo de interesse com o ligante, faz-se necessário a utilização da blindagem a fim de levar em conta o efeito na energia de interação causado pela "barreira" entre o resíduo de aminoácido e o ligante. Na blindagem de barreira, consideram-se os resíduos que estão bloqueando diretamente a interação do resíduo de interesse com o ligante.

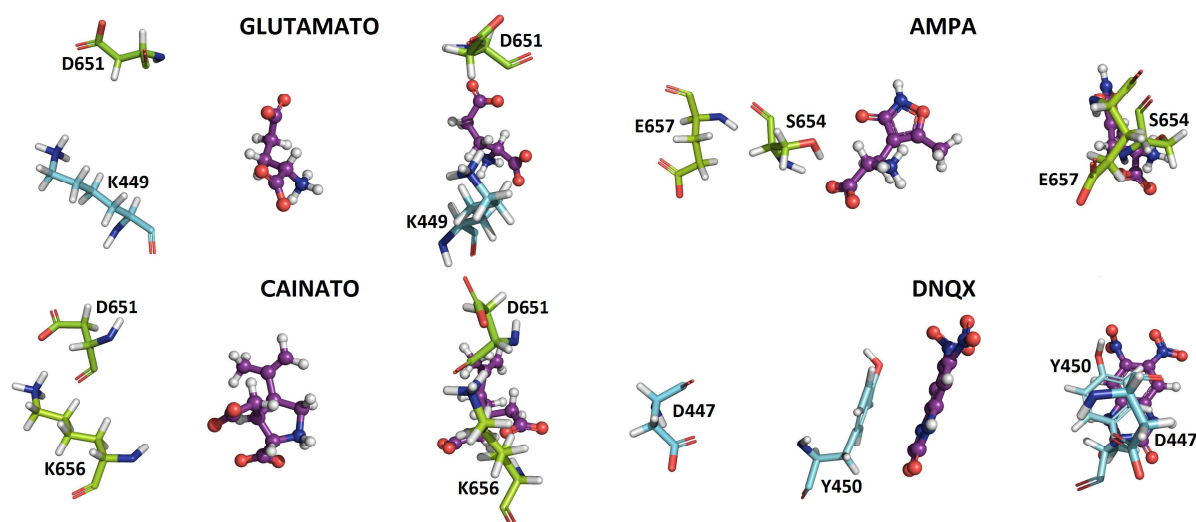
A Figura 2.11 ilustra, em dois diferentes ângulos de visão, como é feita a consideração da blindagem de barreira. Nela, as capas foram omitidas para possibilitar uma melhor visualização do resíduo de interesse, do resíduo que o está blindando e do ligante. De modo geral, a blindagem é feita, como pode ser observado para os exemplos do AMPA e do DNQX na Figura 2.11, considerando o resíduo (para o AMPA a Ser654 e para o DNQX a Tyr450) que está diretamente entre o resíduo de interesse (para o AMPA o Glu657 e para o DNQX o Asp447) e o ligante. Já em alguns casos, como mostrado para o glutamato e para o cainato, embora o resíduo (para o glutamato o Asp651 e para o cainato também o Asp651) não esteja diretamente entre o ligante e o resíduo de interesse (para o glutamato a Lys449 e para o cainato a Lys656), é necessário considerá-lo, pois o fato de ele ser um resíduo carregado causa uma modificação do meio, intervindo na interação do resíduo de interesse com o ligante.

Além da blindagem de barreira, há outros tipos de blindagem aplicados para melhorar a precisão do cálculo da energia de interação entre o ligante e os resíduos de uma proteína. O grupo de simulações computacionais em sistemas biológicos (Labinitio) vem desenvolvendo diversos protocolos para aplicações de blindagem que torne os resultados mais precisos e mais próximos dos resultados experimentais. Um exemplo que necessita de tal intervenção, são proteínas que possuem íons co-cristalizados junto com o ligante. A presença do íon próximo



ao ligante causa grandes perturbações no cálculo da energia de interação, pois as interações de longo alcance dominam e acabam "escondendo" as ligações de hidrogênio e interações de caráter hidrofóbico, levando, assim, a uma descrição errada do sistema. Uma estratégia para resolver esse tipo de problema é considerar como uma blindagem, no cálculo da energia de interação, os aminoácidos carregados próximos do íon, pois dessa forma a interação entre o íon-ligante e resíduos que é coulombiana ( $1/r^2$ ) passa a ser a interação de um dipolo elétrico ( $1/r^3$ ). Outra blindagem que se mostrou eficiente para melhorar a descrição da interação proteína-ligante é constante dielétrica. A consideração de diferentes constantes dielétricas tem mostrado uma redução proporcional nos valores da energia de interação, aproximando os valores calculados daqueles esperados.

Figura 2.11 – Exemplificação de como é feita a consideração da blindagem de barreira. As capas da blindagem e do resíduo de interesse foram omitidas para uma melhor visualização.



Fonte: Martins, 2012.

Devido às características do sistema estudado, escolheu-se trabalhar inicialmente com a blindagem de barreira, considerando a constante dielétrica do vácuo, zero. Na consideração da blindagem de barreira, são necessários pelo menos dois cálculos de MFCC, o que depende da quantidade de resíduos usados como blindagem. No primeiro o cálculo é realizado com o resíduo de interesse ( $R_i$ ), suas capas ( $C_i, C_i^*$ ), o(s) resíduo(s) que está blindando ( $B_i$ ), suas capas ( $K_i, K_i^*$ ) e o ligante ( $L_i$ ) de acordo com:

$$E(L_i - R_i - B_i) = [E(L_i - C_i R_i C_i^* - K_i B_i K_i^*) - E(C_i R_i C_i^* - K_i B_i K_i^*)] \\ - [E(L_i - C_i C_i^* - K_i K_i^*) - E(C_i C_i^* - K_i K_i^*)]. \quad (2.2)$$

As capas  $C_i(C_i^*)$  e  $K_i(K_i^*)$  são obtidas tomando-se os resíduos ligados covalentemente aos grupos amina (carboxila) de  $R_i$  e de  $B_i$ , respectivamente, com adição de átomos de hidrogênio, sempre que necessário apassivar ligações pendentes. No lado direito da equação 2.7.1, o primeiro termo  $E(L_i - C_i R_i C_i^* - K_i B_i K_i^*)$  é a energia total do sistema formado pelo ligante, pelo resíduo com as capas e pelo resíduo que está funcionando como blindagem e suas capas. O segundo termo,  $E(C_i R_i C_i^* - K_i B_i K_i^*)$ , dá a energia total do resíduo com as capas e a blindagem e suas capas, enquanto o terceiro termo,  $E(L_i - C_i C_i^* - K_i K_i^*)$ , é a energia total do sistema formado pelo ligante e os conjuntos de capas hidrogenadas. Finalmente,  $E(C_i C_i^* - K_i K_i^*)$  é a energia total do sistema formado somente pelas capas hidrogenadas. Com a equação (2), obtém-se a interação entre o ligante, o resíduo e a blindagem. Como o interesse é apenas a interação entre ligante e resíduo, há a necessidade de se realizar o segundo cálculo que dá a energia de interação do ligante com a blindagem. Este segundo MFCC pode ser dado por um análogo da equação 2.1. Caso haja mais de um resíduo na blindagem, este segundo cálculo é realizado para cada um.

## 2.8 Simulações computacionais no escopo da Teoria do Funcional da Densidade

Todos os cálculos de energia deste trabalho foram feitos usando o módulo Dmol3 que adota a abordagem da Teoria do Funcional da Densidade (DFT), que encontra-se sintetizada no Apêndice B. A fim de fazer uma comparação, os estudos foram feitos tanto empregando a aproximação de densidade local (LDA) com parametrização de Perdew e Wang (1992), PWC, como funcional de troca-correlação, quanto a aproximação generalizada do gradiente com correção da dispersão (GGA+D) e parametrização de Perdew, Burke e Ernzerhof (1996) (PBE).

É sabido que métodos DFT puros são incapazes de descrever com precisão sistemas nos quais ligações não-covalentes são importantes (VAN der WIJST *et al.*, 2006; COOPER *et al.*, 2008; SILVESTRELLI, 2009). Além disso, a LDA não se adequa à descrição de ligação (ponte) de hidrogênio, porém pode ser utilizada no tratamento de sistemas que tratem, por

exemplo, a interação de ligante aromático com uma enzima (KEE *et al.*, 2009), sistemas que envolvem grafite (ORTMANN *et al.*, 2005; ORTMANN *et al.*, 2006) etc, onde interações de van der Waals são relevantes. Já o método semi-empírico GGA+D leva em consideração, além das interações de van der Waals, as ligações de hidrogênio. A correção semi-empírica, das forças de dispersão, implementada na GGA é dada pelo esquema de Tkatchenki e Scheffler (2009) (TS), que representa, até certo ponto, a variação relativa nos parâmetros de dispersão de átomos ligados de maneira diferente (uma descrição mais detalhada é encontrada no Apêndice B). Como alguns dos ligantes possuem uma região hidrofóbica além da região hidrofílica, achou-se por bem utilizar ambos os funcionais LDA e GGA+D.

Para a expansão dos orbitais eletrônicos de Kohn-Sham foi utilizado o conjunto de base *Doble Numerical Plus Polarization* (DNP) levando em consideração explicitamente todos os elétrons do sistema e com spin irrestrito. O conjunto de base DNP é muito preciso possuindo um erro de sobreposição de base (BSSE, sigla em inglês) irrelevante como afirma Delley em seus dois trabalhos (1990, 2000) e Inada e Orita (2008). O raio de corte do orbital foi de 3,7 Å e o limite de convergência do campo auto-consistente foi ajustado para uma variação de energia de até  $10^{-6}$  Ha.

Os cálculos para obtenção das isossuperfícies de potencial eletrostático de cada ligante, assim como de cada ligante com alguns dos principais resíduos atrativos e repulsivos, foram feitos utilizando apenas o funcional GGA+D PBE, pois este se mostrou mais adequado na descrição dos sistemas estudados. Nas superfícies de potencial é possível observar como os elétrons estão distribuídos no sistema estudado. As isossuperfícies de potencial foram construídas de forma que as regiões com densidade de carga mais negativa foram representadas em vermelho e a escalar de cor do arco-íris segue-se até as regiões em azul que possuem densidade de carga positiva.

As energias obtidas por meio dos cálculos são referentes à soma das energias: de repulsão dos prótons, repulsão elétron-elétron, atração elétron-próton, que são explicadas pelas leis da eletricidade clássica, juntamente com as duas correções quânticas (energias de troca e correlação). Aplicando o MFCC, a energia encontrada é, então, apenas a energia de interação do resíduo de interesse com o ligante.

---

**REFERÊNCIAS**

ALLEN, M. P.; TILDESLEY, D. J. **Computer Simulation of Liquids**, London: Clarendon Press, Oxford Science Publications, 1987.

ARMSTRONG, N; GOUAUX, E. Mechanisms for activation and antagonism of an AMPA-sensitive glutamate receptor: crystal structures of the GluR2 ligand binding core. **Neuron**, vol. 28, p. 165-181, 2000.

CHEN, X.; ZHANG, Y.; ZHANG, J. Z. H. An efficient approach for *ab initio* energy calculation of biopolymers. **J. Chem. Phys.**, vol. 122, p. 184105(1-5), 2005.

CHESLER, M. Regulation and Modulation of pH in the Brain. **Physiol. Rev.**, vol. 83, p. 1183-1221, 2003.

COOPER, V. R.; THONHAUSER, T.; LANGRETH, D. C. An application of the van der Waals density functional: Hydrogen bonding and stacking interactions between nucleobases. **J. Chem. Phys.**, vol. 128, p. 204102(1-4), 2008.

CREIGHTON, T. E. **Proteins: Structures and Molecular Properties**, 2nd ed. New York: W.H. Freeman & Co., 1993.

DAUBER-OSGUTHORPE, P.; ROBERTS, V. A.; OSGUTHORPE, D. J.; WOLFF, J.; GENEST, M.; HAGLER, A. T. Structure and energetics of ligand binding to proteins: *E. coli* dihydrofolate reductase-trimethoprim, a drug-receptor system. **Proteins: Struct., Function Genetics**, vol. 4, p. 31-47, 1988.

DELLEY, B. An all-electron numerical method for solving the local density functional for polyatomic molecules. **J. Chem. Phys.**, vol. 92, p. 508-517, 1990.

DELLEY, B. From molecules to solids with the DMol3 approach. **J. Chem. Phys.**, vol. 113, p. 7756-7764, 2000.

GAO, A. M.; ZHANG, D. W.; ZHANG, J. Z. H.; ZHANG, Y. An efficient linear scaling method for *ab initio* calculation of electron density of proteins **Chem. Phys. Lett.**, vol. 394, p. 293-297, 2004.

HE, X.; ZHANG, J. Z. H. A new method for direct calculation of total energy of protein. **J. Chem. Phys.**, vol. 122, p. 031103(1-4), 2005.

INADA, Y.; ORITA, H. Efficiency of Numerical Basis Sets for Predicting the Binding Energies of Hydrogen Bonded Complexes: Evidence of Small Basis Set Superposition Error Compared to Gaussian Basis Sets. **J. Comp. Chem.**, vol. 29, p. 225-323, 2008.

KEE, E. A.; LIVENGOOD, M. C.; CARTER, E. E.; MCKENNA, M.; CAFIERO, M. Aromatic Interactions in the Binding of Ligands to HMGCoA Reductase. **J. Phys. Chem. B**, vol. 113, p. 14810-14815, 2009.

LIFSON, S.; HAGLER, A. T.; STOCKFISCH, J. P. Consistent Force Field Studies of Intermolecular Forces in Hydrogen-Bonded Crystals. 1. Carboxylic Acids, Amides, and the C=O-H- Hydrogen Bonds. **J. Am. Chem. Soc.**, vol. 101, p. 5111-5121, 1979.

MARTINS, A. C. V. **Explicando *Ab initio* a Intensidade de Ativação e Antagonismo do Receptor Glutamatérgico GluR2**. 2012. 168 p. Dissertação (Mestrado em Química), Programa de Pós-Graduação em Química, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2012.

ORTMANN, F.; SCHMIDT, W. G.; BECHSTEDT, F. Attracted by Long-Range Electron Correlation: Adenine on Graphite. **Phys. Rev. Lett.**, vol. 95, p. 186101(1-4), 2005.

ORTMANN, F.; BECHSTEDT, F.; SCHMIDT, W. G. Semiempirical van der Waals correction to the density functional description of solids and molecular structures. **Phys. Rev. B**, vol. 73, p. 205101(1-10), 2006.

PERDEW, J. P.; WANG, Y. Pair-distribution function and its coupling-constant average for the spin-polarized electron gas. **Phys. Rev. B**, vol. 46, p. 12947-12954, 1992.

PERDEW, J. P.; BURKE, K.; ERNZERHOF, M. Generalized Gradient Approximation Made Simple. **Phys. Rev. Lett.**, vol. 77, p. 3865-3868, 1996.

RCSB PDB-101. **Looking at Structures: Missing Coordinates and Biological Assemblies**. Disponível em [http://www.rcsb.org/pdb/101/static101.do?p=education\\_discussion/Looking-at-Structures/missing.html](http://www.rcsb.org/pdb/101/static101.do?p=education_discussion/Looking-at-Structures/missing.html) Acesso em 28 fev. 2012.

SILVESTRELLI, P. L. Van der Waals Interactions in Density Functional Theory Using Wannier Functions. **J. Phys. Chem. A**, vol. 113, p. 5224-5234, 2009.

TKATCHENKO, A.; SCHEFFLER, M. Accurate Molecular Van DerWaals Interactions from Ground-State Electron Density and Free-Atom Reference Data. **Phys. Rev. Lett.**, vol. 102, p. 073005(1-4), 2009.

VAN der WIJST, T.; GUERRA, C. F.; SWART, M.; BICKELHAUPT, F. M. Performance of various density functionals for the hydrogen bonds in DNA base pairs. **Chem. Phys. Lett.**, vol. 426, p. 415-421, 2006.

WU, E. L.; MEI, Y.; HAN, K. L.; ZHANG, J. Z. H. Quantum and Molecular Dynamics Study for Binding of Macrocyclic Inhibitors to Human  $\alpha$ -Thrombin. **Biophys. J.**, vol. 92, p. 4244-4253, 2007.

ZHANG, D. W.; ZHANG, J. Z. H. Molecular fractionation with conjugate caps for full quantum mechanical calculation of protein-molecule interaction energy. **J. of Chem. Phys.**, Vol. 119, p. 3599-3605, 2003.



# CAPÍTULO 3

**Resultados e Discussões:  
Explicando *Ab Initio*  
a Intensidade de Ativação  
e Antagonismo do Receptor  
Glutamatérgico GluR2**

---





**T**irando toda vantagem dos dados de raios-X do receptor ionotrófico glutamatérgico GluR2 co-cristalizado com os agonistas totais AMPA e glutamato, o agonista parcial cainato e o antagonista DNQX, descreve-se neste capítulo a ancoragem dos mesmos no sítio de ligação comum através de cálculos realizados no escopo da bioquímica quântica. O balanço atração/repulsão entre os principais resíduos da GluR2 que interagem com AMPA, glutamato, cainato e DNQX é quantificado, e a energia total de ligação para cada um é obtida com base na teoria do funcional da densidade (DFT). Obtém-se que a intensidade de ativação e antagonismo segue a ordem AMPA > glutamato > cainato > DNQX somente quando um raio do sítio de ligação suficientemente grande é considerado, o que explica dados experimentais publicados sobre a ativação e antagonismo do receptor glutamatérgico GluR2.

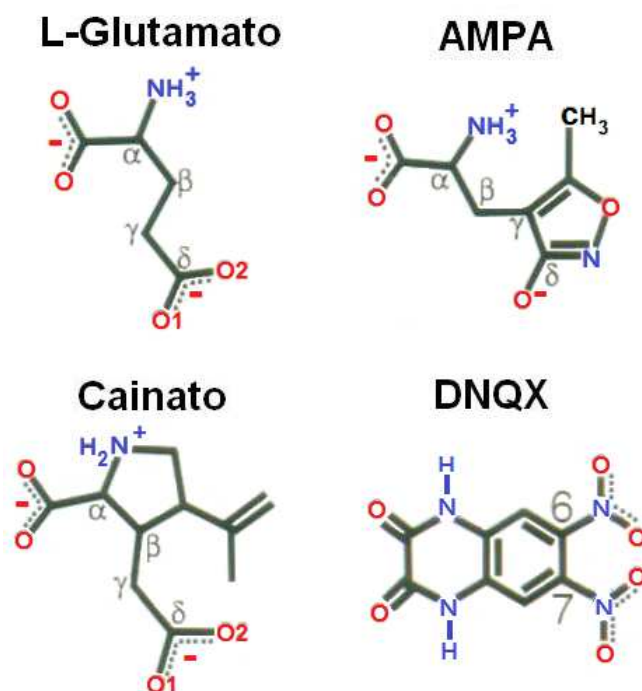
### 3.1 Estrutura dos ligantes no pH fisiológico

O estudo da estrutura dos ligantes na faixa de pH de 0 a 14 é visto como necessário para o desenvolvimento do trabalho, pois, dos ligantes em questão, três são aminoácidos e o quarto possui dois grupos lactama (amida cíclica) com hidrogênios ionizáveis, apresentando, assim, diferentes formas estruturais e estados de protonação em função do pH do meio. Deste modo, é necessário, para uma melhor representação do sistema estudado, confirmar, por meio de cálculos teóricos, se as estruturas dos ligantes apresentadas por Armstrong e Gouaux (2000) são realmente as mais abundantes no pH extracelular cerebral, que é igual a 7,3. Na Figura 3.1 estão os compostos e suas estruturas de acordo com Armstrong e Gouaux (2000).

Comparando a estrutura fornecida pela referência (Fig. 3.1) e a obtida por cálculo para o glutamato no pH 7,3, apresentada na Figura 3.2, observa-se que o resultado é equivalente à estrutura sugerida pelos autores. Da mesma forma, ambos os resultados computacionais para cainato, K4, e DNQX, D1, (Fig. 3.2) confirmam as estruturas mencionadas pela referência.

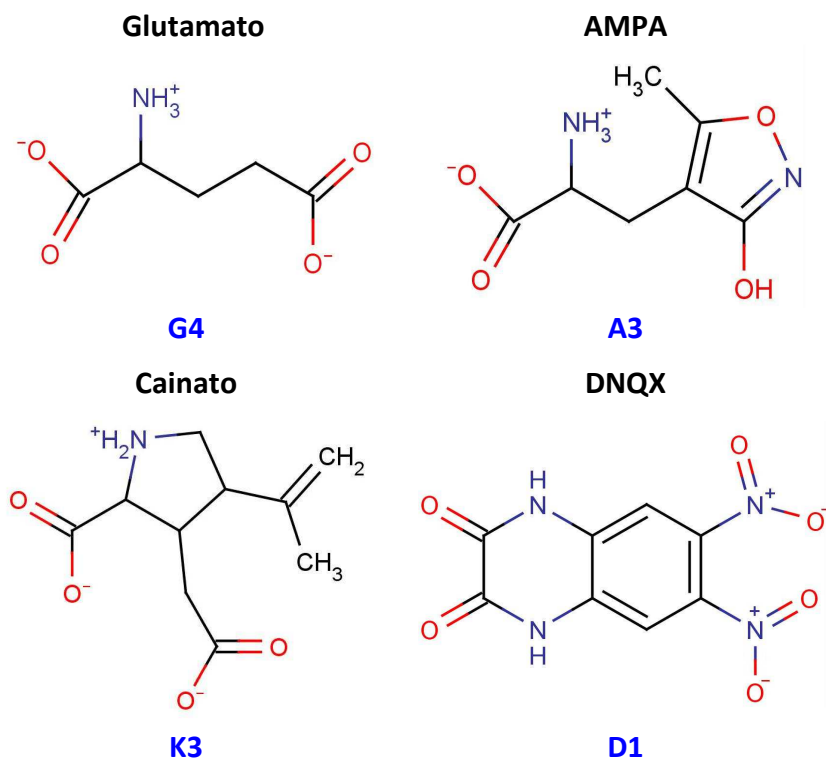
Já para o AMPA, no mesmo pH de 7,3, de acordo com o cálculo, a estrutura mais abundante seria a A4, enquanto Armstrong e Gouaux (2000) sugerem a estrutura A5 como visto nas Figuras 2.5 e 3.1. Embora no pH de 7,3 a estrutura A5 também esteja presente, sua fração molar é muito pequena comparada à da estrutura A4, podendo ser desconsiderada. A divergência entre estas duas estruturas deve-se ao fato de o oxigênio ligado à cadeia cíclica estar protonado em A4 e desprotonado em A5 (Fig. 3.1 e 3.2).

Figura 3.1 – Estrutura química do glutamato, AMPA, cainato e DNQX.



Fonte: Armstrong e Gouaux, 2000.

Figura 3.2 – Estado de protonação dos ligantes obtidas pelo o Marvin Sketch 5.3.2 para o pH 7,3.



Fonte: Martins, 2012.

Observando a divergência entre a protonação sugerida e a obtida pelo programa Marvin Sketch 5.3.2, buscou-se na literatura os dados de pKa dos quatro ligantes, porém os únicos encontrados foram os do glutamato. Na Tabela 3.1 é apresentado os pKa obtidos pelo programa Marvin Sketch 5.3.2 para os 4 ligantes e os pka obtidos experimentalmente para o glutamato. Sem ter resultados experimentais para o AMPA, pode-se apenas especular seus valores reais tendo como referências os valores obtidos por via computacional.

Tabela 3.1 – Valores de pKa para os ligantes obtidos experimentalmente apenas para o glutamato (\*), e a partir do programa Marvin Sketch 5.3.2. (as letras gregas  $\alpha$  e  $\gamma$  indicam a que carbono da estrutura os grupos carboxílicos estão ligados).

	Glutamato*	Glutamato	AMPA	Cainato	DNQX
<b>pKa<sub>1</sub></b>	2,19 (CO <sub>2</sub> H) $\alpha$	1,96 (CO <sub>2</sub> H) $\alpha$	1,65 (CO <sub>2</sub> H)	1,83 (CO <sub>2</sub> H) $\alpha$	9,56 (NH)
<b>pKa<sub>2</sub></b>	4,25 (CO <sub>2</sub> H) $\gamma$	4,27 (CO <sub>2</sub> H) $\gamma$	8,26 (NH <sub>2</sub> )	4,48 (CO <sub>2</sub> H) $\gamma$	12,01 (NH)
<b>pKa<sub>3</sub></b>	9,67 (NH <sub>2</sub> )	9,23 (NH <sub>2</sub> )	8,97 (OH)	11,21 (NH <sub>2</sub> )	-

Fonte: Martins, 2012; \*Nelson, Cox, 2009.

Devido aos ajustes que o programa Marvin Sketch 5.3.2 faz, percebe-se uma divergência razoável entre o valor experimental e o computacional para o pKa<sub>1</sub> do glutamato. Essa divergência ocorre devido à complexidade da molécula e aos ajustes realizados pelo programa computacional. Da mesma forma, o AMPA é uma molécula complexa, pois apresenta tautomerismo,  $N-C=O \cdots H_3N^+ \rightarrow N=C-O-H \cdots H_2N$ , ressonância  $N=C-O^- \leftrightarrow N^- -C=O$ , efeito indutivo pelos grupos N-O do anel, além de existir em muitos estados conformacionais. Assim, possivelmente a estrutura A7 não tem população maior que a sugerida pelo programa Marvin Sketch 5.3.2. Isto significa que no artigo original de Armstrong e Gouaux (2000) se considerou o estado de protonação com menor população, o que pode acarretar problemas na interpretação da interação entre o AMPA e a GluR2.

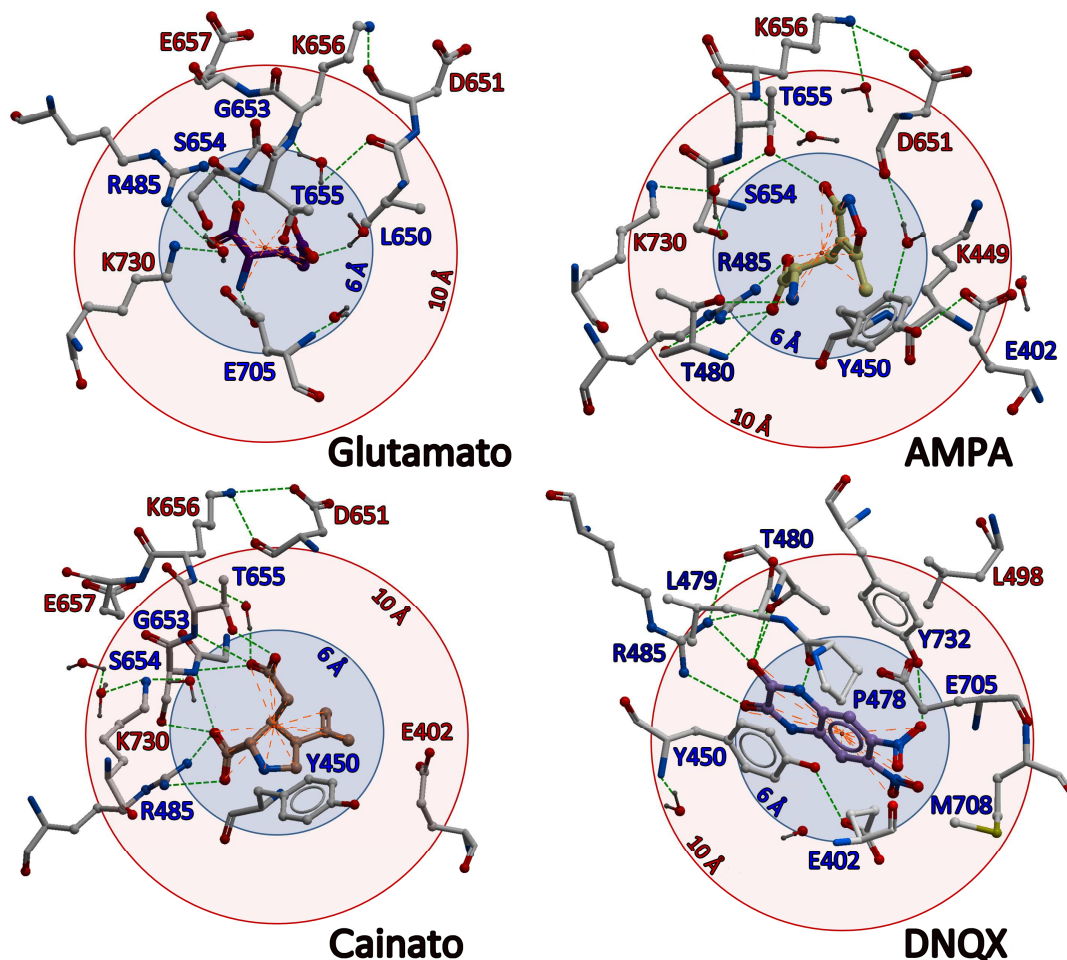
No entanto, a forma mais segura de determinar o estado de protonação das moléculas no pH de interesse é medir experimentalmente os pKa. Na ausência de tal medição, decidiu-se nesta dissertação se trabalhar apenas com o estado de protonação do AMPA que foi considerado por Armstrong e Gouaux (2000). Porém um estudo experimental do pKa de todos os ligantes deve ser realizado para confirmar as protonações no pH de interesse. Um estudo da interação entre o AMPA no estado de protonação que determinamos ser o mais provável (obtido teoricamente por simulação com o programa Marvin Sketch 5.3.2) com a GluR2 será

realizado posteriormente no escopo do desenvolvimento das perspectivas da presente dissertação.

### 3.2 Resíduos próximos e pós-próximos

Para a análise da interação GluR2-ligante foi estudado tanto os resíduos próximos como os pós-próximos do sítio de ligação. Com base nos dados cristalográficos restritos, as interações fundamentais ocorrem entre os agonistas e os resíduos Arg485, Pro478, Thr480, Ser652, Ser654, Thr655 e Glu705 da proteína. E com relação ao antagonista DNQX, as interações importantes acontecem com os resíduos Arg485, Tyr450, Pro478, Thr480, Thr686 e Tyr732 (ARMSTRONG, *et al.*, 1998; ARMSTRONG, GOUAUX, 2000).

Figura 3.3 – Ilustração do sítio de interação da GluR2 com os ligantes e alguns dos resíduos próximos e pós-próximos. Em azul, estão os resíduos que pertencem ao raio de 6 Å e em vermelho, resíduos pertencentes ao raio de 10 Å.



Fonte: Martins, 2012.

Na Figura 3.3 são mostrados alguns resíduos próximos (raio de 6 Å em azul) e outros resíduos pós-próximos (raio de 10 Å em vermelho) que se mostraram importantes para cada sistema. Em todos os sistemas resíduos próximos não-carregados são relevantes, porém apenas para o DNQX um resíduo pós-próximo não-carregado mostrou-se importante, enquanto que para os outros ligantes resíduos mais distantes só têm relevância se forem carregados positivamente ou negativamente.

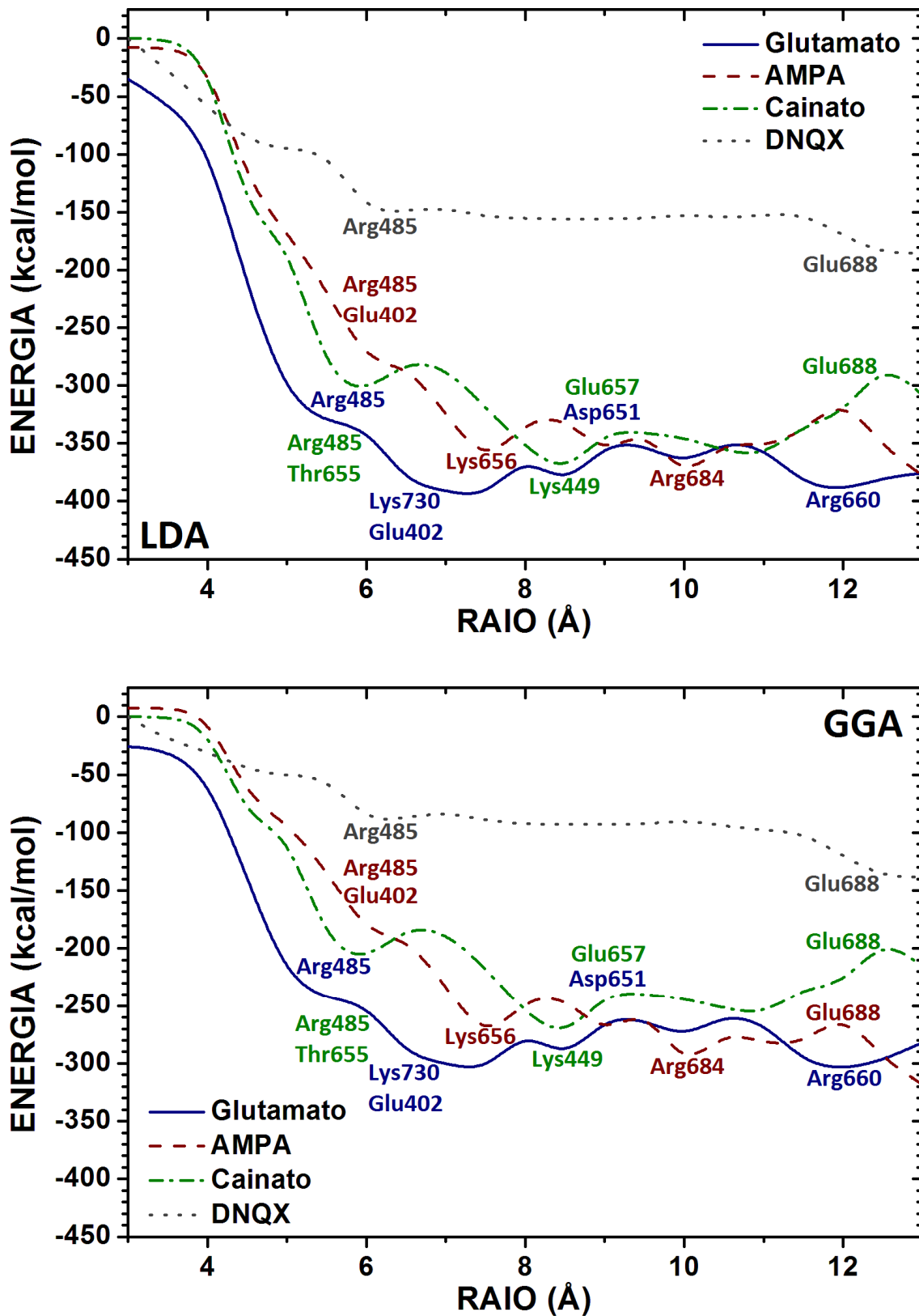
### 3.3 Energia de interação GluR2-ligante variando o raio

Partindo do conhecimento prévio, supõe-se que para causar um maior encerramento do DIL o ligante deve interagir mais fortemente com os resíduos deste domínio causando seu encerramento. Desta forma, a interação do glutamato e do AMPA com a proteína deve ser superior à interação da proteína com o cainato que por sua vez deve ser superior à interação dela com o DNQX. O DIL possui 258 resíduos (para o sistema com DNQX são 257) e aplicar o MFCC para todos os resíduos teria um alto custo computacional. Assim, fez-se o estudo da energia variando-se o raio de interação até se observar a convergência dos valores.

Os resultados são apresentados na Figura 3.4 que mostra a energia de interação total GluR2-ligante para os quatro ligantes estudados tanto com o funcional LDA como com o funcional GGA+D em função do raio de interação que varia de 3 Å a 13 Å. A energia de interação de cada raio é determinada somando-se a energia de interação resíduo-ligante, de cada resíduo presente no raio. Deve-se ressaltar que todos os resultados de energia de interação que serão apresentados consideram a blindagem de barreira.

Analisando a Figura 3.4 buscou-se um raio de interação que representasse bem o sistema por meio da energia total de interação proteína-ligante. O que se espera, fazendo um paralelo com a eficácia relativa de cada ligante em parênteses, é a seguinte sequência de energias (lembrando que quanto mais negativa é a energia de interação, maior é a interação de atração entre a proteína e o ligante): glutamato (100%)  $\leq$  AMPA (88%)  $<$  cainato (21%)  $<$  DNQX (0%) (PØHSGAARD *et al.*, 2011). A partir do raio de 4,5 Å a energia de interação GluR2-DNQX torna-se a menos negativa tanto para funcional LDA quanto com o GGA+D, ou seja sua interação a partir desse raio fica sendo a menor, corroborando com sua ação de antagonismo sobre a proteína. Por interagir mais brandamente com a proteína, o DNQX causa um encerramento menor do domínio S1S2.

Figura 3.4 – Gráfico da Energia x Raio de interação para os 4 ligantes para ambos os funcionais LDA e GGA.



Fonte: Martins, 2012.

Com relação aos três agonistas, espera-se, como dito previamente, que a interação dos agonistas totais glutamato e AMPA com a GluR2 seja maior que a interação do cainato, agonista parcial, com a proteína. Analisando a Figura 3.4, para o glutamato, utilizando ambos os funcionais, as energias de interação obtidas para os diferentes raios são inferiores à do cainato, corroborando com o esperado. Já para a interação GluR2-AMPA, avaliando os resultados obtidos com a LDA a energia de interação só fica mais negativa que para GluR2-cainato nos raios de 7 e 7,5 Å, de 9,5 e 10 Å e de 12,5 e 13 Å. Para o GGA+D a interação da proteína com o AMPA é maior que com o cainato para o intervalo de 6,5 a 7,5 Å e para os raios de 9 a 13 Å. Assim conclui-se que uma melhor descrição do sistema, em geral, é feita pelo o funcional GGA+D, em particular, ao que se diz respeito às energias de interação da proteína com os três agonistas.

Outra informação apresentada na Figura 3.4 é os resíduos mais relevantes para alguns raios de interação. Observando os resíduos apresentados, percebe-se que todos, com exceção da Thr655 que é relevante no raio de 5,5 Å para o cainato, são carregados quer positiva, quer negativamente. Outro aspecto perceptível é que, dependendo do ligante, o mesmo resíduo pode encontrar-se em um raio de interação diferente, pois este é determinado a partir do centroide do ligante. O principal resíduo para a interação proteína-ligante é a Arg485. Para os sistemas do glutamato e do cainato ela se encontra no raio de 5,5 Å e para os outros dois ligantes ela encontra-se no raio de 6 Å. Esse detalhe indica o porquê de a interação GluR2-cainato ser inicialmente mais forte que a interação GluR2-AMPA.

Outros trabalhos da literatura também apresentaram valores para a energia de interação GluR2-glutamato e GluR2-AMPA. Speranskiy e Kurnikova (2005) em seu estudo de dinâmica molecular calcularam a energia de interação da GluR2 com o glutamato obtendo um valor de  $-12,98 \pm 3,91$  kcal/mol e comparando com um valor experimental de  $-8,62 \pm 0,28$  kcal/mol (Tab. 1.2). Embora Speranskiy e Kurnikova (2005) afirmem ter retirado a informação do valor experimental do trabalho de Deming *et al.* (2003) não foi possível localizar tal informação no trabalho mencionado. Já em um estudo mais recente com mecânica quântica (VIJAYAN *et al.*, 2010) a energia de interação obtida para GluR2-glutamato foi de  $-179,86$  kcal/mol. Em um terceiro trabalho a energia obtida para o mesmo sistema foi de  $-380,13$  kcal/mol e a energia de interação GluR2-AMPA de  $-327,93$  kcal/mol (SAHAI, BIGGIN, 2011).



Tabela 3.2 – Resíduos por raio de interação - Parte 1.

LIGANTE   r→	3.0 Å	3.5 Å	4.0 Å	4.5 Å	5.0 Å	5.5 Å	6.0 Å					
Glutamato	S654	E705▲	L650▲	Y450	P478	T480	G653	T655	Y732	R485	L479	M708
AMPA	E705	—	Y732	Y450	P478	T480	L650	S654	—	T655◀	L479	G653
Cainato	—	—	M708	Y450	L650	G653	S654	E705▼	—	P478	T480	R485
DNQX	—	E705	Y450▶	Y732	T480	—	—	—	—	E402▶	—	—
LIGANTE   r→	6.0 Å	6.5 Å	7.0 Å	7.5 Å	8.0 Å	8.5 Å	9.0 Å	9.5 Å	10.0 Å			
Glutamato	S652	E402▲	L498	L498	T686▶	Y702	T686▲	K656▲	L704	L704	—	—
AMPA	E402◀	R485	T686◀	L704	T707	—	—	—	—	K730▶	—	—
Cainato	L479	S652	—	E402	T686	—	—	—	—	Y702▶	—	—
DNQX	L479	R485	M708	L498	L498	T686▶	—	—	—	L650	T707	K730
LIGANTE   r→	7.5 Å	8.0 Å	8.5 Å	9.0 Å	9.5 Å	10.0 Å						
Glutamato	G451▲	M463	I500	T482	E657	Y702	T707	—	—	Y405	K449	I481▲
AMPA	Y405	M463	I500	G451	D651◀	S652	L703	S706	S706	A477◀	T482◀	T649
Cainato	K656▼	L704	—	Y405	G451▼	M463	L498	K730▼	—	K449	A477	T685
DNQX	S654▶	L704	—	M463	—	—	—	—	—	G451▶	A477	T655▶
LIGANTE   r→	9.0 Å	9.5 Å	10.0 Å									
Glutamato	D651	F658	T685	L703	G731	A452	V464	F491	S706	G733	—	—
AMPA	K449	I481◀	G499	G731	S501	E657◀	N709	—	—	—	—	—
Cainato	I500	T649	E657▶	L703▼	G448	I481	D651	R684	—	—	—	—
DNQX	K449	Y702	S706	—	S403▶	G448▶	I481	T482▶	F495	S652	N709	G731
LIGANTE   r→	10.0 Å											
Glutamato	G448▲	F495	G499	S501	V683	R684	—	—	—	—	—	—
AMPA	S403	G448◀	V464	F495	M496	F658◀	V683	R684	A687◀	G733	W767	—
Cainato	L401	A452	F658	V683	S706	N709	G731	—	—	—	—	—
DNQX	P404	G499	I500	T685▶	A687▶	G733	—	—	—	—	—	—

Glutamato: E705▼=E705(wt90); L650▲=L650(wt69); E402▲=E402(wt36); K656▲=K656(wt22); T686▲=T686(wt92); K730▲=K730(wt94); G451▲=G451(wt88); I481▲=I481(wt14); G448▲=G448(wt48,wt64).  
 AMPA: L650◀=L650(wt135); T655◀=T655(wt134); E402◀=E402(wt3); T686◀=T686(wt31); K730◀=K730(wt137); K656◀=K656(wt138); Y702◀=Y702(wt136); D651=D651(wt96,wt139); A477◀=A477(wt100); T482◀=T482(wt88); I481◀=I481(wt1,wt105); E657◀=E657(wt140); G448◀=G448(wt43,wt58); F658◀=F658(wt103); A687◀=A687(wt68).  
 Cainato: E705▼=E705(wt52); Y702▼=Y702(wt45); K656▼=K656(wt2); G451▼=G451(wt4); K730▼=K730(wt12,wt27); T482▼=T482(wt13); E657▼=E657(wt78); L703▼=L703(wt31).  
 DNQX: Y450▶=Y450(wt26,wt137); E402▶=E402(wt193,wt173); T686▶=T686(wt47); Y405▶=Y405(wt123); S654▶=S654(wt147,wt162); G451▶=G451(wt39,wt180); T655▶=T655(wt164); S403▶=S403(wt46,wt130,wt152); G448▶=G448(wt54,wt172); T482▶=T482(wt3); T685▶=T685(wt110); A687▶=A687(wt16,wt89).

Fonte: Martins, 2012.

Tabela 3.3 – Resíduos por raio de interação - Parte 2.

↓ LIGANTE   r →	10.5 Å									11.0 Å									
Glutamato	V445	G462	N709	D728▲	—	—	—	—	—	S403▲	W460	M496	F659	A687▲	—	—	—	—	—
AMPA	P404	A452	F491	F659	D728◄	—	—	—	—	L401◄	V445	G462◄	G689	V690	Y711	—	—	—	—
Cainato	S403	V445▼	V464	F491	G449	S601	A687	G733	G462	F495	W767	—	—	—	—	—	—	—	—
DNQX	L401►	V445	A452	F491	M496	L703►	—	—	C425	G462	V464	S501	K656►	V690	Y711	I712	—	—	—
↓ LIGANTE   r →	11.5 Å																		
Glutamato	L401▲	P404	N461	A475	V484	I489	R660	F682	W767	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
AMPA	T399	C425	S497	M503	G648	E710◄	I712	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Cainato	P404	N461	M496	F682	E688	G689	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
DNQX	T399	V406►	S497►	T649	R684►	E710►	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
↓ LIGANTE   r →	12.0 Å																		
Glutamato	T399	C425	I476	S497	G136	G689	V690	A735	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
AMPA	V406	N461◄	A475	I476	F682	E688	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Cainato	T399	V406	C425	W460	A475▼	I476	V484▼	F659	V690	Y711	I712	D728	—	—	—	—	—	—	—
DNQX	N461	A475►	I476	M503	V683	E688	G689	D728	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
↓ LIGANTE   r →	12.5 Å																		
Glutamato	V406	R453▲	G465	L483	M503	E688	E710▲	Y711	I712	L727	S729	T398	D447	P494▲	I734	—	—	—	—
AMPA	Y424	W460◄	V484◄	I489	R660◄	N726	L727	S729◄	A735	—	—	P494	I502	I734	K763◄	—	—	—	—
Cainato	D447	M503	G648	E710	—	—	—	—	—	—	—	I489	S497	R660	A735	—	—	—	—
DNQX	Y424	W460	V484	D651	E657	K763►	—	—	—	—	—	D447	I489	F658	S729	I734	A735	—	—

Glutamato: D728▲=D728(wt38); S403▲=S403(wt5); A687▲=A687(wt75); L401▲=L401(wt51, wt79); R453▲=R453(wt31); E710▲=E710(wt15); P494▲=P494(wt62, wt69).

AMPA: D728◄=D728(wt29); L401◄=L401(wt46, wt73); G462◄=G462(wt48); E710◄=E710(wt12); N461◄=N461(wt14); W460◄=W460(wt33); V484◄=V484(wt102, wt365); R660◄=R660(wt125); S729◄=S729(wt20); K763◄=K763(wt61).

Cainato: V445▼=V445(wt68); A475▼=A475(wt1); V484▼=V484(wt56).

DNQX: L401►=L401(wt125); L703►=L703(wt17); K656►=K656(wt161); V406►=V406(wt75); S497►=S497(wt68); R684►=R684(wt90); E710=◄=E710(wt118); A475►=A475(wt85); V484►=V484(wt156, wt185); K763►=K763(wt76).

Fonte: Martins, 2012.

As energias de interação GluR2-ligante obtidas pelo MFCC com a abordagem da DFT e funcionais LDA PWC e GGA+D PBE (Fig. 3.4) estão em outra ordem de grandeza das obtidas por dinâmica molecular. Para o sistema GluR2-glutamato, considerando a partir do raio de 6,5 Å, quando há uma convergência dos valores para ambos funcionais, para LDA a energia de interação varia entre -400 kcal/mol e -350 kcal/mol. Já para o GGA, partindo do mesmo raio, a energia de interação GluR2- glutamato varia de -310 kcal/mol a -260 kcal/mol. Já para o sistema GluR2-AMPA, partindo do raio de 7 Å, quando os valores de energia de interação começam a convergir para ambos funcionais, para LDA tem-se energias de -380 kcal/mol a -320 kcal/mol. Para os cálculos usando o GGA, a energia varia de -320 kcal/mol a -240 kcal/mol. Os valores se mostram razoáveis, se comparados aos obtidos por cálculos DFT para os mesmos sistemas GluR2-glutamato e GluR2-AMPA (SAHAI, BIGGIN, 2011). Porém não há como comparar a valores experimentais, pois ainda não há uma metodologia experimental capaz de medir a interação receptor-ligante.

Outra informação interessante é que a energia de interação só passa a se estabilizar em raios superiores a 6,5 Å para o sistema GluR2-glutamato. Já para o sistema GluR2-AMPA a convergência começa a partir de 7 Å, para GluR2-cainato inicia a partir de 8 Å e para o sistema GluR2-DNQX a energia de interação se estabiliza a partir de 6 Å. Em todos os sistemas, observa-se uma variação na energia de interação brusca para raios superiores a 12 Å. Essa variação brusca deve-se à interação dos ligantes com resíduos carregados presentes nesses raios. A tal distância, a interação dos ligantes, mesmo que com resíduos carregados, não deveria ser tão intensa e mesmo a blindagem de barreira não se mostrou eficiente em reduzir a interação. Dessa forma, sugere-se que o estudo com a constante dielétrica do meio deve ser feito, esperando que esta possa aproximar as energias de interação de valores mais reais.

As Tabelas 3.2 e 3.3 mostram os resíduos considerados para cada sistema e a que raio de interação eles pertencem indo desde 3 Å até 13 Å. Relembrando que o raio de interação a que cada resíduo pertence é determinado de acordo com a distância do resíduo ao centroide do ligante. Os resíduos com cor azul possuem carga positiva, os em vermelho possuem carga negativa e aqueles em negrito são os mais relevantes para a interação da proteína com o ligante em questão. Os triângulos sinalizam os resíduos aos quais se anexaram moléculas de água, que são determinadas na legenda abaixo das Tabelas.

### 3.4 Relevância da blindagem de resíduos pós-próximos

Os estudos iniciais do trabalho foram feitos com o funcional LDA PWC, e mostraram energias de interação muito relevantes para resíduos carregados, mesmo que distantes do ligante. Assim, percebeu-se a necessidade de considerar uma blindagem por parte dos resíduos mais próximos. As energias de interação para alguns resíduos carregados que foram blindados podem ser observadas na Tabela 3.4 para os dois casos: com e sem a blindagem.

Analisando os resultados mostrados na Tabela 3.4 percebe que a blindagem, em alguns casos, reduz bastante a interação do resíduo com o ligante, seja essa interação atrativa (-) ou repulsiva (+), chegando a reduzir 52% a interação do glutamato com a Arg684, 72% a interação do cainato com o Asp728 e 99% a interação do DNQX com o Asp728. Para o sistema com o AMPA não se obteve blindagens tão efetivas quanto àquelas obtidas para os outros três sistemas, blindagem máxima de 17% obtida para a interação com o Glu710.

Tabela 3.4 – Energia de interação resíduo-ligante (kcal/mol) obtida com o funcional LDA PWC para os casos com e sem blindagem.

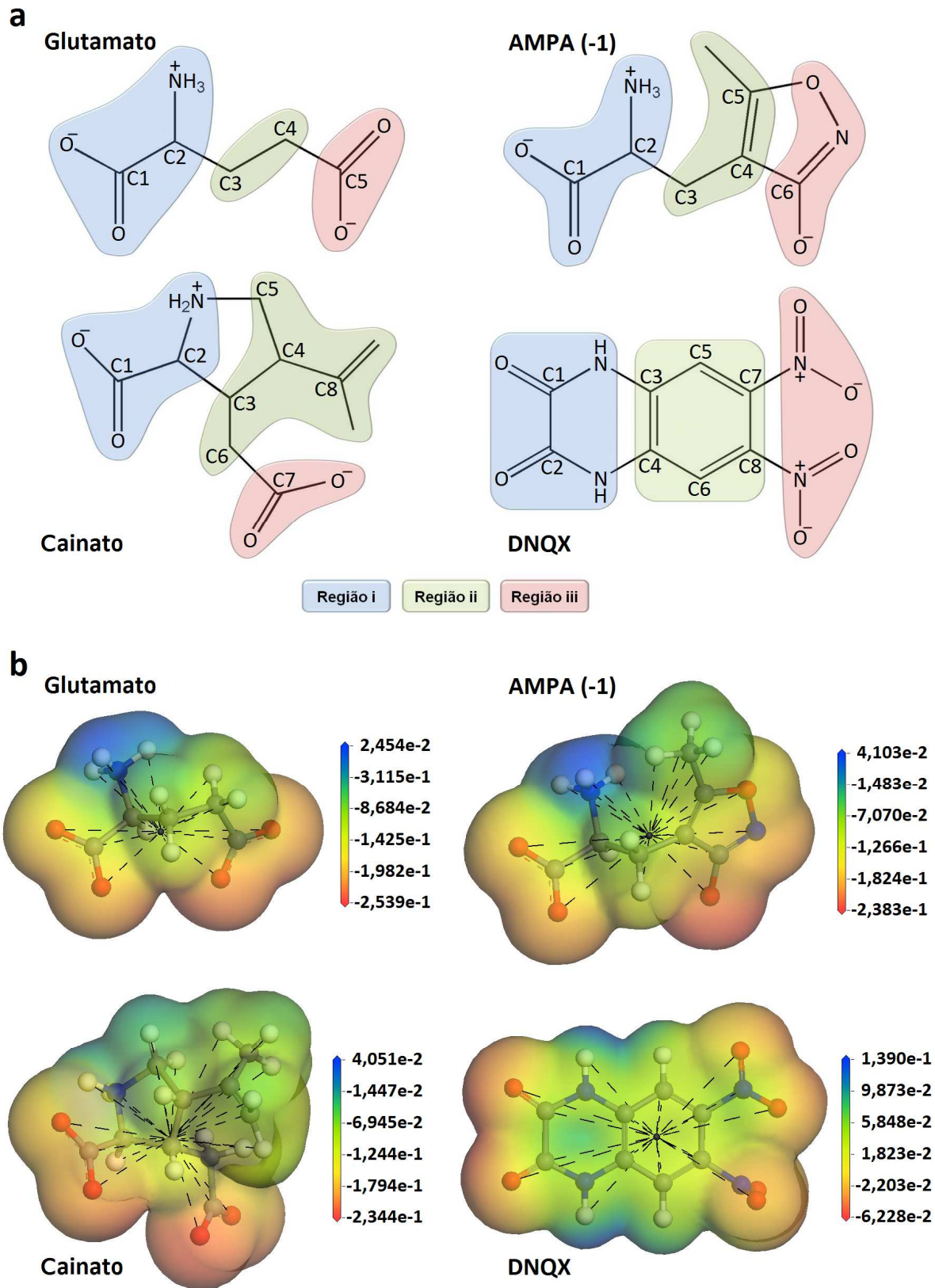
Resíduo	Glutamato		AMPA		Cainato		DNQX	
	Sem blind	Com blind	Sem blind	Com blind	Sem blind	Com blind	Sem blind	Com blind
K449	-40,95	-25,21	-40,50	-35,50	-41,27	-26,42	1,73	1,35
K656	-57,23	-31,34	-48,63	-43,52	-61,79	-29,84	15,34	6,97
E657	40,85	36,16	37,19	31,13	38,32	48,00	-5,17	-5,73
R684	-37,06	-17,89	-38,38	-37,89	-38,91	-30,93	0,12	0,24
E688	27,10	16,75	27,32	30,04	30,55	29,87	-22,73	-14,16
E710	25,01	21,33	26,24	21,75	24,53	25,70	-13,06	5,12
D728	35,75	23,56	34,29	32,55	36,60	10,40	-15,34	0,16
K730	-53,15	-39,06	-45,96	-42,19	-56,13	-24,84	1,73	4,78

Fonte: Martins, 2012.

### 3.5 Energia de interação resíduo-ligante GGA+D

Inicialmente cada sistema GluR2-ligante foi ponderado particularmente e comparado com resultados presentes na literatura para uma melhor análise das interações resíduo-ligante. Posteriormente, fez-se uma análise geral dos sistemas buscando informações acerca do sítio de interação como um todo ou a respeito da relevância de um resíduo específico. Para auxiliar o entendimento da discussão dos resultados, na Figura 3.5 estão (a) as estruturas planares dos ligantes e (b) sua estrutura espacial com o centroide e a superfície de potencial eletrostático.

Figura 3.5 – Ligantes. Em (a) estruturas planares dos ligantes divididas em 3 sub-regiões: regiões i e iii são hidrofílicas e região ii é hidrofóbica. Em (b) superfícies de potencial eletrostático e o centroide dos ligantes.



Fonte: Martins, 2012.

Os dados obtidos para alguns dos principais resíduos presentes no raio de 10 Å são apresentados nos painéis BIRD (acrônimo dos termos em inglês para: sítio de ligação, energia de interação e domínio de resíduos) nas Figuras 3.6 a 3.9. Esses painéis mostram claramente: (i) a energia de interação (em kcal / mol) de cada ligante com cada resíduo no sítio de ligação, retratado usando barras horizontais, a partir do qual se pode avaliar quantitativamente a relevância de cada resíduo no sítio de ligação, quer atraindo ou repelindo o ligante; (ii) alguns dos resíduos mais importantes que contribuem para a ligação, que são mostrados na coluna de resíduos no lado esquerdo; (iii) a região (i, ii e iii) dos ligantes, mais próxima de cada resíduo; (iv) o raio a que cada resíduo pertence, o qual é determinado a partir do centroide de cada ligante; (v) a distância do ligante ao resíduo, considerando os átomos mais próximos de ambos; (vi) se há ou não moléculas de água anexadas ao resíduo em questão e caso haja, quais são.

### 3.5.1 Análise da interação *GluR2*-glutamato

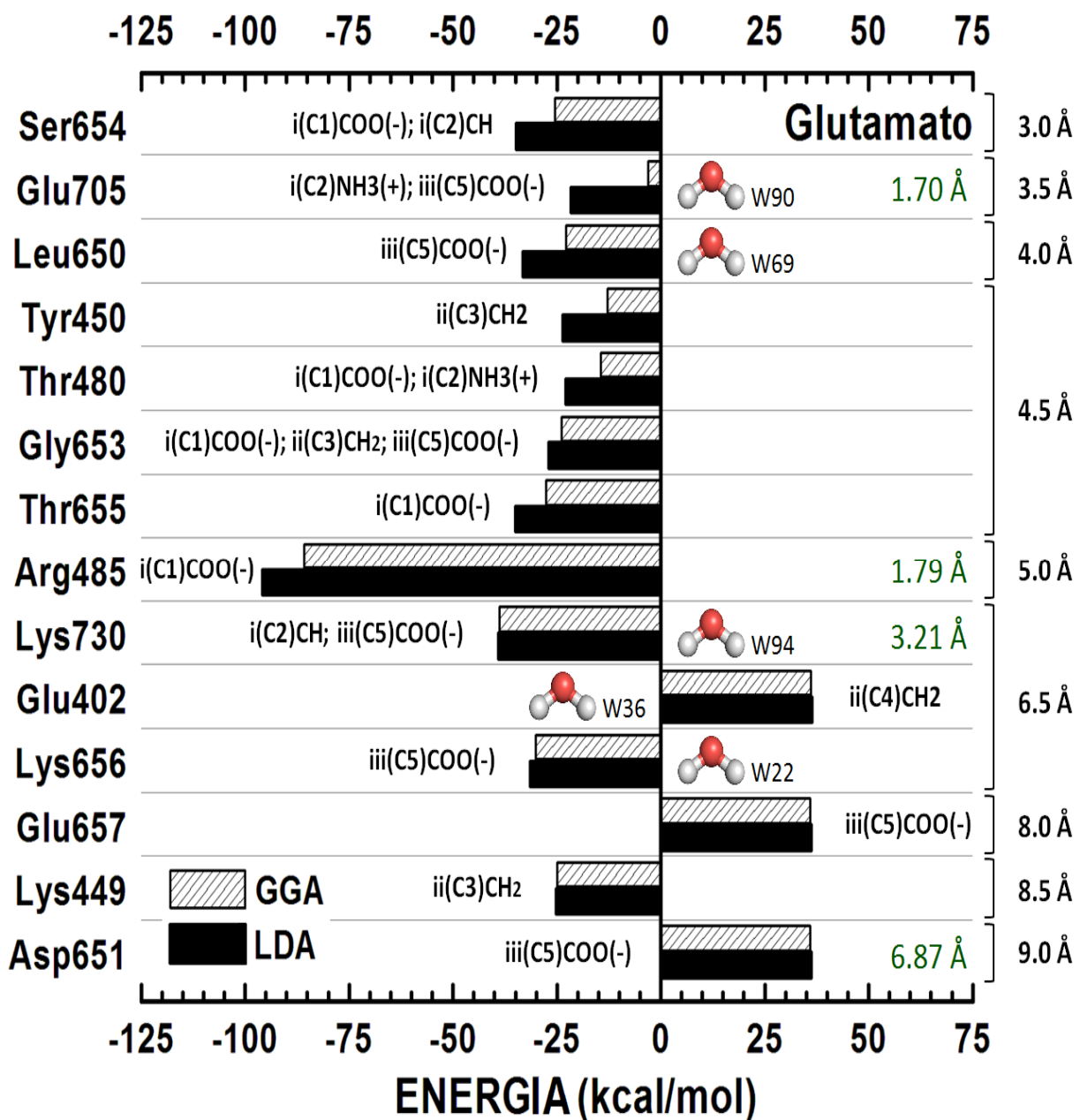
Armstrong e Gouaux (2000) co-cristalizaram a *GluR2* com glutamato. Com a análise de seus dados cristalográficos eles afirmam que a Arg485 é a principal ancora para o grupo i(C1)COO(-) do ligante e o grupo NH da cadeia principal da Thr480 e da Ser654 fornecem ligações de hidrogênio adicionais. Os resultados apresentados na Figura 3.6 revelam que a interação do glutamato com a Arg485, -85,86 kcal/mol, é a mais importante interação atrativa deste sistema, consolidando, por meio de base quântica, a análise dos autores a respeito deste resíduo. Um resultado igualmente positivo foi o obtido para a interação do glutamato com a Ser654, -25,47 kcal/mol, que se mostra entre os principais resíduos atrativos. Em contrapartida, a interação do grupo NH da Thr480 com o i(C1)COO(-) não se destaca tanto, apresentado uma energia de interação de -14,51 kcal/mol.

Armstrong e Gouaux (2000) também ressaltam os resíduos Glu705, Pro478, Thr655. Os resultados alcançados mostram dentre as interações atrativas mais fortes a Lys730 via ii(C2)CH intermediada pela água W94 com energia -38,81 kcal/mol; Lys656 via i(C5)COO(-) por intermédio da água W22 com energia -30,20 kcal/mol; Thr655 via i(C5)COO(-) com energia -27,60 kcal/mol. Também foram obtidas interações repulsivas fortes tais como Glu402 via ii(C4)CH<sub>2</sub> por intermédio da água W36 com energia 36,12 kcal/mol; Glu657 via i(C5)COO(-) com energia 35,96 kcal/mol; Asp651 via i(C5)COO(-) com energia 35,85 kcal/mol. De acordo com o painel BIRD para o glutamato (Fig. 3.6) e as Tabelas 3.5 e 3.6



com todas as energias de interação do glutamato com cada resíduo no raio de 13 Å, nossos resultados: (i) confirmam a Thr655 como um dos resíduos mais relevantes na interação iGluR2-glutamato; (ii) sugerem que os resíduos Glu705 e Pro478 não são relevantes na interação com o ligante contrapondo o que Armstrong e Gouaux (2000) inferiram em seu trabalho.

Figura 3.6 – Painel BIRD com alguns dos principais resíduos para a interação GluR2-glutamato.



Fonte: Martins, 2012.



Tabela 3.5 – Parte 1: energias de interação resíduo-GLU para todos os resíduos no raio de 13 Å.

RESIDUO	GRUPO ATÔMICO	GGA (LDA)	DISTÂNCIA
Arg485	i(C1)COO(-)	-85.86 (-95.77)	1.786
Lys730 (wt94)	i(C2)CH; iii(C5)COO(-)	-38.81 (-39.06)	3.210; 3.526
Lys656 (wt22)	iii(C5)COO(-)	-30.20 (-31.34)	2.190
Arg660	i(C1)COO(-); iii(C5)COO (-)	-28.70 (-29.59)	9.532; 9.278
Thr655	iii(C5)COO(-)	-27.60 (-34.94)	1.747
Ser654	i(C1)COO(-); i(C2)CH	-25.47 (-34.76)	1.857; 1.901
Lys449	ii(C3)CH2	-25.04 (-25.21)	6.849
Gly653	i(C1)COO(-); ii(C3)CH2; iii(C5)COO(-)	-23.86 (-26.95)	2.637; 2.780; 2.698
Leu650 (wt69)	iii(C5)COO(-)	-22.78 (-33.16)	1.979
Arg684	ii(C3)CH2	-17.57 (-17.89)	8.182
Thr480	i(C1)COO(-); i(C2)NH3(+)	-14.51 (-22.86)	1.925; 2.180
Leu479	i(C1)COO(-)	-14.38 (-18.59)	2.587
Tyr450	ii(C3)CH2	-12.85 (-23.52)	2.632
Thr686 (wt92)	ii(C4)CH2; iii(C5)COO(-)	-11.50 (-13.68)	2.778; 2.966
Arg453 (wt31)	i(C1)COO(-)	-7.41 (-8.27)	8.449
Met463	i(C1)COO(-); i(C2)NH3(+)	-7.08 (-5.89)	5.509; 5.443
Trp767	i(C2)NH3(+)	-6.88 (-3.16)	9.270
Pro478	i(C2)NH3(+)	-6.83 (-10.90)	1.905
Ser729	i(C2)NH3(+)	-5.98 (-5.87)	10.866
Leu704	iii(C5)COO(-)	-5.53 (-4.83)	3.383
Met496	i(C2)NH3(+)	-4.61 (-2.68)	8.305
Cys425	i(C2)NH3(+)	-4.51 (-2.93)	9.322
Met503	ii(C4)CH2; iii(C5)COO(-)	-4.32 (-2.27)	10.114; 10.019
Leu727	iii(C5)COO(-)	-4.01 (-3.89)	9.507
Met708	i(C2)NH3(+); ii(C4)CH2	-3.82 (-2.75)	3.518; 3.393
Ser652	ii(C3)CH2	-3.47 (-3.57)	4.044
Phe495	i(C2)NH3(+)	-3.14 (-2.90)	7.449
Glu705 (wt90)	i(C2)NH3(+); iii(C5)COO(-)	-3.09 (-21.49)	1.703; 1.872
Tyr711	ii(C4)CH2	-2.91 (-3.49)	10.425
Tyr732	i(C2)NH3(+)	-2.88 (-6.27)	2.466
Phe658	iii(C5)COO(-)	-2.73 (-2.80)	7.478
Leu401 (wt51,wt79)	ii(C4)CH2	-2.60 (-2.90)	6.858
Ile500	iii(C5)COO(-)	-2.00 (-2.12)	5.077
Gly465	i(C1)COO(-)	-1.88 (-2.38)	10.162
Ala687 (wt75)	ii(C4)CH2	-1.86 (-1.87)	7.479
Thr649	iii(C5)COO(-)	-1.82 (-1.66)	6.055
Ser403 (wt5)	ii(C4)CH2	-1.81 (-1.52)	7.219
Gly462	i(C1)COO(-)	-1.58 (-1.87)	8.215
Ser501	iii(C5)COO(-)	-1.44 (-1.68)	7.025
Ile712	ii(C4)CH2	-1.36 (-1.06)	10.421
Leu498	i(C2)NH3(+)	-1.32 (-1.26)	4.745
Ile400	ii(C3)CH2	-1.30 (-1.58)	5.104
Ala735	i(C1)COO(-)	-1.07 (-1.56)	8.654
Leu483	i(C1)COO(-)	-1.05 (-0.93)	10.492
Gly689	ii(C4)CH2; iii(C5)COO(-)	-0.94 (-0.92)	7.681; 7.521

Fonte: Martins, 2012.

Tabela 3.6 – Parte 2: energias de interação resíduo-GLU para todos os resíduos no raio de 13 Å.

RESIDUO	GRUPO ATÔMICO	GGA (LDA)	DISTÂNCIA
Ser706	ii(C4)CH2; iii(C5)COO(-)	-0.94 (-0.66)	9.126; 9.086
Ile481 (wt14)	i(C1)COO(-); i(C2)NH3(+)	-0.93 (-1.75)	6.066; 6.045
Ala452	i(C1)COO(-)	-0.90 (-0.70)	6.786
Trp460	i(C1)COO(-)	-0.84 (-0.83)	8.102
Ala475	i(C1)COO(-)	-0.82 (-0.85)	8.806
Tyr702	ii(C4)CH2; iii(C5)COO(-)	-0.79 (-0.44)	5.000; 4.991
Ile476	i(C2)NH3(+)	-0.70 (-0.49)	9.550
Gly448 (wt48,wt64)	ii(C3)CH2	-0.64 (-0.92)	6.054
Asn709	ii(C4)CH2; iii(C5)COO(-)	-0.58 (-0.54)	8.037; 8.277
Tyr405	i(C2)NH3(+); ii(C4)CH2	-0.56 (-0.29)	6.918; 6.782
Gly499	iii(C5)COO(-)	-0.49 (-0.71)	7.977
Phe491	i(C1)COO(-)	-0.46 (-0.56)	6.322
Ala477	i(C2)NH3(+)	-0.40 (-0.37)	6.027
Val445	ii(C3)CH2	-0.38 (-0.50)	8.832
Gly733	i(C2)NH3(+)	-0.33 (-0.14)	6.668
Ser497	i(C2)NH3(+)	-0.07 (0.13)	9.811
Thr398	i(C1)COO(-)	-0.04 (0.02)	10.650
Gly648	iii(C5)COO(-)	0.13 (0.13)	8.226
Phe682	iii(C5)COO(-)	0.17 (0.25)	8.659
Val690	ii(C4)CH2; iii(C5)COO(-)	0.19 (0.20)	9.895; 9.729
Ile489	i(C1)COO(-)	0.25 (0.31)	8.127
Asn461	i(C1)COO(-)	0.27 (0.10)	8.801
Thr399	i(C2)NH3(+)	0.64 (0.50)	9.713
Val406	i(C2)NH3(+)	0.89 (0.83)	10.544
Pro494	i(C2)NH3(+)	0.89 (0.54)	10.415
Thr685	ii(C4)CH2	0.91 (0.75)	6.587
Val464	i(C1)COO(-)	1.06 (1.23)	6.339
Gly451 (wt38)	i(C1)COO(-)	1.29 (1.33)	5.449
Thr707	i(C2)NH3(+)	1.31 (0.98)	5.547
Val484	i(C1)COO(-)	1.41 (1.41)	8.661
Gly731	i(C2)NH3(+)	1.66 (1.66)	6.194
Pro404	i(C2)NH3(+); ii(C4)CH2	1.83 (1.87)	9.911; 9.877
Thr482	i(C1)COO(-)	1.85 (2.03)	5.485
Phe659	iii(C5)COO(-)	1.99 (2.05)	7.981
Leu703	iii(C5)COO(-)	2.42 (2.74)	5.004
Ile734	i(C1)COO(-)	2.42 (1.56)	10.172
Val683	ii(C4)CH2	6.39 (6.02)	7.472
Asp447	i(C1)COO(-)	12.24 (2.00)	11.269
Glu688	ii(C4)CH2	15.51 (16.75)	9.561
Glu710 (wt15)	ii(C4)CH2	20.79 (21.33)	10.568
Asp728 (wt34)	i(C2)CH	23.99 (23.56)	8.978
Asp651	iii(C5)COO(-)	35.85 (36.03)	6.871
Glu657	iii(C5)COO(-)	35.96 (36.16)	5.857
Glu402 (wt36)	ii(C4)CH2	36.12 (36.30)	4.483

Fonte: Martins, 2012.

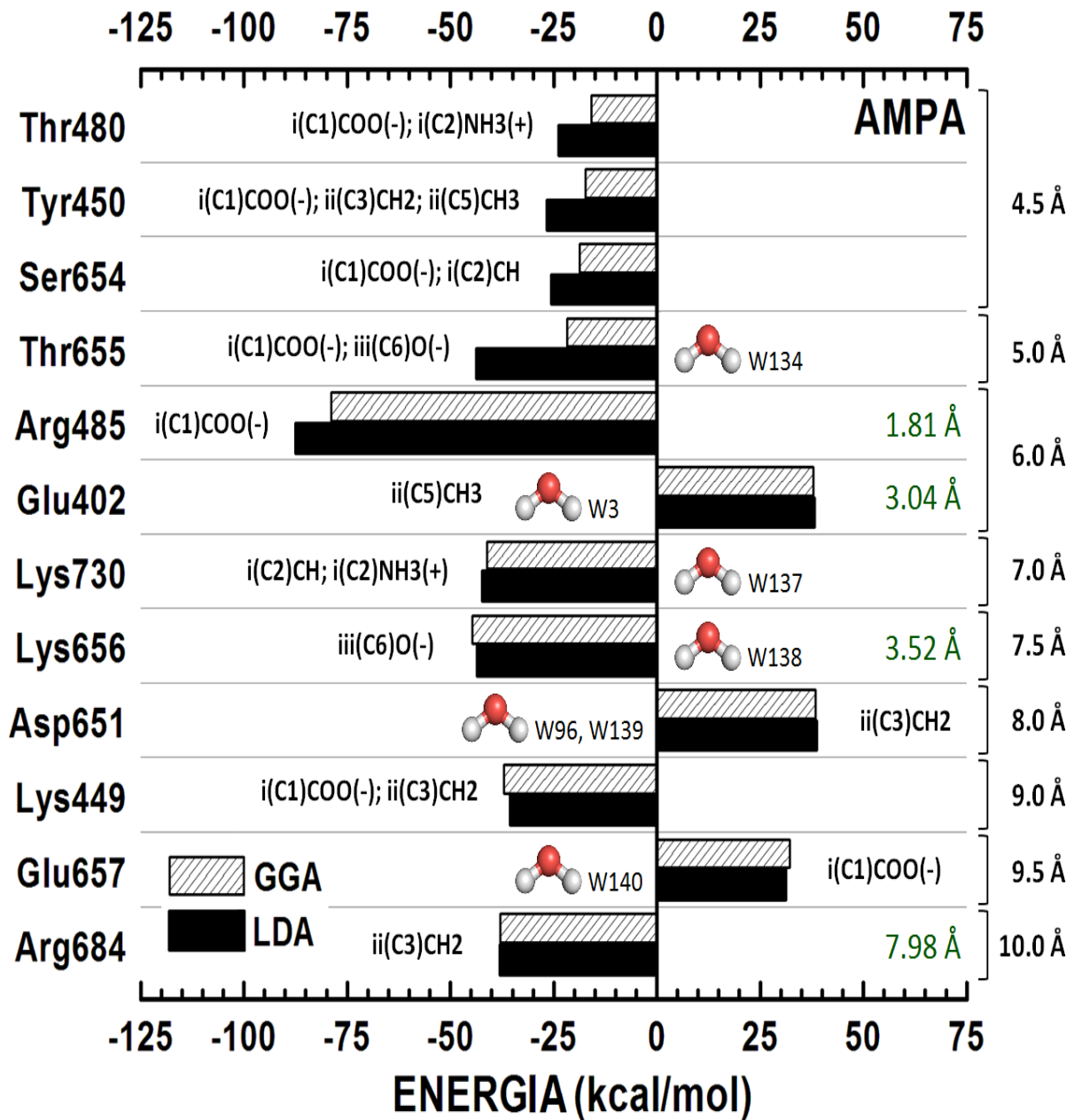
Speranskiy e Kurnikova (2005) usaram dinâmica molecular, e calcularam a interação GluR2-glutamato para diferentes situações nas quais a carga parcial de determinado alvo de interesse era retirada. Dessa forma, foi possível analisar a relevância de diferentes partes do sistema de estudo. A Tabela 1.2 mostra os resultados obtidos pelos autores e indica que a retirada das cargas parciais das moléculas de água presentes no sítio de interação, da Arg485, da Ser654 ou da Thr655 causa a desestabilização da interação do glutamato com a proteína. Esses resultados corroboram com os obtidos no presente trabalho que mostra a Arg485 como o principal resíduo, e apresenta a Ser654 e a Thr655 como os resíduos não-carregados mais importantes para a interação GluR2-glutamato.

### 3.5.2 Análise da interação GluR2-AMPA

Por ser um agonista total, semelhantemente ao glutamato, o AMPA possui um perfil de interação parecido com o observado para o glutamato. Armstrong e Gouaux (2000) citam que as interações fundamentais entre os grupos  $i(C1)COO(-)$  e  $i(C2)NH3(+)$  e Arg485, Glu705, Thr480, Ser654 e Pro478 são conservadas. Assim como para o glutamato, o resíduo de maior importância na interação proteína-AMPA é a Arg485 com uma energia de  $-78,90$  kcal/mol. Dentre as outras interações tidas como fundamentais apenas a com a Ser654 encontra-se entre as 10 interações atrativas mais importantes, com energia de  $-18,77$  kcal/mol. Um resíduo que também se destaca como importante no sistema GluR2-AMPA é a Thr655 que interage com o AMPA via  $i(C1)COO(-)$  e  $iii(C6)O(-)$  e por intermédio da água W134 com energia  $-21,82$  kcal/mol (Fig. 3.7).

Assim como obtido para o glutamato os resultados mostram dentre as interações atrativas mais fortes a Lys656 via  $i(C6)O(-)$  por intermédio da água W138 com energia  $-44,72$  kcal/mol; Lys730 via  $i(C2)CH$  e  $i(C2)NH3(+)$  intermediada pela água W137 com energia  $-41,09$  kcal/mol. Também foram obtidas interações repulsivas fortes para as interações com Asp651 via  $ii(C3)CH2$  por intermédio das águas W96 e W139 com energia  $38,35$  kcal/mol; Glu402 via  $ii(C5)CH3$  com energia  $37,84$  kcal/mol; Glu657 via  $i(C1)COO(-)$  por intermédio da água W140 com energia  $32,23$  kcal/mol, dentre outras que podem ser observadas nas Tabelas 3.7 e 3.8.

Figura 3.7 – Painel BIRD com alguns dos principais resíduos para a interação GluR2-AMPA.



Fonte: Martins, 2012.

Tabela 3.7 – Parte 1: energias de interação resíduo-AMPA para todos os resíduos no raio de 13 Å.

RESIDUO	GRUPO ATÔMICO	GGA (LDA)	DISTÂNCIA
Arg485	i(C1)COO(-)	-78.90 (-87.45)	1.811
Lys656 (wt138)	iii(C6)O(-)	-44.72 (-43.52)	3.524
Lys730 (w137)	i(C2)CH; i(C2)NH3(+)	-41.09 (-42.19)	3.266; 4.691
Arg660 (wt125)	i(C1)COO(-)	-39.98 (-42.06)	8.096
Arg684	ii(C3)CH2	-38.03 (-37.89)	7.977
Lys449	i(C1)COO(-); ii(C3)CH2	-36.97 (-35.40)	7.038; 7.165
Lys763 (wt61)	ii(C5)CH3	-27.53 (-29.97)	9.374
Thr655 (wt134)	i(C1)COO(-); iii(C6)O(-)	-21.82 (-43.62)	1.929; 1.529
Ser654	i(C1)COO(-); i(C2)CH	-18.77 (-25.55)	1.925; 2.190
Tyr450	i(C1)COO(-); ii(C3)CH2; ii(C5)CH3	-17.36 (-26.58)	3.105; 2.829; 2.946
Gly653	i(C1)COO(-)	-17.36 (-18.71)	2.729
Thr480	i(C1)COO(-); i(C2)NH3(+)	-15.84 (-23.78)	1.970; 2.109
Leu479	i(C2)NH3(+)	-12.92 (-17.39)	3.206
Leu704	iii(C6)N	-12.07 (-13.39)	2.691
Pro478	i(C2)NH3(+)	-11.82 (-16.83)	1.900
Met708	ii(C5)CH3; iii(C5)O	-10.72 (-12.35)	2.504; 2.786
Phe658 (wt103)	i(C1)COO(-)	-10.00 (-8.67)	7.124
Leu650 (wt135)	ii(C3)CH2; iii(C6)O(-)	-8.54 (-13.67)	2.262; 2.865
Met463	i(C1)COO(-); i(C2)NH3(+)	-6.84 (-3.26)	5.642; 5.641
Met496	i(C2)NH3(+); ii(C5)CH3	-5.50 (-3.28)	8.017; 7.979
Leu727	iii(C6)O(-); iii(C6)N	-5.32 (-5.59)	10.037; 10.205
Tyr732	i(C2)NH3(+); ii(C5)CH3	-5.04 (-10.24)	2.342; 2.535
Ile500	iii(C6)O(-)	-4.87 (-4.99)	5.306
Cys425	ii(C5)CH3	-4.87 (-2.26)	8.926
Phe495	i(C2)NH3(+)	-4.68 (-3.75)	7.531
Tyr711	ii(C5)CH3	-4.39 (-4.45)	7.991
Met503	iii(C5)O	-4.37 (-2.08)	8.090
Gly462 (wt48)	i(C1)COO(-)	-3.10 (-1.65)	8.262
Asn726	ii(C5)CH3; iii(C5)O	-3.08 (-3.49)	11.107; 10.911
Thr649	iii(C6)O(-)	-.2.78 (-2.60)	5.118
Ser652	i(C1)COO(-)	-2.40 (-1.88)	4.643
Tyr424	ii(C5)CH3	-2.30 (-2.62)	9.782
Ser501	iii(C6)N	-2.22 (-2.49)	6.433
Thr686 (wt31)	ii(C5)CH3	-2.17 (-2.27)	3.461
Leu498	i(C2)NH3(+)	-2.16 (-1.07)	4.572
Val690	iii(C5)O; iii(C6)N	-2.16 (-1.91)	8.148; 8.270
Ala475	i(C1)COO(-)	-1.96 (-1.56)	9.091
Asn461 (wt114)	i(C1)COO(-)	-1.68 (-0.16)	8.854
Asn709	iii(C5)O	-1.58 (-1.67)	5.970
Ile400	ii(C3)CH2; ii(C5)CH3	-1.48 (-0.14)	5.369; 5.486
Gly689	iii(C6)N	-1.47 (-1.52)	8.378
Pro404	ii(C5)CH3	-1.25 (-1.10)	6.809
Trp767	ii(C5)CH3	-1.24 (-1.12)	6.736
Ala735	i(C1)COO(-)	-1.23 (-1.07)	8.822
Phe682	iii(C6)O(-)	-1.19 (-1.35)	9.720

Fonte: Martins, 2012.

Tabela 3.8 – Parte 2: energias de interação resíduo-AMPA para todos os resíduos no raio de 13 Å.

RESIDUO	GRUPO ATÔMICO	GGA (LDA)	DISTÂNCIA
Gly648	iii(C6)O(-)	-0.88 (-0.73)	8.426
Val464	i(C1)COO(-)	-0.84 (0.50)	6.429
Tyr405	ii(C5)CH3	-0.81 (-0.74)	4.074
Gly733	i(C2)NH3(+)	-0.69 (-0.31)	6.659
Ile481 (wt11,wt105)	i(C2)NH3(+)	-0.64 (-1.23)	5.776
Ser729 (wt20)	i(C2)NH3(+)	-0,55 (-1.03)	10.821
Gly448 (wt43,wt58)	ii(C3)CH2	-0.54 (1.17)	5.995
Leu401 (wt46,wt73)	ii(C5)CH3	-0.47 (1.16)	7.208
Ser706	iii(C5)O; iii(C6)N	-0.46 (-0.41)	6.265; 6.512
Val445	ii(C3)CH2	-0.19 (1.49)	9.092
Ile712	ii(C5)CH3	-0.12 (-1.62)	8.218
Thr707	ii(C5)CH3	-0.10 (0.74)	3.877
Thr399	i(C2)NH3(+); ii(C5)CH3	0.07 (-0.99)	10.060; 9.902
Gly499	iii(C6)N	0.17 (-0.09)	7.329
Ala477 (wt100)	i(C2)NH3(+)	0.27 (0.34)	6.071
Phe659	iii(C6)O(-)	0.29 (0.12)	7.574
Ser497	i(C2)NH3(+)	0.43 (0.47)	9.582
Thr685	iii(C5)O; iii(C6)O(-); iii(C6)N	0.47 (0.64)	8.091; 8.019; 8.063
Ser403	ii(C5)CH3	0.61 (0.67)	6.441
Ile476	i(C2)NH3(+)	0.67 (0.76)	9.526
Ala687 (wt68)	ii(C5)CH3	0.68 (1.51)	6.449
Ile489	i(C1)COO(-)	0.98 (1.20)	8.303
Ile502	iii(C6)N	1.02 (1.29)	9.443
Gly731	i(C2)NH3(+)	1.08 (1.40)	6.115
Ala452	i(C1)COO(-)	1.16 (1.33)	6.737
Gly451	i(C1)COO(-)	1.34 (1.45)	5.096
Val406	ii(C5)CH3	1.38 (2.13)	8.580
Pro494	i(C2)NH3(+)	1.63 (1.59)	9.817
Val683	iii(C6)N	1.78 (2.03)	8.100
Leu703	iii(C6)O(-); iii(C6)N	2.14 (2.29)	5.219; 5.114
Ile734	i(C1)COO(-); i(C2)NH3(+)	2.86 (3.00)	10.349; 10.331
Phe491	i(C1)COO(-)	3.98 (4.11)	6.505
Thr482 (wt88)	i(C1)COO(-)	4.23 (5.14)	5.422
Trp460 (wt33)	i(C1)COO(-)	4.75 (4.67)	6.301
Val484 (wt102,wt365)	i(C1)COO(-)	5.37 (6.07)	7.632
Tyr702 (wt136)	iii(C6)N	7.77 (6.08)	2.981
Glu705	iii(C6)N	7.78 (-7.75)	3.037
Glu710 (wt12)	ii(C5)CH3; iii(C5)O	9.20 (21.75)	8.803; 8.555
Glu688	ii(C5)CH3; iii(C5)O	31.09 (30.04)	9.771; 10.054
Asp728 (wt29)	i(C2)CH	32.03 (32.55)	8.764
Glu657 (wt140)	i(C1)COO(-)	32.23 (31.13)	6.138
Glu402 (wt3)	ii(C5)CH3	37.84 (38.05)	3.044
Asp651 (wt96,wt139)	ii(C3)CH2	38.35 (38.64)	4.966

Fonte: Martins, 2012.

### 3.5.3 Análise da interação GluR2-cainato

Armstrong *et al.* (1998) co-cristalizaram cainato com iGluR2. A partir da análise dos dados cristalográficos, eles afirmam que o grupo carboxílico i(C1)COO(-) forma interações essenciais com o grupo guanidium da Arg485 e o grupo NH da cadeia principal de Thr480. O estudo realizado mostra que a interação do grupo carboxílico i(C1)COO(-) com o resíduo Arg485 é a mais forte das interações atrativas no sistema cainato-iGluR2, com energia -65,55 kcal/mol, o que fornece uma sólida base quântica para consolidar a análise de Armstrong *et al.* (1998) em relação ao papel da Arg485 no sistema GluR2- cainato. Por outro lado, em contraste com o sugerido por Armstrong *et al.* (1998), com base na análise de seus dados cristalográficos, não foi obtida como uma das mais relevantes a interação de i(C1)COO(-) do cainato com o grupo NH da cadeia principal da Thr480.

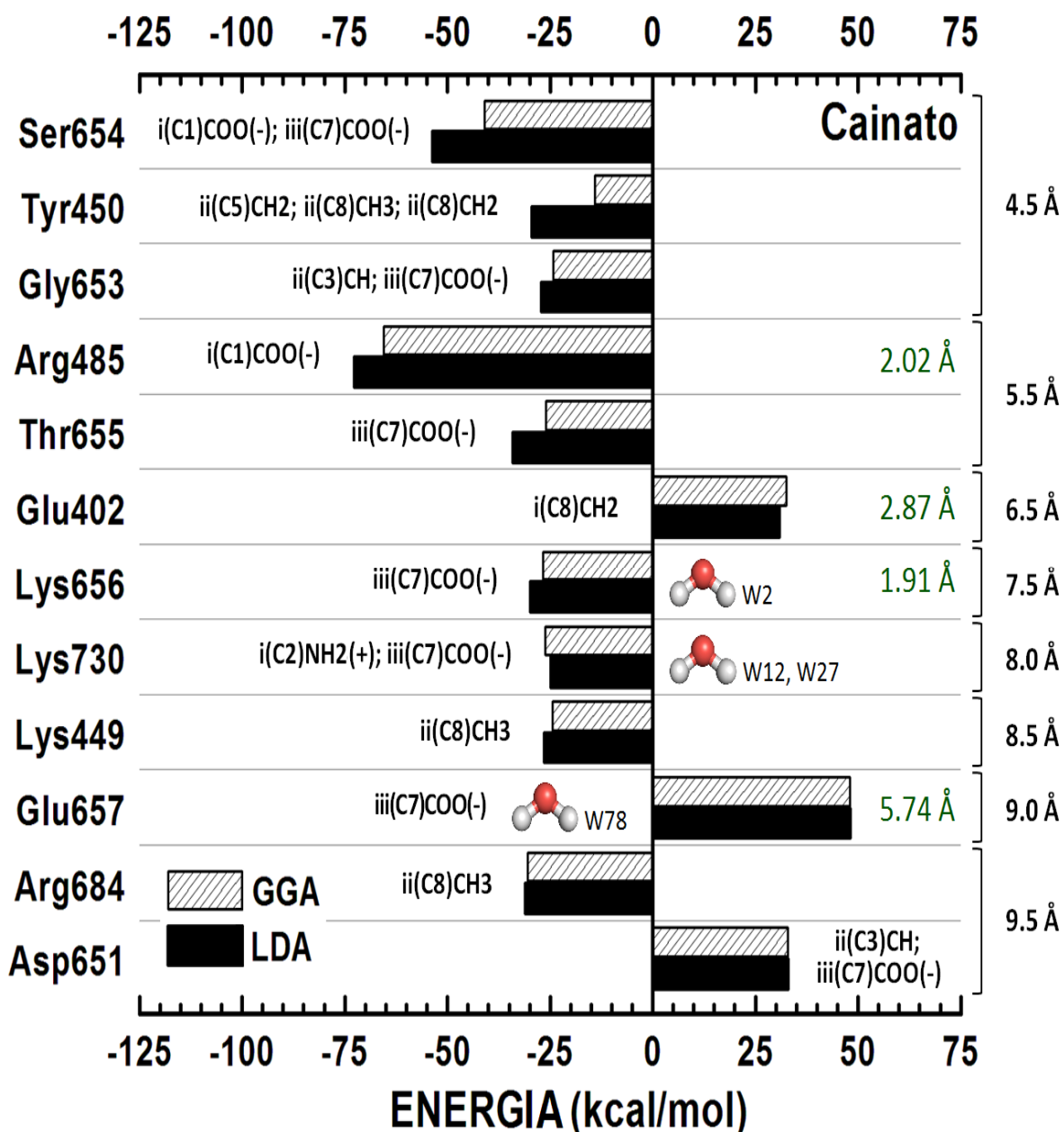
Na ligação do cainato com a GluR2, Armstrong *et al.* (1998) destacam ainda os resíduos Ser654, Thr655, Ser652, Tyr450, Glu705 e Pro478. Os resultados do presente estudo indicam que as outras interações atrativas mais fortes obtidas foram Ser654 via i(C1)COO(-) e iii(C7)COO(-) com energia -40,95 kcal/mol; Arg684 via ii(C8)CH3 com energia -30,49 kcal/mol; Thr655 com iii(C7)COO(-) com energia -26,09 kcal/mol. Interações repulsivas fortes também foram obtidas, as quais são Glu657 via iii(C7)COO(-) intermediado pela água W78 com energia 48,06 kcal/mol; Asp651 via ii(C3)CH, iii(C7)COO(-) com energia 32,89 kcal/mol; Glu402 via ii(C8)CH2 com energia 32,56 kcal/mol. De acordo com o painel BIRD (Fig. 3.8) para o cainato e as Tabelas 3.9 e 3.10 com todas as energias de interação do cainato associadas a cada resíduo, os resultados: (i) corroboram a indicação dos resíduos Ser654, Thr655 e Tyr450 como estando entre os mais importantes para a ligação cainato-iGluR2; (ii) indicam que os resíduos Ser652, Glu705, Pro478 e Thr480 destacados como relevantes por Armstrong *et al.* (1998) são bem menos importantes que vários outros resíduos como os resíduos atrativos Arg684, Lys656 intermediado pela água W2, Gly653, Lys730 intermediado pelas águas W12 e W27, Lys449, e os resíduos repulsivos Glu657, Asp651 intermediado pela água W78, e Glu402.

O estudo realizado por Arinaminpathy, Sansom e Biggin (2002) revela que a interação da proteína com o agonista não só resulta no fechamento do domínio de ligação como observado nos estudos cristalográficos (ARMSTRONG, GOUAUX, 2000) como resulta na diminuição da mobilidade do domínio. Em outro estudo de dinâmica molecular da GluR2 com os ligantes glutamato e cainato (ARINAMINPATHY, *et al.*, 2006), o complexo GluR2-



glutamato mostrou-se extremamente estável e o domínio de ligação S1S2 tende a ficar fechado impossibilitando a entrada de moléculas de água. Já para o complexo GluR2-cainato a proteína mostrou uma grande flexibilidade permitindo a entrada de moléculas de água com maior frequência no sítio de ligação.

Figura 3.8 – Painel BIRD com alguns dos principais resíduos para a interação GluR2-cainato.



Fonte: Martins, 2012.

Tabela 3.9 – Parte 1: energias de interação resíduo-CAI para todos os resíduos no raio de 13 Å.

RESIDUO	GRUPO ATÔMICO	GGA (LDA)	DISTÂNCIA
Arg485	i(C1)COO(-)	-65.55 (-72.70)	2.018
Ser654	i(C1)COO(-); iii(C7)COO(-)	-40.95 (-53.52)	1.642; 2.476
Arg684	ii(C8)CH3	-30.49 (-30.93)	5.501
Arg660	i(C1)COO(-); iii(C7)COO(-)	-27.78 (-27.28)	11.281; 10.169
Lys656 (wt2)	iii(C7)COO(-)	-29.81 (-26.84)	1.908
Lys730 (wt12, wt27)	ii(C2)CH; iii(C7)COO(-)	-26.13 (-24.84)	3.281; 3.514
Thr655	iii(C7)COO(-)	-26.09 (-33.97)	1.656
Lys449	ii(C8)CH3	-24.37 (-26.42)	5.129
Gly653	ii(C3)CH; iii(C7)COO(-)	-24.23 (-27.01)	2.851; 2.608
Tyr450	ii(C5)CH2; ii(C8)CH3; ii(C8)CH2	-14.03 (-29.43)	2.635; 2.486; 2.683
Cys425	ii(C5)CH2	-11.20 (-4.08)	8.912
Leu479	i(C2)NH2(+)	-10.99 (-11.15)	2.893
Leu650	ii(C8)CH3	-9.24 (-16.17)	2.213
Met463	ii(C5)CH2	-8.45 (-5.09)	5.499
Thr480	i(C1)COO(-)	-8.01 (-15.45)	2.058
Met708	ii(C5)CH2; ii(C8)CH2	-6.84 (-14.48)	2.082; 2.267
Met496	i(C2)NH2(+)	-6.25 (-3.09)	8.387
Met503	iii(C7)COO(-)	-6.14 (-2.97)	10.234
Leu704	iii(C7)COO(-)	-4.75 (-5.30)	3.556
Pro478	i(C2)NH2(+)	-4.74 (-8.78)	2.132
Tyr711	ii(C8)CH2	-4.20 (-4.49)	9.655
Ile500	iii(C7)COO(-)	-3.92 (-4.32)	5.106
Asn709	ii(C6)CH2	-3.86 (-3.26)	7.945
Ser652	ii(C8)CH3	-3.73 (-3.05)	3.775
Phe495	i(C2)NH2(+)	-3.68 (-3.23)	7.908
Ile481	i(C1)COO(-)	-3.34 (-3.21)	6.092
Tyr702 (wt45)	ii(C6)CH2; iii(C7)COO(-)	-2.87 (-4.20)	3.565; 3.647
Leu498	i(C2)NH2(+)	-2.87 (-2.30)	5.045
Val690	ii(C8)CH2	-2.77 (-2.44)	9.300
Tyr732	i(C2)NH2(+)	-2.53 (-7.37)	2.149
Leu703 (wt31)	iii(C7)COO(-)	-2.44 (-4.65)	2.282
Ala687	ii(C8)CH2	-2.36 (-2.10)	6.677
Ile400	ii(C8)CH3	-2.02 (-1.71)	5.077
Ile712	ii(C8)CH2	-1.87 (-1.59)	9.432
Ser501	iii(C7)COO(-)	-1.60 (-1.79)	6.928
Gly462	ii(C8)CH3	-1.53 (-1.33)	8.431
Trp460	i(C1)COO(-)	-1.38 (-1.30)	8.508
Thr686	ii(C8)CH2	-1.34 (-1.62)	3.492
Ser706	iii(C7)COO(-)	-1.30 (-1.46)	7.500
Trp767	ii(C5)CH2	-1.23 (-0.83)	8.444
Ser403	ii(C8)CH2	-1.21 (-1.69)	7.167

Fonte: Martins, 2012.

Tabela 3.10 – Parte 2: energias de interação resíduo-CAI para todos os resíduos no raio de 13 Å.

RESIDUO	GRUPO ATÔMICO	GGA (LDA)	DISTÂNCIA
Tyr405	ii(C8)CH2	-1.18 (-1.40)	5.108
Phe658	iii(C7)COO(-)	-1.15 (-0.79)	6.799
Ala452	i(C1)COO(-)	-1,02 (-1.28)	6.993
Ala735	i(C1)COO(-)	-1.00 (-2.96)	9.451
Gly499	iii(C7)COO(-)	-0.93 (-0.62)	7.867
Val464	i(C1)COO(-)	-0.88 (-0.90)	7.022
Gly448	ii(C8)CH3	-0.79 (-0.84)	5.994
Gly451 (wt4)	i(C1)COO(-)	-0.66 (-0.44)	4.685
Thr649	iii(C7)COO(-)	-0.64 (-0.53)	5.386
Val445 (wt68)	ii(C5)CH2	-0.64 (-0.59)	9.124
Gly733	i(C1)COO(-); i(C2)NH2(+)	-0.59 (-2.06)	7.129; 6.959
Thr482 (wt13)	i(C1)COO(-)	-0.54 (-0.61)	4.208
Thr399	ii(C5)CH2	-0.32 (-0.33)	9.337
Phe491	i(C1)COO(-)	-0.21 (-1.65)	6.330
Ala477	ii(C5)CH2	-0.19 (-0.09)	5.572
Phe682	iii(C7)COO(-)	-0.06 (-0.21)	8.703
Ala475 (wt1)	i(C1)COO(-); i(C2)NH2(+)	-0,04 (-0.24)	8.218; 8.104
Gly689	ii(C8)CH3	0.10 (-0.09)	9.012
Pro404	ii(C8)CH2	0.22 (0.34)	5.108
Asn461	ii(C8)CH3	0.57 (0.61)	9.009
Gly731	i(C2)NH2(+)	0.59 (0.77)	7.059
Ser497	i(C2)NH2(+)	0.82 (0.78)	10.092
Val406	ii(C8)CH2	0.90 (0.99)	8.943
Phe659	iii(C7)COO(-)	0.94 (1,10)	7.702
Gly648	iii(C7)COO(-)	1.14 (1.11)	8.578
Thr707	i(C2)NH2(+); ii(C5)CH2	1,16 (1.38)	5.504; 5.594
Thr685	ii(C8)CH3	1.20 (1.60)	4.644
Ile489	i(C1)COO(-)	1.41 (-0.60)	9.447
Leu401	ii(C8)CH2	1.64 (0.64)	6.665
Val683	ii(C6)CH2; iii(C7)COO(-); ii(C8)CH3	1.65 (1.49)	8.258; 8.134; 8.024
Ile476	ii(C5)CH2	3.87 (3.48)	9.288
Glu705 (wt52)	i(C2)CH; i(C2)NH2(+); iii(C7)COO(-)	5.15 (-14.28)	2.349; 2.260; 1.592
Val484 (wt56)	i(C1)COO(-)	6.92 (7.02)	6.424
Asp728	ii(C2)CH; iii(C7)COO(-)	11.21 (10.40)	9.311; 9.294
Asp447	ii(C8)CH3	20.87 (23.13)	9.240
Glu710	i(C2)NH2(+), ii(C5)CH2	26.26 (25.70)	11.710; 10.665
Glu688	ii(C8)CH2; ii(C8)CH3	29.74 (29.87)	8.445; 8.592
Glu402	ii(C8)CH2	32.56 (30.74)	2.873
Asp651	ii(C8)CH3	32.89 (32.88)	7.009
Glu657 (wt78)	iii(C7)COO(-)	48.06 (48.00)	5.740

Fonte: Martins, 2012.

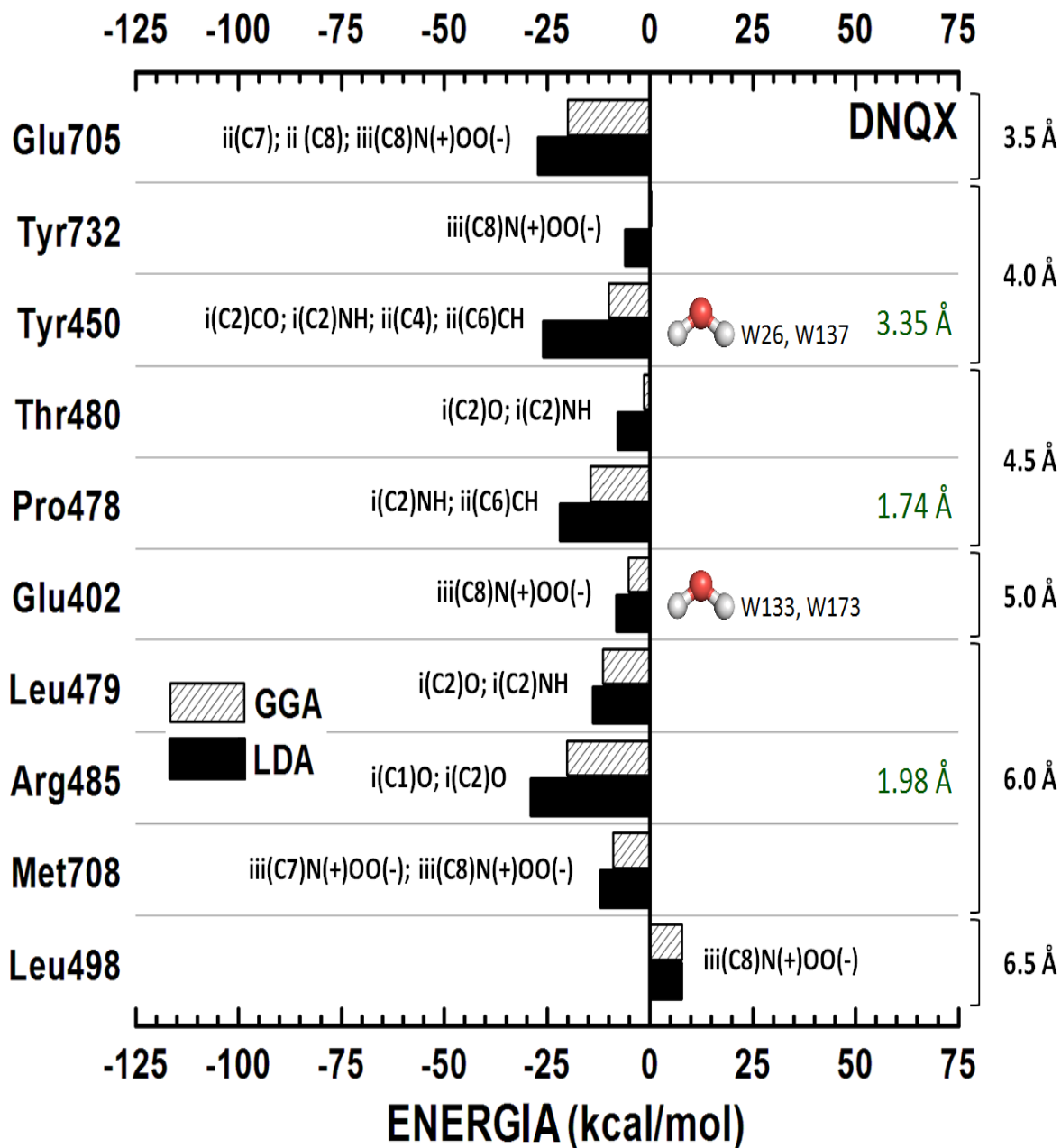
Arinaminpathy *et al.* (2006), sugerem, a partir dos resultados que obtiveram, que a presença do solvente e sua facilidade de entrar no sítio de ligação quando este está ocupado por cainato interferem na interação do ligante com os resíduos Arg485 e Pro478, fato que não

ocorre quando a proteína está ligada ao glutamato. Correlacionando estes resultados (ARINAMINPATHY, *et al.*, 2006) com os resultados obtidos pelo estudo com os funcionais LDA e GGA+D pode-se inferir que a interrupção da interação do cainato com a Arg485 deve causar uma redução, que não foi computada pelos cálculos, na energia de interação da proteína com o cainato visto que a Arg485 é o principal resíduo na interação GluR2-cainato. Esse pode ser um dos fatores que causam a abertura apenas parcial do canal iônico quando da presença do cainato, sugerindo que o fato de o cainato ser um agonista parcial da GluR2 pode não estar relacionado, apenas, à intensidade da energia de interação estática obtida a partir dos cálculos realizados.

### 3.5.4 Análise da interação GluR2-DNQX

A GluR2 também foi co-cristalizada com o 6,7-nitro-2,3-quinoxalidiona, DNQX (ARMSTRONG, GOUAUX, 2000). Segundo a análise dos autores, os dois grupos carbonil, i(C1)CO e i(C2)CO, substituem o grupo  $\alpha$ -carboxil, i(C1)COO(-), presente nos agonistas, formando as ligações de hidrogênio com a Arg485 e interagindo com o grupo NH da Thr480. Armstrong e Gouaux (2000) adicionam também, o fato de o nitrogênio da amida i(C2)NH do DNQX formar uma ligação de hidrogênio com o grupo carbonil da cadeia principal da Pro478. Os resultados obtidos com o presente trabalho, mostram que, assim como nos sistemas com os agonistas, a interação com a Arg485 é uma das mais fortes dentre as interações do sistema GluR2-DNQX, com energia de -20,17 kcal/mol, equiparando-se para esse sistema, apenas com a interação com o resíduo Glu705 com energia de -20,04 kcal/mol. Com esse resultado, observa-se o fato interessante de que, embora para os agonistas a interação com o Glu705 não seja relevante, ela o é para o sistema com o antagonista estudado. Em relação à Thr480, mais uma vez os resultados obtidos vão de encontro à análise feita por Armstrong e Gouaux (2000), mostrando que este resíduo não é de grande importância para a interação proteína-ligante. Já o resultado para a interação do DNQX com a Pro478, energia de -14,51 kcal/mol, corrobora com a indicação da sua relevância feita pelos autores. As principais energias de interação podem ser vistas no Painel BIRD apresentado na Figura 3.9, e todas as energias de interação entre a GluR2 e o DNQX calculadas para o raio de até 13 Å podem ser vistas nas Tabelas 3.11 e 3.12.

Figura 3.9 – Painel BIRD com alguns dos principais resíduos para a interação GluR2-DNQX.



Fonte: Martins, 2012.

Tabela 3.11 – Parte 1: energias de interação resíduo-DNQX para todos os resíduos no raio de 13 Å.

RESIDUO	GRUPO ATÔMICO	GGA (LDA)	DISTÂNCIA
Arg485	i(C1)O; i(C2)O	-20.17 (-28.84)	1.979; 1.981
Glu705	ii(C7); ii(C8); iii(C8)N(+OO(-)	-20.04 (-27.09)	2.744; 2.904; 2.982
Pro478	i(C2)NH; ii(C6)CH	-14.51 (-21.03)	1.737; 2.351
Asp651	ii(C5)CH	-14.8 (-14.22)	9.539
Glu688	iii(C7)N(+OO(-)	-13.04 (-14.16)	8.670
Leu479	i(C2)O; i(C2)NH	-11.38 (-13.78)	2.702; 2.657
Tyr450 (wt26,wt137)	i(C2)CO; i(C2)NH; ii(C4); ii(C6)CH	-10.02 (-25.80)	3.429; 3.352; 3.539; 3.441
Met708	iii(C7)N(+OO(-); iii(C8)N(+OO(-)	-8.90 (-11.94)	2.862; 2.523
Ser497 (wt68)	iii(C8)N(+OO(-)	-8.43 (-8.04)	8.922
Asp447	i(C1)O	-6.09 (-6.15)	11.459
Ile712	iii(C7)N(+OO(-)	-5.59 (-4.75)	6.968
Glu657	i(C1)O	-5.58 (-5.73)	8.605
Glu402 (wt133,wt173)	iii(C8)N(+OO(-)	-5.13 (-7.97)	2.397
Leu704	iii(C7)N(+OO(-)	-4.25 (-4.47)	3.887
Cys425	iii(C8)N(+OO(-)	-4.13 (-1.07)	9.199
Met496	iii(C8)N(+OO(-)	-3.97 (-2.16)	7.483
Met463	i(C2)O; i(C2)NH	-3.20 (-1.00)	5.663; 5.486
Met503	iii(C7)N(+OO(-)	-3.05 (-0.74)	8.099
Ser654 (wt147,wt162)	i(C1)O	-2.85 (-3.63)	2.491
Val683	iii(C7)N(+OO(-)	-2.73 (-2.88)	8.318
Tyr711	iii(C8)N(+OO(-)	-2.45 (-1.82)	6.930
Thr686 (wt47)	iii(C7)N(+OO(-)	-2.27 (-4.79)	2.692
Phe491	i(C2)O	-2.04 (-2.27)	6.134
Gly689	i(C1)O	-1.56 (-1.35)	8.309
Thr480	i(C2)O; i(C2)NH	-1.54 (-7.69)	1.972; 2.860
Tyr405 (wt123)	iii(C8)N(+OO(-)	-1.47 (-4.47)	2.771
Ala687	iii(C7)N(+OO(-)	-1.42 (-1.28)	6.848
Val690	iii(C7)N(+OO(-)	-1.28 (-1.74)	7.086
Gly448 (wt54,wt172)	ii(C5)CH	-1.05 (-0.94)	6.475
Ile400	i(C2)NH	-0.94 (-0.47)	5.670
Val484 (wt156,wt185)	i(C1)O	-0.88 (-1.15)	7.353
Tyr424	iii(C8)N(+OO(-)	-0.80 (0.10)	9.298
Phe658	i(C1)O; i(C1)NH	-0.74 (-0.96)	10.713; 10.529
Ser652	i(C1)NH	-0.51 (-0.61)	6.556
Ile481	i(C2)O	-0.48 (-0.62)	6.084
Gly451 (wt39,wt180)	i(C1)O	-0.43 (-0.28)	4.604
Ala475 (wt85)	i(C2)NH	-0,42 (-0.46)	7.743
Gly653	i(C1)NH	-0.41 (-0.46)	5.328
Ala735	i(C2)O	-0.40 (-0.38)	8.677
Ser706	iii(C8)N(+OO(-)	-0.39 (-0.72)	6.770
Leu703 (wt17)	iii(C7)N(+OO(-)	-0.37 (-0.42)	5.159

Fonte: Martins, 2012.

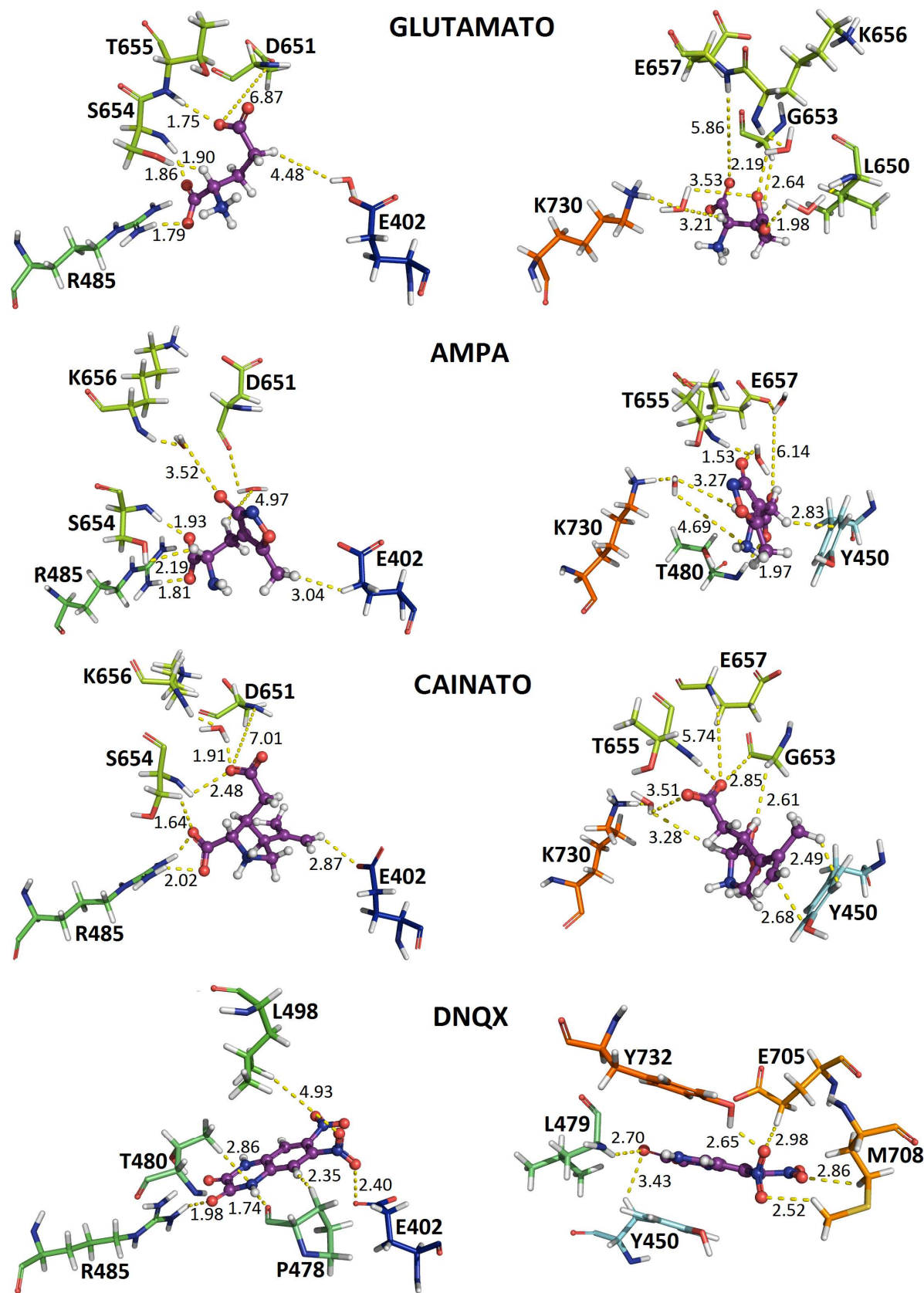
Tabela 3.12 – Parte 2: energias de interação resíduo-DNQX para todos os resíduos no raio de 13 Å.

RESIDUO	GRUPO ATÔMICO	GGA (LDA)	DISTÂNCIA
Val464	i(C2)O	-0.35 (0.19)	6.576
Tyr702	iii(C7)N(+)OO(-)	-0.34 (-0.24)	5.546
Trp767	iii(C8)N(+)OO(-)	-0.32 (-0.65)	5.651
Gly733	i(C2)NH	-0.25 (-0.29)	6.680
Val445	i(C2)O; i(C2)NH	-0.21 (-0.22)	9.461; 9.439
Ile489	i(C2)O	-0.21 (-0.35)	8.343
Ile476	i(C2)NH	-0,19 (-0.24)	9.289
Asn461	i(C1)O	-0.16 (0.10)	8.605
Thr685 (wt110)	iii(C7)N(+)OO(-)	-0.08 (-0.04)	7.077
Thr399	ii(C6)CH	-0.02 (0.02)	9.947
Thr649	i(C1)NH	0.02 (0.15)	9.426
Ala452	i(C1)O	0.04 (0.00)	6.194
Arg684 (wt90)	ii(C5)CH	0.12 (0.24)	6.815
Thr482 (wt3)	i(C1)O	0.13 (0.11)	4.799
Gly731	i(C2)O	0.17 (-0.05)	7.204
Thr655 (wt164)	ii(C5)CH	0.18 (-0.42)	3.002
Tyr732	iii(C8)N(+)OO(-)	0.28 (-5.91)	2.646
Thr707	iii(C8)N(+)OO(-)	0.40 (0.74)	3.274
Ser403 (wt46,wt130,wt152)	iii(C8)N(+)OO(-)	0.40 (0.72)	4.423
Asn709	iii(C8)N(+)OO(-)	0.41 (0.41)	6.151
Ala477	i(C2)NH; ii(C6)CH	0.43 (0.45)	6.062; 6.225
Gly462	i(C1)O; i(C2)O	0.51 (0.87)	8.514; 8.480
Phe495	ii(C6)CH	0.62 (1.59)	7.085
Asp728	i(C1)NH; ii(C3)	0.62 (0.16)	11.177; 11.368
Trp460	i(C1)O; i(C2)O	1.14 (3.44)	8.301; 8.592
Leu650	ii(C5)CH	1.17 (1.29)	4.053
Lys449	i(C2)CO	1.34 (1.35)	7.339
Leu401 (wt125)	iii(C8)N(+)OO(-)	1.38 (1.91)	6.942
Val406 (wt75)	iii(C8)N(+)OO(-)	1.49 (4.05)	7.982
Ile734	i(C2)NH	1.49 (1.63)	10.081
Pro404	iii(C8)N(+)OO(-)	1.54 (1.28)	6.066
Ile500	ii(C5)CH	1.98 (1.92)	8.689
Gly499	iii(C8)N(+)OO(-)	2.11 (2.17)	8.489
Lys763 (wt76)	iii(C8)N(+)OO(-)	2.57 (2.46)	8.711
Ser501	iii(C7)N(+)OO(-); iii(C8)N(+)OO(-)	2.69 (2.97)	9.046; 9.087
Lys730	i(C1)NH	4.39 (4.78)	6.419
Glu710 (wt118)	iii(C8)N(+)OO(-)	4.74 (5.12)	8.047
Ser729	i(C2)NH	6.44 (6.45)	12.192
Lys656 (wt161)	i(C1)NH	7.00 (6.97)	6.499
Leu498	iii(C8)N(+)OO(-)	7.85 (7.68)	4.925

Fonte: Martins, 2012.



Figura 3.10 – Ilustração da distancia dos ligantes a alguns dos resíduos relevantes para sua interação com a GluR2.



Fonte: Martins, 2012.

Além dos resíduos citados anteriormente Armstrong e Gouaux (2000) ressaltam que o DNQX, quando no sítio de interação, fica empilhado diretamente sob a Tyr450, maximizando a interação entre os orbitais  $\pi$  da Tyr450 e do ligante. A interação entre a Tyr450 e o DNQX é predominantemente de van der Waals e está entre as principais interações do ligante com a proteína, tendo energia de -10,02 kcal/mol. Armstrong e Gouaux (2000) também ressaltaram a interação do ligante via o grupo 8-nitro, iii(C8)N(+)OO(-), com a Tyr732 como pode ser visto na Figura 3.10, porém a energia de interação obtida, 0,28 kcal/mol, está próxima de zero o que sugere que este resíduo não é importante. Da mesma forma, a interação entre a Thr686 e o ligante via o grupo 7-nitro, iii(C7)N(+)OO(-), é muito pequena, tendo uma energia de interação de -2,27 kcal/mol.

### 3.5.5 Comparação entre os sistemas

De modo geral as interações entre os resíduos proteicos e os agonistas totais ou parciais são bem semelhantes. Os resíduos não-carregados relevantes estão no máximo, no raio de 6,5 Å, com exceção do resíduo Cys425 para o sistema GluR2-cainato que tem uma energia de interação de -11,20 kcal/mol (GGA) mesmo estando no raio de 12 Å e a uma distância do ligante de 8,912 Å (ver Tabelas 3.3 e 3.9). As interações mais relevantes entre os agonistas e os resíduos ocorrem com resíduos carregados, seja positiva ou negativamente.

Já para o sistema GluR2-DNQX as interações importantes com resíduos carregados ou não, limitam-se àqueles presentes no raio de 6,5 Å. Porém, para este sistema, os resíduos Glu688 e Asp651, mesmo integrando os raios de 12 Å e 12,5 Å e estando a distâncias de 8,670 Å e 9,539 Å do ligante (ver Tabela 3.11), respectivamente, interagem fortemente com o ligante. Assim, observa-se que resíduos carregados, mesmo muito distantes do ligante, interagem fortemente para todos os sistemas. Outro aspecto que diverge a forma de interação do antagonista, DNQX, dos agonistas, é que para os agonistas as interações com resíduos carregados positivamente são atrativas e com resíduos com carga negativa são repulsivas. Para o DNQX algumas das principais interações atrativas ocorrem com resíduos carregados negativamente.

### 3.5.6 Análise da interação Glu705-ligante

Um resíduo que levanta muita controvérsia é o Glu705 que foi identificado, no estudo realizado por Armstrong e Gouaux (2000), como um componente essencial para o sítio de interação com o ligante. Analisando as energias de interação desse resíduo com os dois agonistas, glutamato e AMPA, e com o agonista parcial, cainato, obtidas com o funcional GGA+D (-3.09 kcal/mol, 7.78 kcal/mol e 5,15 kcal/mol, respectivamente), percebe-se que são relativamente baixas. Esses resultados indicam que o Glu705 não é tão importante na interação direta com os agonistas, corroborando com o resultado de Speranskiy e Kurnikova (2005) no qual a remoção da carga negativa do resíduo em questão não causa grande alteração na energia de interação da proteína com o ligante, apenas estabilizando levemente a interação. Analisando os resultados obtidos, fica perceptível que, mesmo o E705 estando bem próximo dos ligantes e possuindo carga negativa, ele não causa grande repulsão dos ligantes que também possuem carga negativa (observar Tabelas 3.5, 3.8 e 3.10), enquanto que resíduos mais distantes, nas mesmas condições causam um efeito repulsivo considerável.

## REFERÊNCIAS

- ARINAMINPATHY, Y.; SANSOM, M. S. P.; BIGGIN, P. C. Binding Site Flexibility: Molecular Simulation of Partial and Full Agonists within a Glutamate Receptor. **Mol. Pharm.**, vol. 69, p. 11-18, 2006.
- ARMSTRONG, N.; SUN, Y.; CHEN, G. Q.; GOUAUX, E. Structure of a glutamate-receptor ligand-binding core in complex with kainite. **Lettes to Nature**, vol. 395, p. 913-917, 1998.
- ARMSTRONG, N.; GOUAUX, E. Mechanisms for activation and antagonism of an AMPA-sensitive glutamate receptor: crystal structures of the GluR2 ligand binding core. **Neuron**, vol. 28, p. 165-181, 2000.
- DEMING, D.; CHENG, Q.; JAYARAMAN, V. Is the Isolated Ligand Binding Domain a Good Model of the Domain in the Native Receptor? **J. Biol. Chem.**, vol. 278, p. 17589-17592, 2003.
- MARTINS, A. C. V. **Explicando *Ab initio* a Intensidade de Ativação e Antagonismo do Receptor Glutamatérgico GluR2**. 2012. 168 p. Dissertação (Mestrado em Química), Programa de Pós-Graduação em Química, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2012.
- NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de Bioquímica de Lehninger**. 5<sup>a</sup> Ed., Porto Alegre, Brasil, Editora Artmed, 2009.
- PØHSGAARD, J.; FRYDENVANG, K.; MADSEN, U.; KASTRUP, J. S. Lessons from more than 80 structures of the GluA2 ligand-binding domain in complex with agonists, antagonists and allosteric modulators. **Neuropharmacology**, vol. 60, p. 135-150, 2011.
- SAHAI, M. A.; BIGGIN, P. C. Quantifying Water-Mediated Protein-Ligand Interactions in a Glutamate Receptor: A DFT Study. **J. Phys. Chem. B**, vol. 115, p. 7085-7096, 2011
- SPERANSKIY, K.; KURNIKOVA, M. On The Binding Determinants of the Glutamate Agonist with the Glutamate Receptor Ligand Binding Domain. **Biochemistry**, vol. 44, p. 11508-11517, 2005.
- VIJAYAN, R.; SAHAI, M. A.; CZAJKOWSKI, T.; BIGGIN, P. C. A comparative analysis of the role of water in the binding pockets of ionotropic glutamate receptors. **Phys. Chem. Chem. Phys.**, vol. 12, p. 14057-14066, 2010.

# CAPÍTULO 4

## Conclusões e Perspectivas



---

Os resultados apresentados nesta dissertação mostram-se promissores, confirmando dados experimentais e acrescentando novas informações a respeito da interação GluR2-ligante. A relevância de vários resíduos proteicos foi confirmada, enquanto que contestada para outros resíduos. Esse trabalho é apenas o primeiro passo no estudo da sinapse glutamatérgica e suas conclusões são apresentadas a seguir juntamente com as perspectivas de novos estudos.

#### 4.1 Conclusões

O presente trabalho reforça o papel de simulações computacionais no nível quântico como uma valiosa ferramenta para entender como ocorre a interação GluR2-ligante, a diferenciar, por meio dos valores de energia de interação, agonistas de antagonistas e auxiliar no desenvolvimento de novos medicamentos visando o sistema estudado. A metodologia apresentada permitiu um estudo detalhado, no nível da teoria do funcional da densidade (DFT), da interação da GluR2 com ligantes de interesse escolhidos variando-se a distância dos mesmos ao centroide do ligante. Os procedimentos desenvolvidos permitiram, inclusive, determinar a relevância de cada resíduo de aminoácido para a interação do glutamato, agonistas (no caso, AMPA e cainato) e antagonistas (no caso, o DNQX) com GluR2. Com o estudo realizado, também foi possível calcular a interação dos ligantes com GluR2, e quantificar as ligações mais fortes e mais fracas.

A análise da energia de interação dos ligantes complexados com a GluR2, aqui apresentada, tem uma boa correlação com estudos farmacológicos, cristalográficos e computacionais realizados previamente, sendo o funcional GGA+D melhor que o LDA. Os resultados apontam para uma interação da GluR2 com os agonistas glutamato e AMPA superior a com o agonista parcial cainato que é superior à interação com o antagonista DNQX.

A energia total associada à interação ligante-GluR2 é demonstrada se correlacionar com o grau de agonismo e antagonismo (o que explica resultados experimentais) somente quando uma distância suficiente grande aos centroides é considerada. Isto significa que o sítio de ligação dos ligantes a GluR2 não pode ser caracterizado como sendo determinado pelos vizinhos mais próximos (distantes  $< 4 \text{ \AA}$  dos ligantes), mas que resíduos pós-próximos (aqueles localizados mais distantes do que os resíduos próximos) podem contribuir de forma bastante efetiva para a energia total de interação, principalmente quando são carregados. A



---

metodologia desenvolvida permite se estudar *in silico* o efeito de mutações em GuR2 no seu agonismo e antagonismo, assim como o *design* de derivativos do AMPA, cainato e DNQX com características específicas desejadas ( a serem comprovadas farmacológica, bioquímica e clínica).

Considerando o raio de 10 Å e de acordo com os cálculos realizados adotando-se o funcional GGA+D, o AMPA interage mais fortemente com a GluR2 tendo uma energia de interação de aproximadamente -290 kcal/mol, enquanto que o glutamato tem uma energia de interação de cerca de -270 kcal/mol, já o cainato interage com a proteína com energia de aproximadamente -240 kcal/mol e o antagonista DNQX interage com energia de -90 kcal/mol. Esse resultado mostra uma diferença considerável na interação da GluR2 com agonistas e antagonistas.

A principal vantagem da metodologia proposta aqui é a possibilidade de avaliar quais os resíduos de aminoácidos contribuem mais intensamente para a estabilização do complexo GluR2-ligante, e verificar as divergências que ocorrem entre os na forma de interação com agonistas e antagonistas, que pode ser muito útil para fins de concepção de medicamentos. Para os agonistas do receptor estudado, os resíduos que se mostraram importantes em todos os casos foram a Arg485, Gly653, Ser654 e Thr655. Dentre estes, a Arg485 é o mais importante, corroborando com estudos anteriores. A novidade é a aparição da Gly653 como resíduo importante para a interação GluR2-agonista, embora este não faça ligação de hidrogênio com os agonistas. Já outros resíduos, embora interajam direto com os agonistas por ligações de hidrogênio, não tiveram energias de interação tão relevantes, como a Pro478, a Ser652, o Glu705 e a Thr480. Este último resíduo mostrou-se relevante apenas para interações com o AMPA. De modo geral, para os agonistas, os outros resíduos relevantes são pós-próximos e possuem carga.

A forma de interação do antagonista DNQX mostrou-se bem diferente da dos agonistas. Em sua maioria os resíduos relevantes não possuem carga, porém as interações mais importantes ocorrem com a Arg485 e com o Glu705. Todos os outros resíduos relevantes pertencentes até o raio de 6 Å são não carregados e apenas dois, Tyr450 e Pro478, confirmam as análises feitas pela literatura (ARMSTRONG, GOUAUX, 2000). Outros resíduos tidos como importantes são Leu479, Leu498 e Met708. Esse primeiro passo, revela um panorama da forma como a GluR2 interagem com agonistas e antagonistas e pode ajudar no desenho de novos compostos que interajam com essa proteína.

## 4.2 Perspectivas

Esta dissertação é apenas um primeiro passo no estudo do sistema glutamatérgico que gerou novas perspectivas e possibilidades de estudos a serem desenvolvidos. Sabe-se que o estado de protonação interfere diretamente na forma como os compostos interagem e para uma boa representação do sistema faz-se necessário saber a protonação do composto de interesse nas condições desejadas. Assim, um dos aspectos que será investigado posteriormente é a obtenção, experimental, dos pKa para os compostos AMPA, cainato e DNQX e realizar o estudo com MFCC para o AMPA no estado de protonação sugerido pelo programa Marvin Sketch 5.3.2 para o pH igual a 7,3.

Assim como a protonação, a constante dielétrica do meio interfere consideravelmente na interação entre substâncias. Os resultados apresentados foram obtidos considerando-se a constante dielétrica igual a zero, ou seja, a constante dielétrica do vácuo. Para aproximar o estudo da realidade do sistema deve-se considerar a constante dielétrica no interior do sítio de ligação da GluR2. Em seu trabalho Guest *et al.* (2011) mostraram o comportamento da constante dielétrica em um sistema proteico e seus resultados são apresentados na Figura 4.1.

Analisando os gráficos apresentados na Figura 4.1, fica perceptível que na superfície proteica os valores da constante dielétrica aproximam-se dos valores para a água e no interior da proteína cai drasticamente. Dessa forma, pretende-se repetir os cálculos com MFCC considerando vários valores de constante dielétrica, buscando o valor que mais se aproxima da realidade do sítio de interação da GluR2.

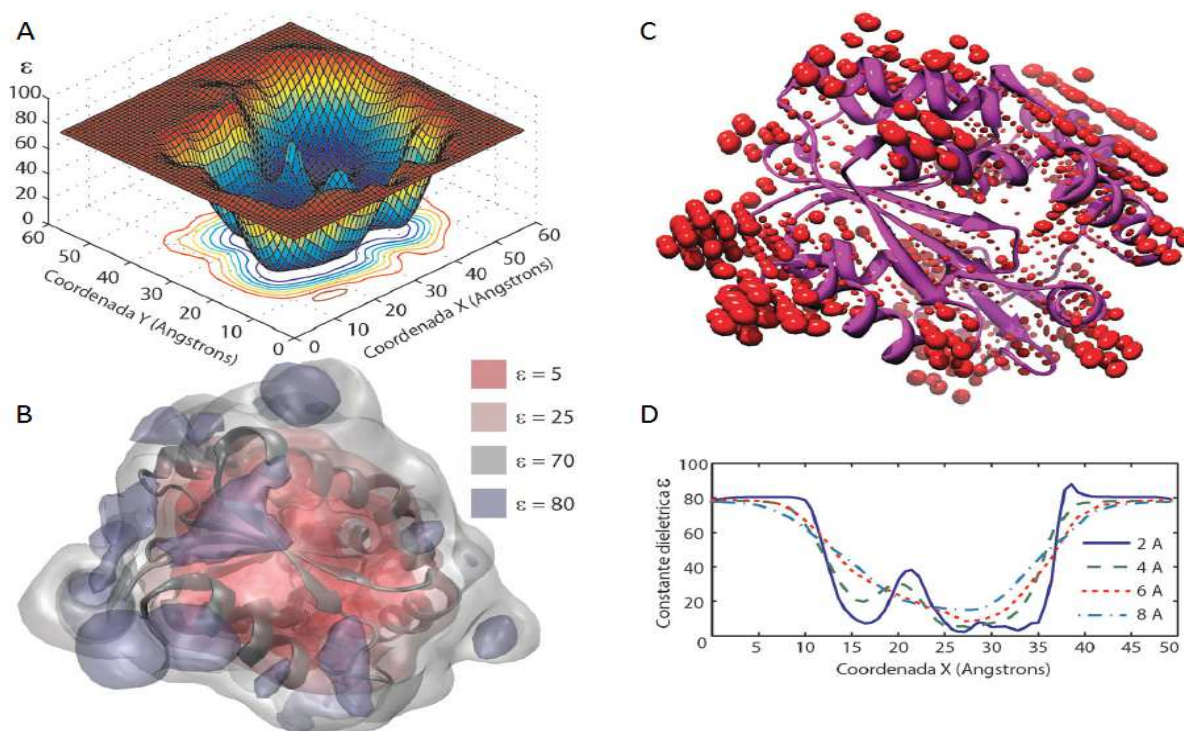
Outra questão a ser considerada é a correção, por meio de cálculos quânticos, das posições das moléculas de água presentes no sítio de interação. Trabalhos anteriormente citados (ARINAMINPATHY *et al.*, 2006 ;VIJAYAN *et al.*, 2010) mostram que apenas uma das moléculas de água presente no sítio de interação não sofre grande variação na sua posição durante dinâmica molecular. Deste modo, é interessante investigar posições mais estáveis para as águas do sítio de ligação, o que pode melhorar a interação proteína ligante.

A abordagem do MFCC também pode ser aplicada no estudo da interação da GluR2 com outros agonistas, agonistas parciais e antagonistas para buscar uma melhor definição da forma de interação com a GluR2. O que ajudaria a determinar um perfil mais detalhado para a forma como cada tipo de ligante interage com a proteína. Para tanto, pode-se aproveitar da diversidade de dados cristalográficos do DIL da GluR2 co-cristalizado com diversos de seus agonistas e antagonistas que são apresentados nas Tabelas 4.1 e 4.2. Do mesmo modo, o

estudo pode ser expandido para os diferentes tipos de receptores ionotrópicos de glutamato (receptores de NMDA, AMPA e cainato) com dados cristalográficos já disponíveis (ver Tabelas 4.1 a 4.3), possibilitando uma comparação entre eles e sua forma de interação com o glutamato.

Sabe-se que os receptores de glutamato estão relacionados a várias desordens do SNC, portanto há o interesse de estudar a interação destes receptores, não só com agonistas e antagonistas, como também com seus moduladores alostéricos (Tab. 4.1 a 4.3). O modulador alostérico é um ligante que causa o aumento ou diminuição a ação de um agonista ou antagonista primários ligando-se a um sítio diferente do receptor proteico. Entender os efeitos de moduladores alostéricos sobre a atividade dos receptores surge como mais uma perspectiva de trabalho. Indo pelo mesmo caminho, o estudo de antipsicóticos é outra possibilidade, visto que receptores NMDA estão relacionados à esquizofrenia, desordem tratada com este tipo de fármaco.

Figura 4.1 – Variação da constante dielétrica em sistema proteico. A função dielétrica da adenilato-quinase (1AKY) variando espacialmente em (A), (B) e (C). (A) A constante dielétrica escalar efetiva num plano horizontal através do centro geométrico da proteína. (B) Contornos dielétricos em torno da estrutura 1AKY, mostrando as superfícies de  $\epsilon = 5, 25, 70$  e  $80$ . Regiões dentro dos glóbulos azuis têm constantes dielétricas maior do que a da água. (C) Representação da constante dielétrica anisotrópica  $\epsilon$ . Em (D) o efeito do raio da cavidade da esfera,  $\alpha$ , sobre a função dielétrica calculada. Plots são tomados em uma linha através do centro geométrico da ubiquitina (1UBQ), para  $\alpha = 2, 4, 6$  e  $8 \text{ \AA}$ .



Fonte: Guest *et al.*, 2011.

Tabela 4.1 – Estruturas de raio-X do GluR-DIL e seus ligantes - Parte 1. Na coluna Funcional da Tabela, “apo” é a proteína no estado apo, “a” significa agonista, “ant” é antagonista e “mod” é modulado alostérico.

Tipo	PDB cod.	Ligante(s)	Funcional	Mutante(s)
GluR0	1IIW		apo	
GluR0	1II5	Glutamic acid (1)	a	
GluR0	1IIT	L-Serine	a	
GluR0	2PYY	Glutamic acid (1)	a	
GluA2	1FTO		apo	
GluA2	1MXV	Zn <sup>2+</sup>	apo	
GluA2	1MXW	Zn <sup>2+</sup>	apo	
GluA2	1MXX	Zn <sup>2+</sup>	apo	
GluA2	1MXY	Zn <sup>2+</sup>	apo	
GluA2	1MXZ	Zn <sup>2+</sup>	apo	
GluA2	1MY0	Zn <sup>2+</sup>	apo	
GluA2	1MY1	Zn <sup>2+</sup>	apo	
GluA2	1FTJ	Glutamic acid (1)	a	
GluA2	1FTK	Kainic acid (17)	a	
GluA2	1FW0	Kainic acid (17)	a	
GluA2	1LB8	AMPA (10)	a	L483Y, flop
GluA2	1LBB	Kainic acid (17)	a	N754D
GluA2	1M5B	2-Me-TetAMPA (8)	a	
GluA2	1M5C	Br-HIBO (13)	a	Flop
GluA2	1M5D	Br-HIBO (13)	a	Flop
GluA2	1M5E	ACPA (10)	a	Flop
GluA2	1M5F	ACPA (10)	a	Flop
GluA2	1MM6	Quisqualate (14)	a	
GluA2	1MM7	Quisqualate (14), Zn <sup>2+</sup>	a	
GluA2	1MQD	(S)-Des-Me-AMPA (5), Li <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	a	
GluA2	1MQG	Iodo-willardiine (15e)	a	
GluA2	1MQH	Bromo-willardiine (15d)	a	
GluA2	1MQI	Fluoro-willardiine (15b)	a	
GluA2	1MQJ	Willardiine (15a)	a	
GluA2	1MS7	(S)-Des-Me-AMPA (5), Zn(OAc) <sub>2</sub>	a	
GluA2	1MXU	Bromo-willardiine (15d)	a	
GluA2	1MY2	AMPA	a	
GluA2	1MY3	Bromo-willardiine (15d)	a	
GluA2	1MY4	Iodo-willardiine (15e)	a	
GluA2	1NOT	ATPA (35)	a	
GluA2	1NNK	ATPA (6)	a	
GluA2	1NNP	ATPA (6)	a	
GluA2	1P1N	Kainic acid (17)	a	L138T
GluA2	1P1O	Quisqualate (14)	a	L138T
GluA2	1P1Q	AMPA (4)	a	L138T
GluA2	1P1U	AMPA (4)	a	L138T
GluA2	1P1W	AMPA (4)	a	L94Y, L138T
GluA2	1SYH	CPW399 (16)	a	
GluA2	1SYI	CPW399 (16)	a	Y702F
GluA2	1WVJ	4-AHCP (11)	a	
GluA2	1XHY	Kainic acid (17)	a	Y702F, flop
GluA2	2AIX	Thio-ATPA (7)	a	
GluA2	2A14	Quisqualate (14)	a	
GluA2	2ANJ	Kainic acid (17)	a	Y61W
GluA2	2GFE	Glutamic acid (1)	a	A476E S673D
GluA2	2I3V	Glutamic acid (1)	a	G725C
GluA2	2I3W	Glutamic acid (1)	a	G729C
GluA2	2P2A	BnTetAMPA (9)	a	
GluA2	2UXA	Glutamic acid (1)	a	Flip
GluA2	3B6Q	Glutamic acid (1)	a	T686A
GluA2	3B6T	Quisqualate (14)	a	T686A
GluA2	3B6W	Glutamic acid (1)	a	T686S
GluA2	3BFT	TDPA (12)	a	
GluA2	3BFU	TDPA (12)	a	
GluA2	3DP6	Glutamic acid (1)	a	
GluA2	3LSL	Glutamic acid (1), piracetam (74)	a	
GluA2	2CMO	Glutamic acid (1), NS-1209 (47)	a, ant	
GluA2	3KGC	Glutamic acid (1), Z-200775 (44), LY-404187 (71)	a, ant, mod	
GluA2	1LBC	Glutamic acid (1), cyclothiazide (61)	a, mod	N775S
GluA2	2AL5	Fluoro-willardiine (15b), aniracetam (75)	a, mod	
GluA2	2XHD	Glutamic acid (1), 73	a, mod	
GluA2	3BBR	Glutamic acid (1), 70	a, mod	
GluA2	3H6T	Glutamic acid (1), cyclothiazide (61)	a, mod	
GluA2	3H6U	Glutamic acid (1), NS-1493 (67)	a, mod	
GluA2	3H6V	Glutamic acid (1), NS-5206 (68)	a, mod	
GluA2	3H6W	Glutamic acid (1), NS-5217 (69)	a, mod	
GluA2	3IJO	Glutamic acid (1), althiazide (65)	a, mod	
GluA2	3IJX	Glutamic acid (1), IDRA-21 (64)	a, mod	
GluA2	3IK6	Glutamic acid (1), chlorothiazide (66)	a, mod	

Fonte: Stawski *et al.*, 2010.



Tabela 4.2 – Estruturas de raios-X do GluR-DIL e seus ligantes - Parte 2. Na coluna Funcional da Tabela, “apo” é a proteína no estado apo, “a” significa agonista, “ant” é antagonista e “mod” é modulado alostérico.

Tipo	PDB cod.	Ligante(s)	Funcional	Mutante(s)
GluA2	3IL1	Glutamic acid (1), IDRA-21 (64)	a, mod	
GluA2	3ILT	Glutamic acid (1), trichlormethiazide (63)	a, mod	
GluA2	3ILU	Glutamic acid (1), hydroflumethiazide (62)	a, mod	
GluA2	3LSF	Glutamic acid (1), piracetam (74)	a, mod	
GluA2	1LB9	DNQX (40)	ant	L483Y
GluA2	3B7D	CNQX (41)	ant	
GluA2	3H03	UBP277 (36a)	ant	
GluA2	3H06	UBP282 (36b)	ant	
GluA2 (functional receptor)	3KG2	ZK-200775 (44)	ant	N241E, N385D, N392Q, K410A, E413A, M414A, E416A, C589A
GluA2	3BKI	FQX (46)	ant, photoproduct	
GluA3	3DLN	Glutamic acid (1)	a	
GluA3	3DP4	AMPA (4)	a	
GluA3	3M3K	Glutamic acid (1)	a	Flop
GluA3	3M3L	Glutamic acid (1), PEPA (72)	a, mod	
GluA4	3EN3	Kainic acid (17)	a	
GluA4	3FAS	Glutamic acid (1)	a	Flip
GluA4	3FAT	AMPA (4)	a	Flip
GluA4	3KEI	Glutamic acid (1)	a	L651 V
GluA4	3KFM	Kainic acid (17)	a	L651 V
GluK1	3C31	Li <sup>+</sup>	apo	
GluK1	3C32	Na <sup>+</sup>	apo	
GluK1	3C33	K <sup>+</sup>	apo	
GluK1	3C34	Rb <sup>+</sup>	apo	
GluK1	3C35	Cs <sup>+</sup>	apo	
GluK1	3C36	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	apo	
GluK1	1TXF	Glutamic acid (1)	a	
GluK1	1YCJ	Glutamic acid (1)	a	
GluK1	2F36	Glutamic acid (1)	a	
GluK1	2PBW	Domoic acid (18)	a	
GluK1	2WKY	4-AHCP (11)	a	
GluK1	2ZNS	Glutamic acid (1)	a	
GluK1	2ZNT	Dysisibaine A (26a)	a	
GluK1	2ZNU	Dysisibaine A (26a)	a	
GluK1	3FUZ	Glutamic acid (1)	a	
GluK1	3FV1	Dysisibaine A (26a)	a	
GluK1	3FV2	Neodysisibaine A (26b)	a	
GluK1	3FVG	MSVIII-19 (26c)	a	
GluK1	3FVK	8-Deoxy-neodysisibaine A (26d)	a	
GluK1	3FVN	9-Deoxy-neodysisibaine A (26e)	a	
GluK1	3FVO	8-Epi-neodysisibaine A (26f)	a	
GluK1	3GBA	Dysisibaine A (26a)	a	
GluK1	3GBB	MSVIII-19 (26c)	a	
GluK1	1VSO	ATPO (35)	ant	
GluK1	2F34	UBP-310 (36d)	ant	
GluK1	2F35	UBP-302 (36c)	ant	
GluK1	2OJT	UBP-310 (36d)	ant	
GluK1	2Q51	UBP-315 (36e)	ant	
GluK1	2Q52	UBP-318 (36g)	ant	
GluK1	2Q53	UBP-316 (36f)	ant	
GluK1	2Q54	LY-466195 (37)	ant	
GluK2	1S7Y	Glutamic acid (1)	a	
GluK2	1S9T	Quisqualate (14)	a	
GluK2	1SD3	(2S,4R)-4-Methyl glutamic acid (21)	a	
GluK2	1TT1	Kainic acid (17)	a	
GluK2	1YAE	Domoic acid (18)	a	
GluK2	2I0B	Glutamic acid (1)	a	K494E, I749L, Q753K, E757Q
GluK2	2I0C	Glutamic acid (1)	a	S775E, Y490C, L752C (crosslinked)
GluK2	3G3F	Glutamic acid (1)	a	
GluK2	3G3G	Glutamic acid (1)	a	K665R
GluK2	3G3H	Glutamic acid (1)	a	K665R, I749L, Q753K
GluK2	3G3I	Glutamic acid (1)	a	I442H, K494E, I749L, Q753K
GluK2	3G3J	Glutamic acid (1)	a	I442H, K494E, K665R, I749L, Q753K
GluK2	3G3K	Glutamic acid (1)	a	I442H, K494E, K665R, I749L, Q753K, E757Q
GluD2	2V3T		apo	
GluD2	2V3U	D-Serine (3)	a	
GluN1	1PB7	Glycine (2)	a	
GluN1	1PB8	D-Serine (3)	a	
GluN1	1PB9	D-cycloserine (27)	a	
GluN1	1Y1M	Cycloleucine (31)	a	
GluN1	1Y1Z	ACBC (30)	a	

Fonte: Stawski *et al.*, 2010.

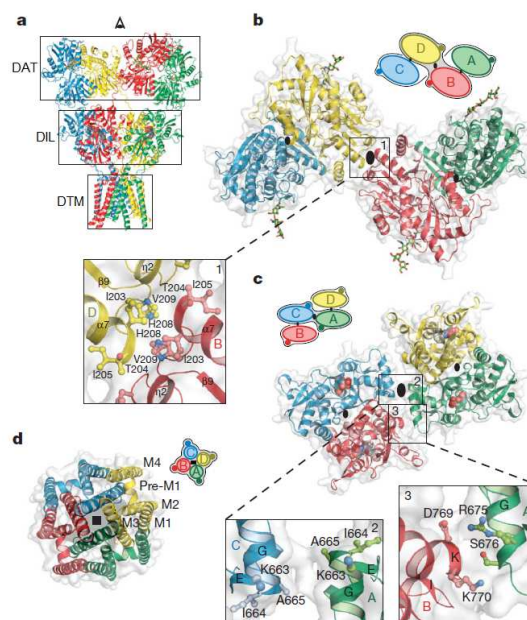
Tabela 4.3 – Estruturas de raios-X do GluR-DIL e seus ligantes - Parte 3. Na coluna Funcional da Tabela, “apo” é a proteína no estado apo, “a” significa agonista, “ant” é antagonista e “mod” é modulado alostérico.

Tipo	PDB cod.	Ligante(s)	Funcional	Mutante(s)
GluN1	1Y20	ACPC (29)	a	
GluN1	1PBQ	5,7-Dichlorokynurenic acid (54)	ant	
GluN1/GluN2A	2A5T	Glycine (2), glutamic acid (1)	a, a	
GluN2A	2A5S	Glutamic acid (1)	a	
GluA2 ATD	3H5V			
GluA2 ATD	3H5W			
GluK2 ATD	3H6G			
GluK2 ATD	3H6H			
GluA2 ATD	3HSY			

Fonte: Stawski *et al.*, 2010.

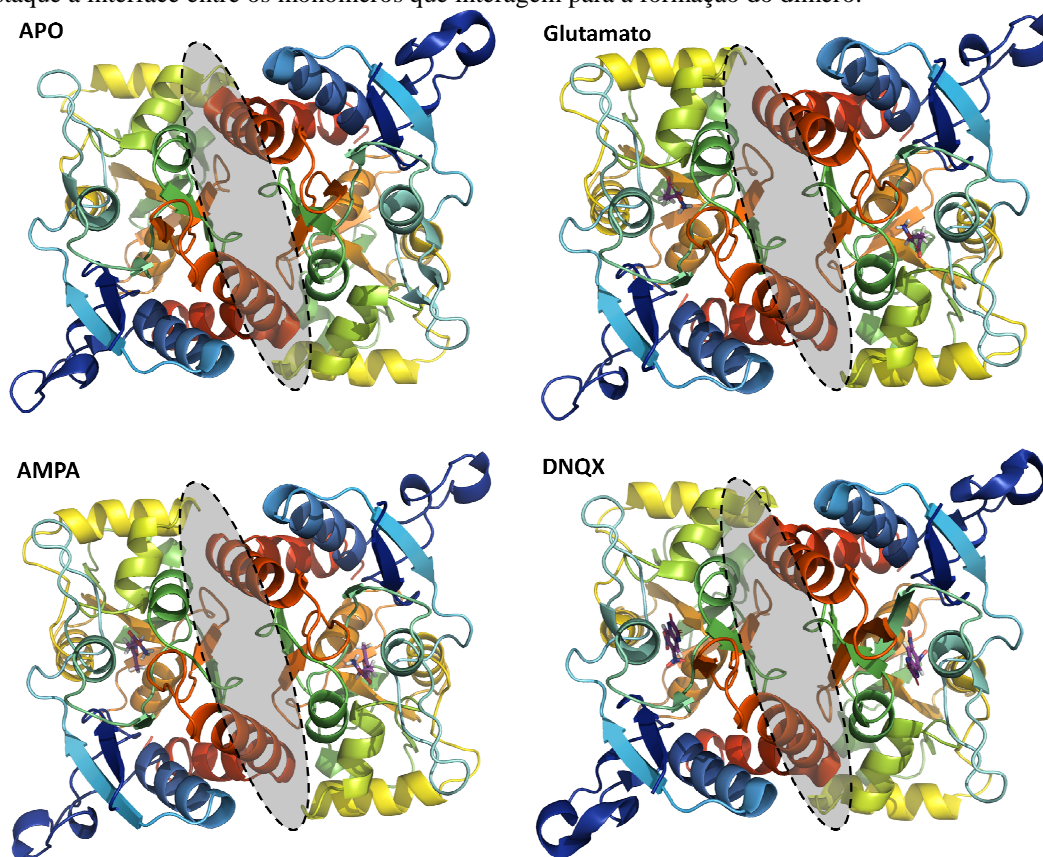
Paralelamente, entender a construção da proteína pode elucidar o seu mecanismo de ativação e dessensibilização. Possuindo a proteína uma estrutura quaternária, surge o interesse em estudar a interação entre os monômeros que formam os dímeros e entre os dímeros que formam o tetrâmero. A Figura 4.2 mostra os diversos pontos de interação entre os monômeros que formam a proteína e os dímeros do DIL da GluR2, ligados a diferentes ligantes, são mostrados na Figura 4.3.

Figura 4.2 – Estrutura e organização dos domínios dos receptores de glutamato. As elipses pretas em (b) mostram os pontos de interação entre DAT das subunidades e (c), e entre os DIL.



Fonte: Sobolevsky *et al.*, 2009.

Figura 4.3 – Dímero do DIL da GluR2 nos estados Apo, ligado a glutamato, ligado a AMPA e ligado à DNQX. Em destaque a interface entre os monômeros que interagem para a formação do dímero.

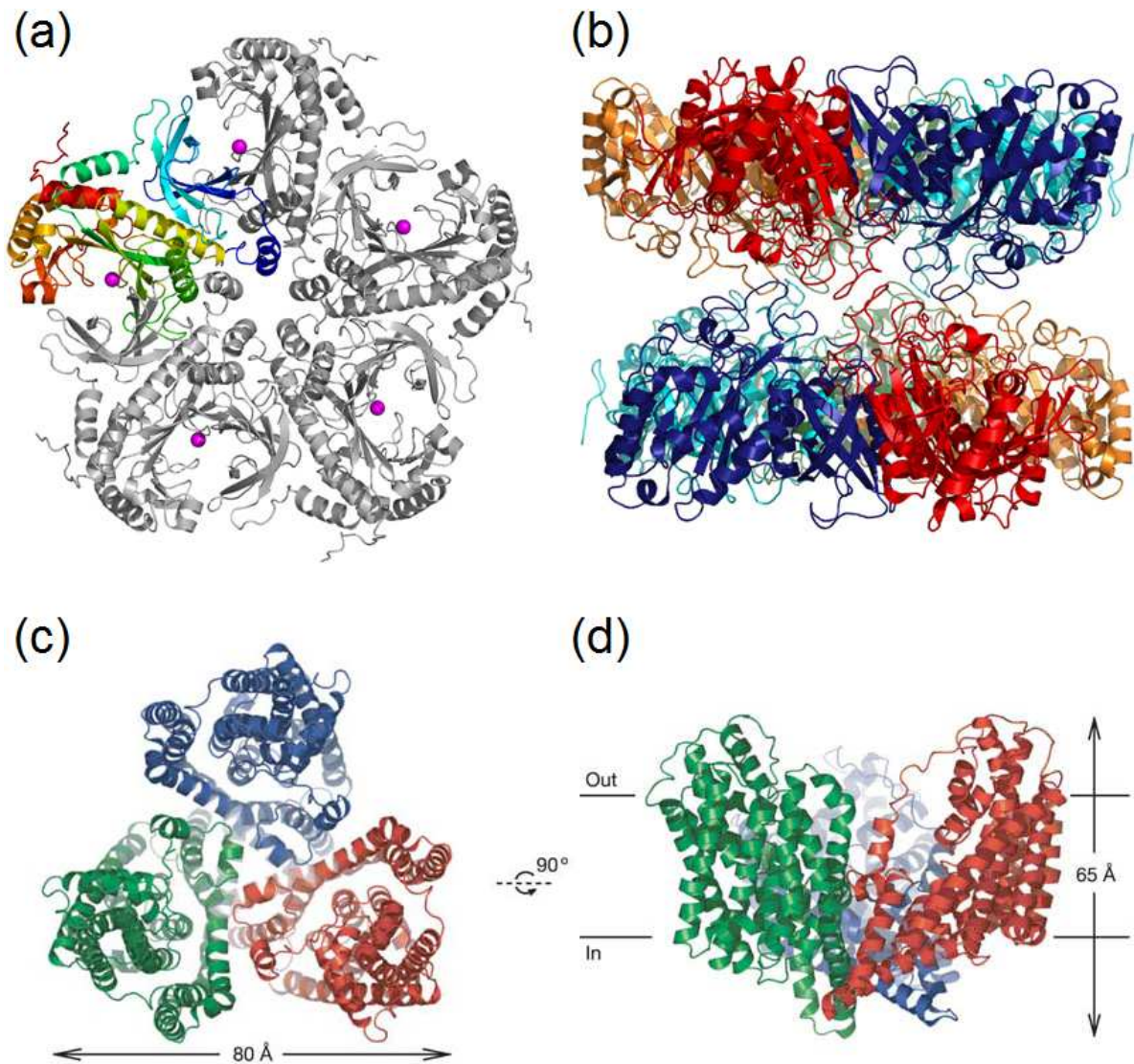


Fonte: Martins, 2012. Figuras montadas a partir dos dados cristalográficos obtidos por Armstrong e Gouaux (2000) e auxílio do programa Pymol.

Mais uma ideia é expandir o estudo com MFCC a outras proteínas envolvidas na sinapse glutamatérgica, tais como transportadores de glutamato, vesículas transportadoras e enzimas responsáveis pelo equilíbrio glutamina-glutamato. Para isso, aproveita-se de todas as vantagens da estrutura dessas proteínas que já foram cristalizadas e estão disponíveis no *Protein Data Bank*. Na Figura 4.4 tem-se a ilustração da enzima Glutamina Sintetase (CfGS) e da proteína transportadora de glutamato (Glt<sub>Ph</sub>7H) que é responsável pelo transporte do glutamato do meio extracelular para o meio intracelular, ambas com dados cristalográficos disponíveis no banco de dados.



Figura 4.4 – A representação em *cartoon* de outras proteínas que atuam na sinapse glutamatérgica. A estrutura da Glutamina Sintetase (CfGS) é apresentada em (a) e (b). Em (a) é mostrado o pentâmero da CfGS e em (b), o decâmero da CfGS em outro ângulo. E em (c) e (d) é apresentada, em dois ângulos de visão distintos, a estrutura do transportador de glutamato Glt<sub>Ph</sub>7H.



Fonte: Yernool *et al.*, 2004 e Krajewski *et al.*, 2008.

Percebe-se que esta dissertação, além dos resultados obtidos, levantou a novas perspectivas de trabalhos que já estão em processo de realização. Em longo prazo, esta dissertação constitui o primeiro passo em direção a simulação computacional da sinapse nervosa.

---

**REFERÊNCIAS**

ARINAMINPATHY, Y.; SANSOM, M. S. P.; C. BIGGIN, P. C. Binding site flexibility: molecular simulation of partial and full agonists within a glutamate receptor, **Mol. Pharmac.**, vol. 69, p. 11-18, 2006.

ARMSTRONG, N.; GOUAUX, E. Mechanisms for activation and antagonism of an AMPA-sensitive glutamate receptor: crystal structures of the GluR2 ligand binding core. **Neuron**, vol. 28, p. 165-181, 2000.

GUEST, W. C.; CASHMAN, N. R.; PLOTKIN, S. S. A theory for the anisotropic and inhomogeneous dielectric properties of proteins. **Phys. Chem. Chem. Phys.**, vol. 13, p. 6286-6295, 2011.

KRAJEWSKI, W. W.; COLLINS, R.; HOLMBERG-SCHIAVONE, L.; JONES, T. A.; KARLBERG, T.; MOWBRAY, S. L. Crystal Structures of Mammalian Glutamine Synthetases Illustrate Substrate-Induced Conformational Changes and Provide Opportunities for Drug and Herbicide Design. **J. Mol. Biol.**, vol. 375, p. 217-228, 2008.

MARTINS, A. C. V. **Explicando *Ab initio* a Intensidade de Ativação e Antagonismo do Receptor Glutamatérgico GluR2**. 2012. 168 p. Dissertação (Mestrado em Química), Programa de Pós-Graduação em Química, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2012.

STAWSKI, P.; JANOVJAK, H.; TRAUNER, D. Pharmacology of ionotropic glutamate receptors: A structural perspective. **Bioorg. Med. Chem.**, vol. 18, p. 7759-7772, 2010.

VIJAYAN, R.; SAHAI, M. A.; CZAJKOWSKI, T.; BIGGIN, P. C. A comparative analysis of the role of water in the binding pockets of ionotropic glutamate receptors. **Phys. Chem. Chem. Phys.**, vol. 12, p. 14057-14066, 2010.

YERNOOL, D.; BOUDKER, O.; JIN, Y.; GOUAUX, E. Structure of a glutamate transporter homologue from *Pyrococcus horikoshii*. **Nature**, vol. 431, 811-818, 2004.

# APÊNDICE A

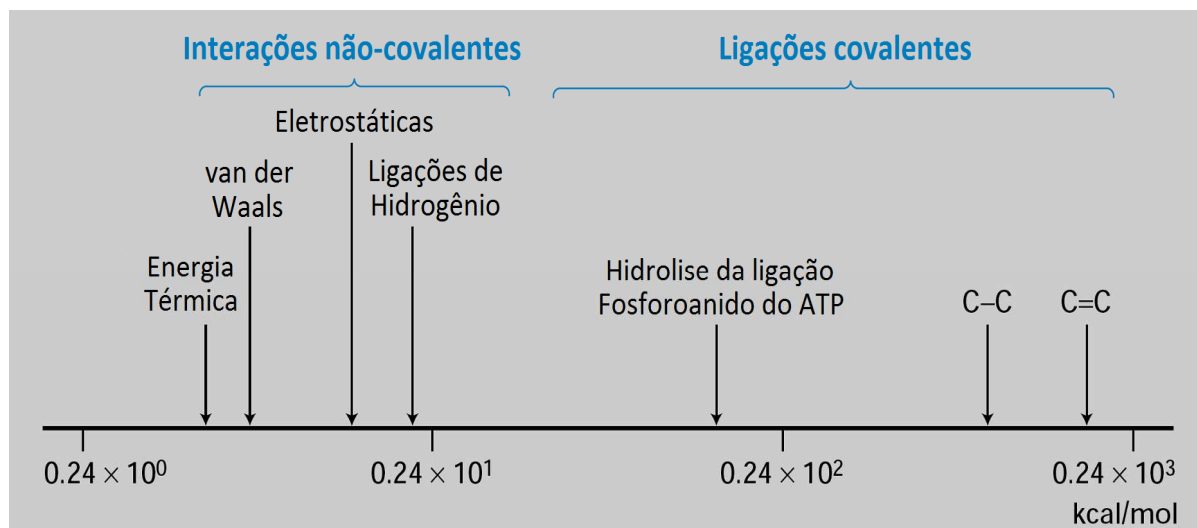
**Do Sistema de Órgãos  
do Corpo Humano  
aos Neurotransmissores**

---



O corpo humano, que é constituído por um sistema de órgãos, consiste na fase adulta de cerca de 100 trilhões de células (a unidade básica da vida), organizadas e adaptadas biologicamente para realizar as mais diversas funções. Em termo de átomos, ele é formado de 38,8 kg (25,5%) de oxigênio, 10,9 kg (9,5%) de carbono, 6,0 kg (63%) de hidrogênio, 1,9 kg (1,4%) de nitrogênio, 1,2 kg (0,3%) de cálcio, 0,6 kg (0,2%) de fósforo, 0,2 kg (0,06%) de potássio e outros elementos traços. Estes átomos dão origem a uma miríade de moléculas (açúcares, aminoácidos, DNA, vitaminas, etc), de forma que o conteúdo celular é uma sopa aquosa temperada com pequenas/grandes moléculas e íons de vários tipos. As três mais abundantes macromoléculas biológicas – proteínas, ácidos nucleicos e polissacarídeos – são todos polímeros compostos por pequenas moléculas orgânicas idênticas ou ligeiramente diferentes (monômeros) que se acoplam através de ligações covalentes múltiplas e interagem entre si através de ligações não-covalentes, cujas energias relativas estão apresentadas na Figura A1 deste Apêndice<sup>a</sup>. A vida das células depende de milhares de interações e reações que estão concatenadas uma com a outra no tempo e espaço sob a influência de instruções genéticas e do meio-ambiente.

Figura A1 – Energias relativas das ligações covalentes e das interações não-covalentes.



Fonte: Lodish *et al.*, 2004

<sup>a</sup> O Apêndice A constitui um apanhado de textos das referências com o intuito de proporcionar ao leitor não especialista uma visão geral da temática da dissertação no contexto mais amplo da Neurociência.

## A1. Aminoácidos e Proteínas

Os blocos monoméricos de construção das proteínas são os aminoácidos (vinte são mais frequentes, mas existem alguns outros presentes nos seres vivos), todos eles sendo estruturalmente constituídos de um carbono central  $\alpha$  ( $C_\alpha$ ) ligado a quatro diferentes grupos químicos: um grupo amina ( $NH_2$ ), um grupo carboxílico ( $COOH$ ), um átomo de hidrogênio, e o que é denominado de cadeia lateral, ou grupo R, como pode ser visto na Figura A2. A ligação peptídica entre dois aminoácidos, reação entre o grupo carboxílico e o grupo amina com liberação de uma molécula de água, é que dá origem às proteínas. O estado de cargas de um aminoácido está associado às propriedades químicas dos mesmos, sendo que no vácuo eles são neutros, enquanto em meio aquoso são zwitteriônicos, isto é, ficam com  $COO(-)$  e  $NH_3(+)$ . No meio biológico, o estado de protonação dos grupos de átomos dos aminoácidos e de moléculas de interesse farmacológico depende do pH do meio.

As proteínas, que são as moléculas de trabalho das células, transportam o programa de atividades codificado pelos genes. Este programa requer o esforço coordenado de muitos tipos de proteínas, que inicialmente evoluíram desde moléculas rudimentares que facilitaram um número limitado de reações químicas. Gradualmente muitas destas proteínas primitivas evoluíram dando origem a uma ampla gama de enzimas capazes de catalisar um incrivelmente grande número de reações químicas intracelulares e extracelulares, com uma velocidade e especificidade a qual é impossível de se obter em um tubo de ensaio. Com a passagem do tempo, outras proteínas adquiriram habilidades especializadas, podendo ser agrupadas em classes funcionais abrangentes: proteínas estruturais, que fornecem a rigidez estrutural para a célula; proteínas de transporte, que controlam o fluxo de materiais através das membranas celulares; proteínas regulatórias, que agem como sensores e chaves para controlar a atividade proteica e a função genética; proteínas de sinalização, incluindo receptores na superfície das células e outras proteínas, que transmitem sinais externos para o interior das células; e proteínas motoras, que causam movimento.

Embora construídas pela polimerização de cerca de somente vinte aminoácidos em cadeias lineares (um peptídeo tem em geral 20-30 aminoácidos, e polipeptídeos duas ordens de grandeza mais, 4000 resíduos), as proteínas desempenham um incrível número de tarefas. A montagem de uma proteína é um processo complexo denominado de translação, que é ditado pela atuação de RNA mensageiros no ribossomo, com tríades de bases nucleicas (códon) traduzindo-se em aminoácidos. O tamanho de uma proteína ou polipeptídeo é

descrito através de sua massa em dalton (o dalton é uma unidade atômica de massa) ou de seu peso molecular (MW), que é um número adimensional. Uma proteína arranja-se (dobra-se) em uma forma única, que é estabilizada por ligações não-covalentes (ligações de hidrogênio, interações iônica, forças de Van Der Waals, e empacotamento hidrofóbico) entre regiões da sequência linear de aminoácidos.

Figura A2 – Vinte tipos de aminoácidos, suas cadeias e pesos moleculares (MW).

NÃO-POLAR, HIDROFÓBICOS		GRUPOS R	POLAR, SEM CARGA	
Alanina Ala A MM = 89	$\begin{matrix} ^- \text{OOC} \\   \\ \text{H}_3\text{N}^+ - \text{CH} - \text{CH}_3 \end{matrix}$		$\begin{matrix} \text{H} - \text{CH} - \text{COO}^- \\   \\ \text{N}^+ \text{H}_3 \end{matrix}$	Glicina Gly G MM = 75
Valina Val V MM = 117	$\begin{matrix} ^- \text{OOC} \\   \\ \text{H}_3\text{N}^+ - \text{CH} - \text{CH} \begin{matrix} / \text{CH}_3 \\ \backslash \text{CH}_3 \end{matrix} \end{matrix}$		$\begin{matrix} \text{HO} - \text{CH}_2 - \text{CH} - \text{COO}^- \\   \\ \text{N}^+ \text{H}_3 \end{matrix}$	Serina Ser S MM = 105
Leucina Leu L MM = 131	$\begin{matrix} ^- \text{OOC} \\   \\ \text{H}_3\text{N}^+ - \text{CH} - \text{CH}_2 - \text{CH} \begin{matrix} / \text{CH}_3 \\ \backslash \text{CH}_3 \end{matrix} \end{matrix}$		$\begin{matrix} \text{OH} \\   \\ \text{CH}_3 - \text{CH} - \text{CH} - \text{COO}^- \\   \\ \text{N}^+ \text{H}_3 \end{matrix}$	Treonina Thr T MM = 119
Isoleucina Ile I MM = 131	$\begin{matrix} ^- \text{OOC} \\   \\ \text{H}_3\text{N}^+ - \text{CH} - \text{CH} \begin{matrix} / \text{CH}_3 \\ \backslash \text{CH}_2 - \text{CH}_3 \end{matrix} \end{matrix}$		$\begin{matrix} \text{HS} - \text{CH}_2 - \text{CH} - \text{COO}^- \\   \\ \text{N}^+ \text{H}_3 \end{matrix}$	Cisteína Cys C MM = 121
Fenilalanina Phe F MM = 131	$\begin{matrix} ^- \text{OOC} \\   \\ \text{H}_3\text{N}^+ - \text{CH} - \text{CH}_2 - \text{C}_6\text{H}_5 \end{matrix}$		$\begin{matrix} \text{HO} - \text{C}_6\text{H}_4 - \text{CH}_2 - \text{CH} - \text{COO}^- \\   \\ \text{N}^+ \text{H}_3 \end{matrix}$	Tirosina Tyr Y MM = 181
Triptofano Trp W MM = 204	$\begin{matrix} ^- \text{OOC} \\   \\ \text{H}_3\text{N}^+ - \text{CH} - \text{CH}_2 - \text{C}_8\text{H}_6\text{N}_2 \end{matrix}$		$\begin{matrix} \text{NH}_2 \\   \\ \text{C} = \text{O} - \text{CH}_2 - \text{CH} - \text{COO}^- \\   \\ \text{N}^+ \text{H}_3 \end{matrix}$	Asparagina Asn N MM = 132
Metionina Met M MM = 149	$\begin{matrix} ^- \text{OOC} \\   \\ \text{H}_3\text{N}^+ - \text{CH} - \text{CH}_2 - \text{CH}_2 - \text{S} - \text{CH}_3 \end{matrix}$		$\begin{matrix} \text{NH}_2 \\   \\ \text{C} = \text{O} - \text{CH}_2 - \text{CH}_2 - \text{CH} - \text{COO}^- \\   \\ \text{N}^+ \text{H}_3 \end{matrix}$	Glutamina Gln Q MM = 146
Prolina Pro P MM = 115	$\begin{matrix} ^- \text{OOC} \\   \\ \text{CH} - \text{CH}_2 \\   \quad \quad \quad   \\ \text{HN} - \text{CH}_2 \quad \quad \quad \text{CH}_2 \end{matrix}$		<b>POLAR BÁSICOS</b> $\begin{matrix} \text{NH}_3^+ - \text{CH}_2 - (\text{CH}_2)_3 - \text{CH} - \text{COO}^- \\   \\ \text{N}^+ \text{H}_3 \end{matrix}$	Lisina Lys K MM = 146
Ác. aspártico Asp D MM = 133	<b>POLAR ÁCIDOS</b> $\begin{matrix} ^- \text{OOC} \\   \\ \text{H}_3\text{N}^+ - \text{CH} - \text{CH}_2 - \text{C}(=\text{O})\text{O}^- \end{matrix}$		$\begin{matrix} \text{NH}_2 \\   \\ \text{N}^+ \text{H}_2 = \text{C} - \text{NH} - (\text{CH}_2)_3 - \text{CH} - \text{COO}^- \\   \\ \text{N}^+ \text{H}_3 \end{matrix}$	Arginina Arg R MM = 174
Ác. glutâmico Glu E MM = 147	$\begin{matrix} ^- \text{OOC} \\   \\ \text{H}_3\text{N}^+ - \text{CH} - \text{CH}_2 - \text{CH}_2 - \text{C}(=\text{O})\text{O}^- \end{matrix}$		$\begin{matrix} \text{HN} = \text{C} - \text{CH}_2 - \text{CH} - \text{COO}^- \\   \quad \quad \quad   \\ \text{H} \quad \quad \quad \text{N}^+ \text{H}_3 \end{matrix}$	Histidina His H MM = 155

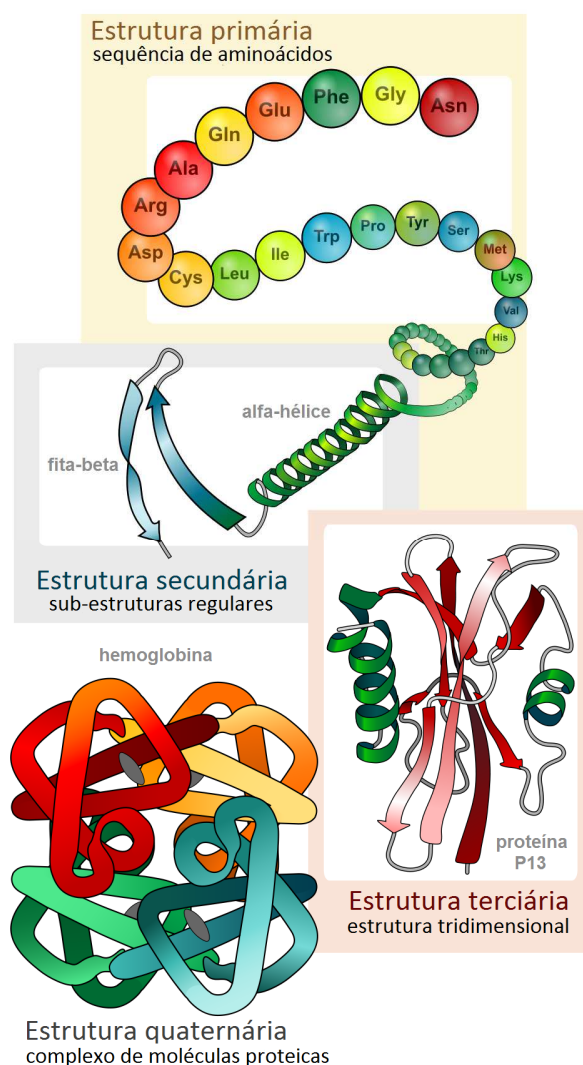
Fonte: Lodish *et al.*, 2004.



O arranjo espacial de uma proteína, *i.e.*, sua forma em três dimensões é a chave para a compreensão de sua função. Somente quando uma proteína está na sua estrutura tridimensional correta (ou conformação) é capaz de funcionar eficientemente. De acordo com o princípio estrutura-atividade, a função que uma proteína desempenha é determinada por sua estrutura. Em geral, uma proteína adota uma simples conformação, seu estado nativo, que para a vasta maioria delas é aquele de configuração (dobramento) mais estável.

A estrutura proteica pode ser observada de quatro distintas formas. A estrutura primária de uma proteína é simplesmente o arranjo linear (ou sequência) dos aminoácidos (resíduos) que a compõem. O segundo nível na hierarquia da estrutura de uma proteína, que é a sua estrutura secundária, consiste dos vários arranjos espaciais que resultam do dobramento de partes localizadas de uma cadeia polipeptídica, os principais sendo a alfa-hélice, a fita beta, e a volta em forma de U. Em média, 60% de uma cadeia polipeptídica existe como  $\alpha$ -hélices e fitas- $\beta$ , o restante sendo enrolamentos randômicos e voltas. A estrutura terciária de uma proteína é formada por motivos, que constituem combinações particulares de estruturas secundárias (em alguns casos os motivos podem ser associados a uma função específica). A estrutura quaternária é a estrutura tridimensional de uma proteína com multi-subunidades e como as subunidades se encaixam. Normalmente é encontrada em proteínas maiores que cerca de 15.000 MW (PURVES *et al.*, 2010). Uma exemplificação das quatro estruturas proteicas é mostrada na Figura A3.

Figura A3 – Estrutura primária, secundária, terciária e quaternária de uma proteína.



Fonte: [http://en.wikipedia.org/wiki/Protein\\_structure](http://en.wikipedia.org/wiki/Protein_structure)

Uma informação chave na compreensão de como as proteínas operam, é que sua função decorre da sua estrutura tridimensional, e que a estrutura tridimensional é especificada pela

sequência de aminoácidos. A Biologia Estrutural é o campo científico que utiliza técnicas como a cristalografia de raios-X, a espectroscopia de ressonância magnética nuclear (NMR) e a interferometria de polarização dual para determinar a estrutura das proteínas. As estruturas proteicas determinadas são depositadas em várias bases de dados, sendo a principal delas o Protein Data Bank (PDB), <<http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>>, que possui dados em 3D de proteínas e ácidos nucleicos enviados por biólogos e bioquímicos de todo o mundo, sendo portanto de domínio público e de uso livre. Assim, os dados de alta resolução para os neurotransmissores glutamato (1FTJ), AMPA (1FTM), cainato (1FW0) e DNQX (1FTL) co-cristalizados com o receptor GluR2 foram utilizados para a inicialização dos cálculos de bioquímica quântica (ARMSTRONG e GOUAUX, 2000).

## **A2. Os Órgãos do Corpo Humano**

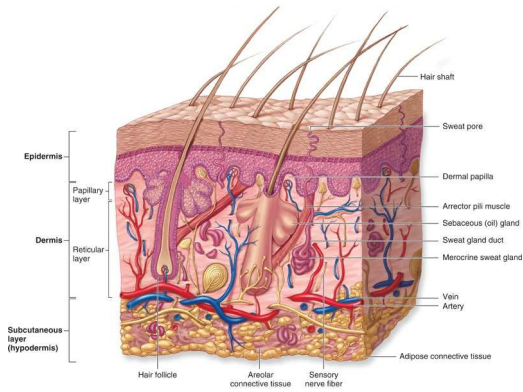
A Terra abriga alguns bilhões de seres humanos. Cada pessoa é um ser único, diferente de todos os outros seres em muitos aspectos, como é o caso da aparência externa. Mas o corpo humano é formado basicamente pelas mesmas estruturas e somos todos influenciados pelo ambiente em que vivemos. O funcionamento do corpo humano ocorre através de um sistema de órgãos (ver Figuras A4 e A5), que são:

- ▶ o tegumentar, que protege o corpo humano contra agentes externos, reveste todos os órgãos vivos e constitui barreira de proteção contra a entrada de vírus no ser vivo. Engloba a pele, pelos, unhas e glândulas, sendo composto por camadas como derme e epiderme (parte mais externa);
- ▶ o respiratório, que é o conjunto de órgãos responsáveis pelas trocas gasosas do organismo humano com o meio ambiente, ou seja a hematose pulmonar, possibilitando a respiração celular;
- ▶ o digestivo fornece ao corpo a maneira de processar os alimentos e transformar os nutrientes em energia. O sistema digestivo consiste da cavidade bucal, esôfago, estômago, pequeno intestino e grande intestino, terminando no colon e no ânus. Estas partes juntas formam o canal alimentar ou trato digestivo;

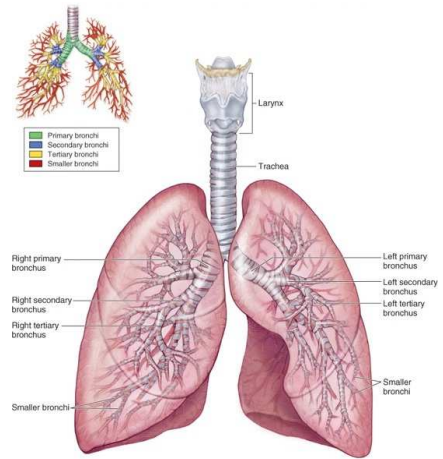
- ▶ o urinário, que é conjunto de órgãos envolvidos com a formação, depósito e eliminação da urina. É formado por dois rins, dois ureteres, uma bexiga e uma uretra;
- ▶ o reprodutivo (ou genital) trabalha com a finalidade de reprodução. Os principais órgãos do sistema reprodutivo humano incluem o pênis, a vulva e as gônadas produtoras dos gametas (testículos e ovários), bem como uma série de órgãos internos;
- ▶ o muscular e esquelético, que consiste dos ossos e músculos a eles ligados;
- ▶ o endócrino, formado pelo conjunto de glândulas que apresentam como atividade característica a produção de secreções denominadas hormônios;
- ▶ o linfático, que é uma rede complexa de órgãos linfóides, linfonodos, ductos linfáticos, tecidos linfáticos, capilares linfáticos e vasos linfáticos que produzem e transportam o fluido linfático (linfa) dos tecidos para o sistema circulatório. O sistema linfático é um importante componente do sistema imunológico, pois colabora com glóbulos brancos para proteção contra bactérias e vírus invasores;
- ▶ o imunológico, que compreende todos os mecanismos pelos quais um organismo multicelular se defende de invasores externos, como bactérias, vírus, protozoários, fungos. Existem dois tipos de mecanismos de defesa: os inatos ou não específicos, como a proteção da pele, a acidez gástrica, as células fagocitárias ou a secreção de lágrimas; e o sistema imunitário adaptativo, que compreende a ação seletiva dos linfócitos e a produção de anticorpos específicos;
- ▶ o cardiovascular, que compreende o coração (cuja principal função é fazer circular o sangue), as veias, as artérias e os capilares; o digestivo, que possibilita o processamento da alimentação e a transformação dos nutrientes em energia;
- ▶ o nervoso, finalmente, que monitora e coordena a atividade dos músculos, e a movimentação dos órgãos, constrói e finaliza estímulos dos sentidos e inicia as ações de um ser humano. Os neurônios e os nervos são integrantes do sistema nervoso, e desempenham papéis importantes na coordenação motora. Todas as partes do sistema sensorial de um animal são feitas de tecido nervoso e seus estímulos são dependentes do meio.

Figura A4 – Sistemas tegumentar , respiratório, digestivo, urinário, e reprodutivo.

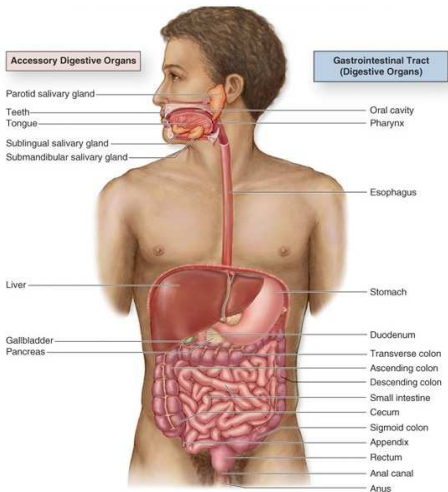
**Sistema Tegumentar**



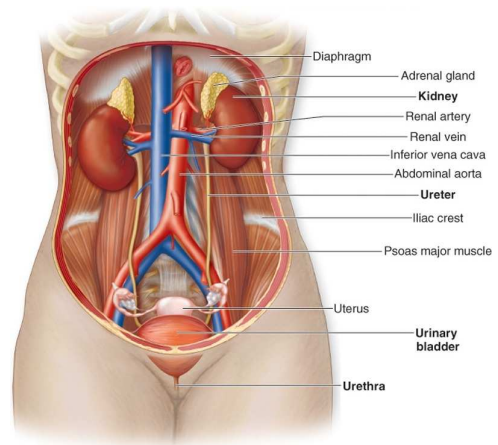
**Sistema Respiratório**



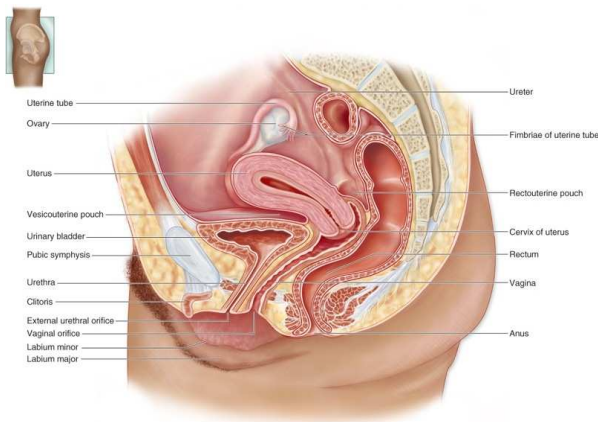
**Sistema Digestivo**



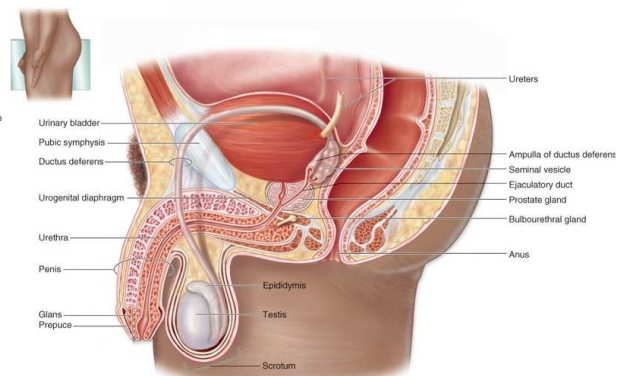
**Sistema Urinário**



**Sistema Reprodutivo Feminino**



**Sistema Reprodutivo Masculino**

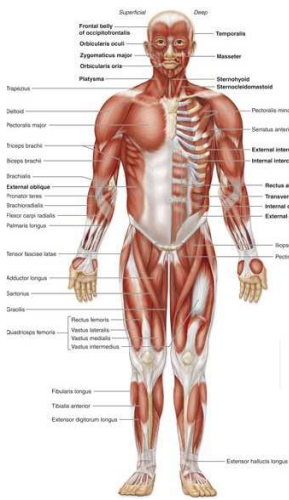


Fonte: [http://academic.kellogg.edu/herbrandsonc/bio201\\_mckinley/bio201s.htm](http://academic.kellogg.edu/herbrandsonc/bio201_mckinley/bio201s.htm).

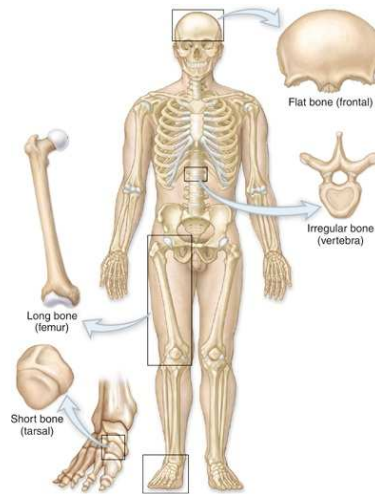


Figura A5 – Sistemas muscular e esquelético, endócrino, linfático, imunológico, cardiovascular, e nervoso.

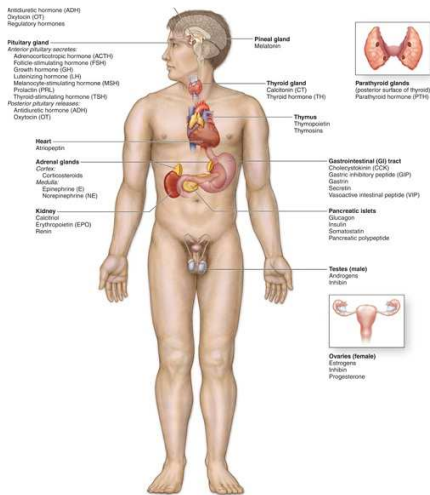
**Sistema Muscular**



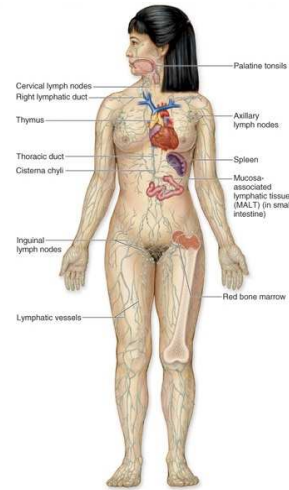
**Sistema Esquelético**



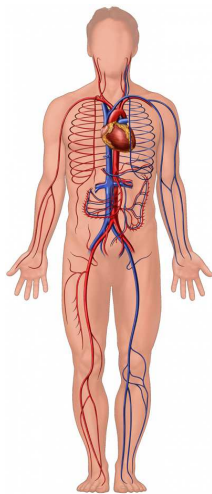
**Sistema Endócrino**



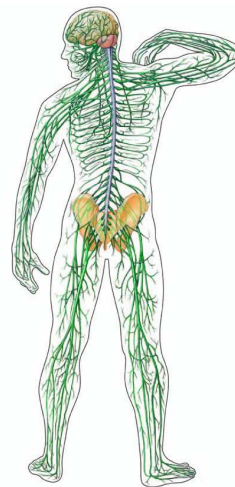
**Sistema Linfático e Imunológico**



**Sistema Cardiovascular**



**Sistema Nervoso**



Fonte: Sites Academic; CVTSA; Clipart.

### A3. O Sistema Nervoso

O sistema nervoso é um conjunto de órgãos que contém uma rede funcional de células especializadas denominadas de neurônios, que coordenam as ações e transmitem sinais elétricos em longas distâncias entre diferentes partes do corpo humano. Associados aos neurônios, estão as células gliais (denominadas a partir do termo grego para cola), células não neuronais fornecedoras de suporte e nutrição, manutenção da homeostase, formadoras da mielina, e participantes da transmissão de sinal no sistema nervoso. No cérebro humano, estima-se que o número total de células da glia é aproximadamente igual ao número de neurônios, embora a proporção possa variar em diferentes áreas do cérebro.

O sistema nervoso de um ser humano é dividido em sistema nervoso central (SNC) e sistema nervoso periférico (SNP). O SNC consiste do encéfalo (constituído por cérebro, cerebelo, tálamo, hipotálamo e bulbo) e da medula espinhal, que estão envolvidos por três membranas de tecido conjuntivo - as meninges. O SNP consiste de todos os outros neurônios que não estão no SNC, sendo constituído de neurônios sensoriais, agregados de neurônios denominados de gânglios, e nervos que os conectam entre si e ao sistema nervoso central. O sistema nervoso periférico é dividido em sistema nervoso somático e sistema nervoso autônomo.

O sistema nervoso somático é o responsável pela coordenação dos movimentos do corpo e também por receber estímulos externos. Este é o sistema que regula as atividades que estão sob controle consciente. O sistema nervoso autônomo é dividido em sistema nervoso simpático, sistema nervoso parassimpático e sistema nervoso entérico. O sistema nervoso simpático responde ao perigo iminente ou stress, e é responsável pelo incremento do batimento cardíaco e da pressão arterial, entre outras mudanças fisiológicas, juntamente com a sensação de excitação que se sente devido ao incremento de adrenalina no sistema. O sistema nervoso parassimpático, por outro lado, torna-se evidente quando a pessoa está descansando e sente-se relaxada, e é responsável por coisas tais como a contração pupilar, a redução dos batimentos cardíacos, a dilatação dos vasos sanguíneos e a estimulação dos sistemas digestivo e geniturinário. O papel do sistema nervoso entérico é gerenciar todos os aspectos da digestão, do esôfago ao estômago, intestino delgado e cólon.

A Neurociência é o estudo do sistema nervoso. Ela envolve uma vasta gama de questões acerca de como se desenvolve e se organiza o sistema nervoso no homem e nos animais, e de como ele funciona para gerar um comportamento. Estas questões podem ser exploradas

utilizando-se ferramentas da genética, da biologia celular e molecular, da anatomia e da fisiologia de sistemas, da biologia comportamental e da psicologia. A diversidade de neurônios e células gliais de suporte agrupa-se em conjuntos chamados de circuitos neurais, e estes são os componentes primários de sistemas neurais que processam tipos específicos de informação. Esses sistemas realizam uma de três funções gerais: os sistemas sensoriais representam as informações sobre o estado do organismo e do ambiente; os sistemas motores organizam e geram ações; e os sistemas associativos conectam ambos os componentes sensorial e motor, propiciando a base das funções encefálicas “superiores”, como percepção, atenção, cognição, emoções, linguagem, pensamento racional, bem como estabelece a base dos processos neurais complexos centrais à compreensão dos seres humanos, seu comportamento, sua história e talvez seu futuro.

Uma vasta gama de métodos fisiológicos agora se encontram disponíveis para se avaliar a atividade elétrica (e metabólica) dos circuitos neuronais. Duas abordagens têm sido particularmente úteis para definir como os sistemas neurais representam uma informação. O método mais utilizado é o registro eletrofisiológico, com microeletrodos sendo introduzidos em uma única célula. Através do registro da atividade de potenciais de ação, ele fornece uma análise célula a célula da organização de mapas topográficos, o que permite se vislumbrar para qual tipo de estímulo um neurônio está especializado. A segunda grande área, onde notáveis avanços técnicos têm sido realizados, consiste no imageamento funcional do encéfalo em humanos (e, em menor extensão, em animais). Nas duas últimas décadas, as técnicas de imageamento funcional do encéfalo têm revolucionado a compreensão dos sistemas neurais, bem como a capacidade para diagnosticar e descrever anormalidades funcionais.

Segundo Ramachandran e Blakeslee (2004), a famosa expressão “Que você viva em tempos interessantes” agora tem um significado especial para aqueles que estudam o sistema nervoso (o cérebro principalmente) e o comportamento humano. Por um lado, apesar de 200 anos de pesquisa, as perguntas mais fundamentais sobre a mente humana – Como reconhecemos rostos? Por que choramos? Por que rimos? Por que sonhamos? Por que gostamos de música e arte? – continuam sem resposta, assim como a questão realmente grande: O que é consciência, percepção? Por outro lado, o advento de novas abordagens experimentais e técnicas de mapeamento e tratamento de imagem vai seguramente transformar nosso entendimento do cérebro humano. Há algo distintamente singular acerca de um primata neóteno de pele lisa que evoluiu para uma espécie que pode olhar por cima do

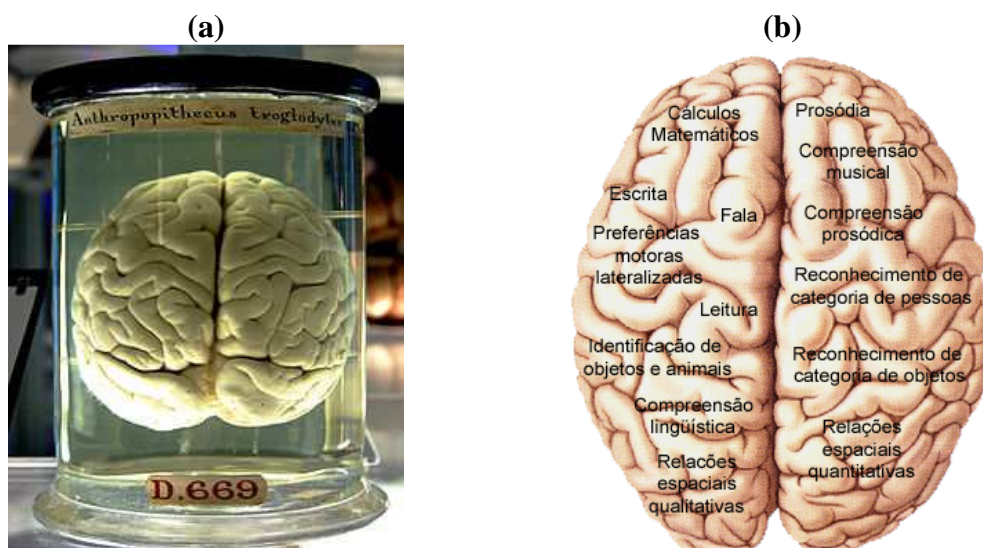


ombro e fazer perguntas sobre suas origens. E, mais singular ainda, o cérebro pode não só descobrir como outros cérebros funcionam, mas também fazer perguntas essenciais sobre sua própria existência: Quem sou eu? O que acontece depois da morte? Minha mente nasceu exclusivamente dos neurônios em meu cérebro? Se é assim, que espaço existe para o livre-arbítrio? É a peculiar qualidade recorrente destas perguntas – à medida que o cérebro luta para entender a si próprio – que torna a neurociência fascinante.

#### A4. O Cérebro

O cérebro é o centro do sistema nervoso em todos os vertebrados e em muitos animais invertebrados. Ele é localizado na cabeça, usualmente próximo de órgãos sensoriais primários como os do sentido da visão, audição, equilíbrio, sabor e odor. O cérebro de um vertebrado é o seu órgão mais complexo. O cérebro humano pesa em média 1.500 gramas no sexo masculino, um pouco menos no sexo feminino (essa regra se aplica a todas as espécies de macacos, tendo a ver com a diferença de tamanho pelo fato da espécie feminina ser menor e menos musculosa do que seu parceiro sexual).

Figura A6 – (a) Cérebro de um chimpanzé; (b) As áreas do cérebro humano e as principais atividades desempenhadas pelas mesmas.



Fonte: Wikipédia, 2012a.

Em um humano típico, avalia-se que o córtex cerebral (a parte maior) contém 15-33 bilhões de neurônios (e aproximadamente o mesmo número de células gliais), cada um conectado a sinapses através de vários milhares de outros neurônios. Estes neurônios se

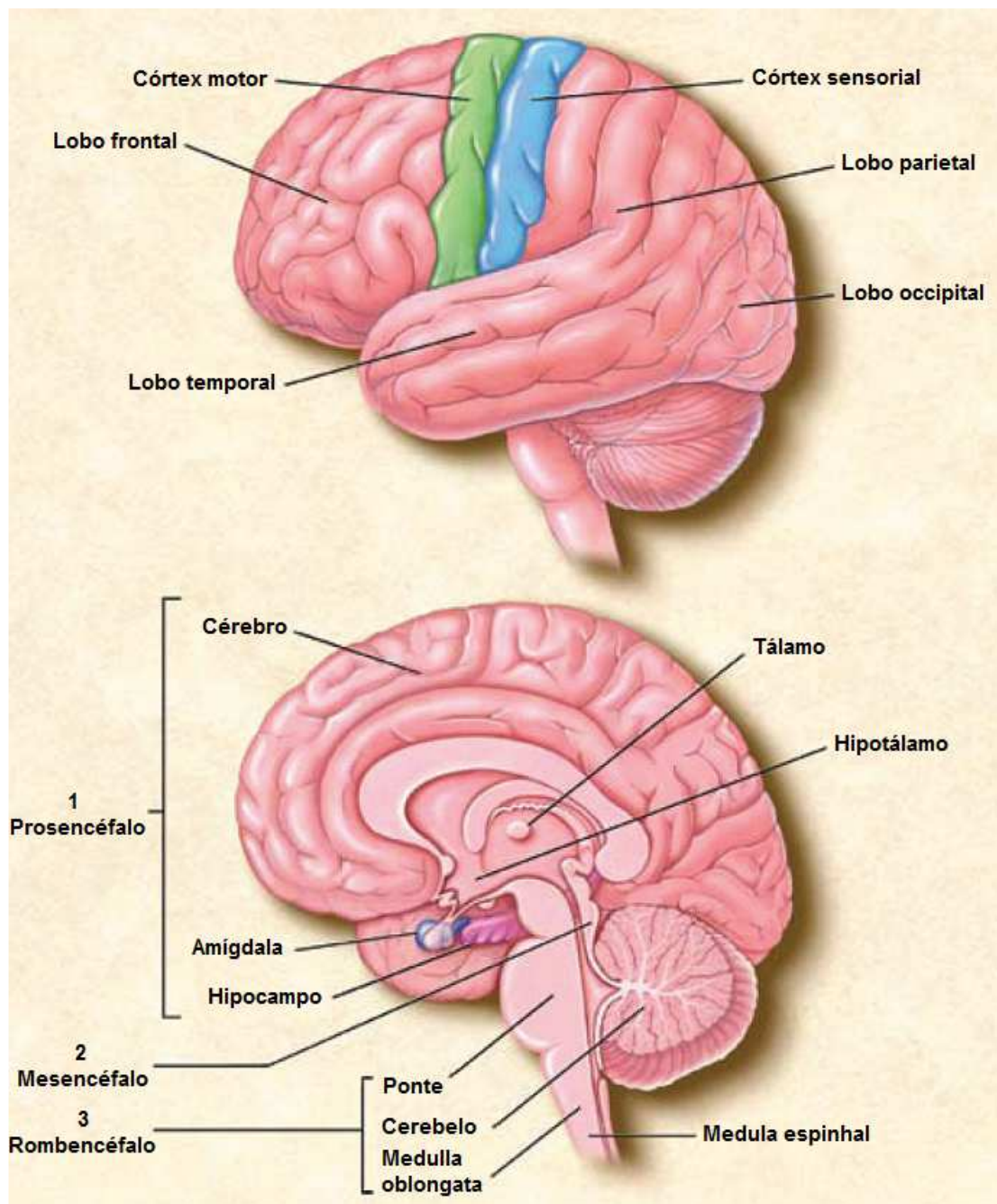
comunicam uns com os outros por intermédio de longas fibras protoplasmáticas denominadas de axônios, os quais conduzem trens de sinais pulsado, chamados potenciais de ação, a partes distantes do cérebro visando células específicas como alvo.

#### **A4.1 Anatomia do Cérebro**

O cérebro consiste, em termos gerais, no tronco cerebral e nos hemisférios cerebrais. O tronco cerebral apresenta uma região mais distal relativamente ao cérebro (bulbo raquidiano), uma região média (mesencéfalo) e uma região de transição para os hemisférios cerebrais, designada diencéfalo. O bulbo raquidiano está na continuidade da medula espinhal. Possui redes de neurônios que constituem centros de controle de funções vitais como a respiração e a pressão sanguínea. O cerebelo é uma estrutura que está fisicamente associada ao bulbo raquidiano e que desempenha um papel crucial no controle e coordenação dos movimentos. O mesencéfalo contém grupos de neurônios que se projetam para os hemisférios cerebrais e usam mensageiros químicos distintos. Pensa-se que estes grupos podem modular a atividade de neurônios em centros superiores do cérebro, regulando funções como o sono, a atenção ou o prazer.

O diencéfalo divide-se em duas áreas bastante distintas, designadas tálamo e hipotálamo: o tálamo transmite impulsos provenientes de todos os sistemas sensoriais para o córtex cerebral, que por sua vez reenvia mensagens de volta ao tálamo. Este processamento bidirecional de informação no cérebro é um pouco intrigante. O hipotálamo controla funções como comer e beber, e também a liberação de hormônios envolvidos na regulação sexual. Os hemisférios cerebrais são constituídos por núcleos centrais, os gânglios da base, e uma camada fina e extensa de neurônios que formam a matéria cinzenta do córtex cerebral. Os gânglios da base desempenham um papel central na iniciação e controle dos movimentos. Condensado no pequeno espaço ocupado pelo crânio, o córtex cerebral é bastante irregular, com grande número de dobras e sulcos, contribuindo assim para aumentar a superfície da matéria cinzenta, e também o número de neurônios no córtex. O tecido cortical constitui, assim, a área cerebral mais desenvolvida nos humanos – cerca de quatro vezes mais do que em gorilas. Divide-se num grande número de áreas distintas, cada qual com camadas e ligações características. As principais funções de muitas destas áreas são bem conhecidas – incluindo a função visual, auditiva e olfativa, sensorial primária que recebe informação vinda da pele (somatossensorial), e também áreas motoras primárias.

Figura A7 – Parte superior: cérebro dividido em quatro seções: o lobo occipital, o lobo temporal, o lobo parietal, e o lobo frontal. Funções como visão, audição e fala estão distribuídas em regiões selecionadas, e algumas regiões são associadas a mais do que uma função. Parte inferior: regiões do cérebro (onde se destaca o prosencéfalo), que possui estruturas que desempenham funções intelectuais importantes como pensamento, planejamento e solução de problemas. O hipocampo está envolvido com a memória.



Fonte: adaptado da internet.

As vias provenientes de receptores sensoriais com destino ao córtex e as vias do córtex para os músculos cruzam, no seu trajeto, de um lado para o outro do corpo. Por isso os movimentos do lado direito do corpo são controlados pelo lado esquerdo do córtex. Do

mesmo modo, o lado esquerdo do corpo envia sinais sensoriais para o hemisfério direito de modo que, por exemplo, sons no ouvido esquerdo são enviados ao córtex direito. Apesar disto, os dois lados do cérebro não funcionam isoladamente – os lados esquerdo e direito do cérebro estão ligados entre si por um conjunto espesso de fibras designado corpo caloso.

O córtex cerebral é indispensável para ações voluntárias, linguagem e funções superiores como o pensamento e a memória. Muitas destas funções são desempenhadas pelos dois lados do cérebro, no entanto outras são predominantemente lateralizadas num hemisfério cerebral. Áreas envolvidas no processamento de algumas funções superiores, como as da fala (que se encontra lateralizado no hemisfério esquerdo da maioria das pessoas), têm sido identificadas. No entanto, ainda há muito para aprender, em particular sobre aspectos fascinantes como os que envolvem a consciência. Assim, o estudo das funções do córtex cerebral constitui uma das áreas de investigação mais excitantes e ativas em neurociências.

#### **A4.2 As Doenças do Cérebro e do Sistema Nervoso**

As mais de 1.000 desordens do cérebro e do sistema nervoso são responsáveis por mais hospitalizações do que qualquer outro grupo de doenças, incluindo as do coração e câncer. As doenças neurológicas afetam mais de 50 milhões de americanos anualmente, gerando custos que excedem 400 bilhões USD. Além disto, as desordens mentais, excluindo os problemas com drogas e álcool, afetam 44 milhões de adultos por ano, gerando custos da ordem de 148 bilhões USD. Desde a Década do Cérebro, que terminou em 2000, a neurociência fez significativas descobertas nestas áreas. A Tabela A1 apresenta dados em relação ao número de casos e custos anuais envolvidos em uma seleção de algumas desordens do cérebro e do sistema nervoso em americanos.

O cérebro possui a habilidade de modificar as conexões nervosas para lidar melhor com novas circunstâncias. Esta plasticidade é uma propriedade intrínseca do cérebro humano e representa uma invenção da evolução para capacitar o sistema nervoso para escapar das restrições de seu próprio genoma e assim adaptar-se a pressões ambientais, mudanças fisiológicas e experiências. A plasticidade é o mecanismo de desenvolvimento e aprendizado, tanto quanto é a causa de patologias. Um dos desafios atuais da neurociência é descobrir a base molecular da plasticidade, revelando como a aprendizagem e a memória ocorrem, e como o seu declínio poderia ser revertido. O desafio que se enfrenta é aprender o suficiente

sobre os mecanismos da plasticidade para que se possa modular e alcançar o melhor resultado comportamental possível em uma dada situação.

Tabela A1 – Número de casos e custos anuais de uma seleção de algumas desordens do cérebro e do sistema nervoso em americanos.

CONDIÇÃO	TOTAL DE CASOS	CUSTO POR ANO (USD)
Desordens do Sono	70 milhões	100 bilhões
Perda de Audição	32 milhões	2.5 bilhões
Desordens Depressivas	20.9 milhões	70 bilhões
Injúrias Traumáticas do Cérebro	5.3 milhões	60 bilhões
Derrame cerebral	5.2 milhões	51 bilhões
Doença de Alzheimer	5 milhões	148 bilhões
Esquizofrenia	2 milhões	32.5 bilhões
Doença de Parkinson	1 milhão	5.6 bilhões
Esclerose Múltipla	400.000	10.6 bilhões
Injúrias da Medula Espinhal	250.000	10 bilhões
Doença de Huntington	30.000	2 bilhões

Fonte: Society for Neuroscience, 2012.

## A5. Os Neurônios

Um neurônio (também conhecido como célula nervosa) é uma célula excitável eletricamente que processa e transmite informações por sinalização elétrica e química. A sinalização química ocorre através das sinapses, conexões especializadas com outras células. Os neurônios, que se conectam entre si para formar as redes neurais, são os componentes centrais do sistema nervoso, existindo vários tipos especializados: os neurônios sensoriais respondem ao tato, som, luz e numerosos outros estímulos que afetam as células dos órgãos sensoriais que então enviam sinais para a espinha dorsal e o cérebro; os neurônios motores recebem sinais do cérebro e da espinha dorsal, causam contrações musculares, e afetam glândulas; os interneurônios conectam neurônios a outros neurônios na mesma região do cérebro ou da espinha dorsal.

Células neuronais são claramente diferenciadas por serem especializadas em comunicação intracelular. Este atributo é evidente em sua morfologia geral, na organização específica de seus componentes de membrana para a sinalização elétrica e nas complexidades funcional e estrutural dos contatos sinápticos entre neurônios. O mais óbvio sinal morfológico



de especialização para comunicação através de sinais elétricos é a intensa ramificação destas células. O aspecto mais saliente dessa ramificação por células nervosas típicas é a elaboração da arborização dos dendritos que emergem do corpo celular neuronal na forma de ramos dendríticos. Dendritos são o alvo primário de sinais de entrada sinápticos oriundos de outros neurônios, diferenciando-se por seu alto conteúdo de ribossomos, bem como de proteínas específicas do citoesqueleto.

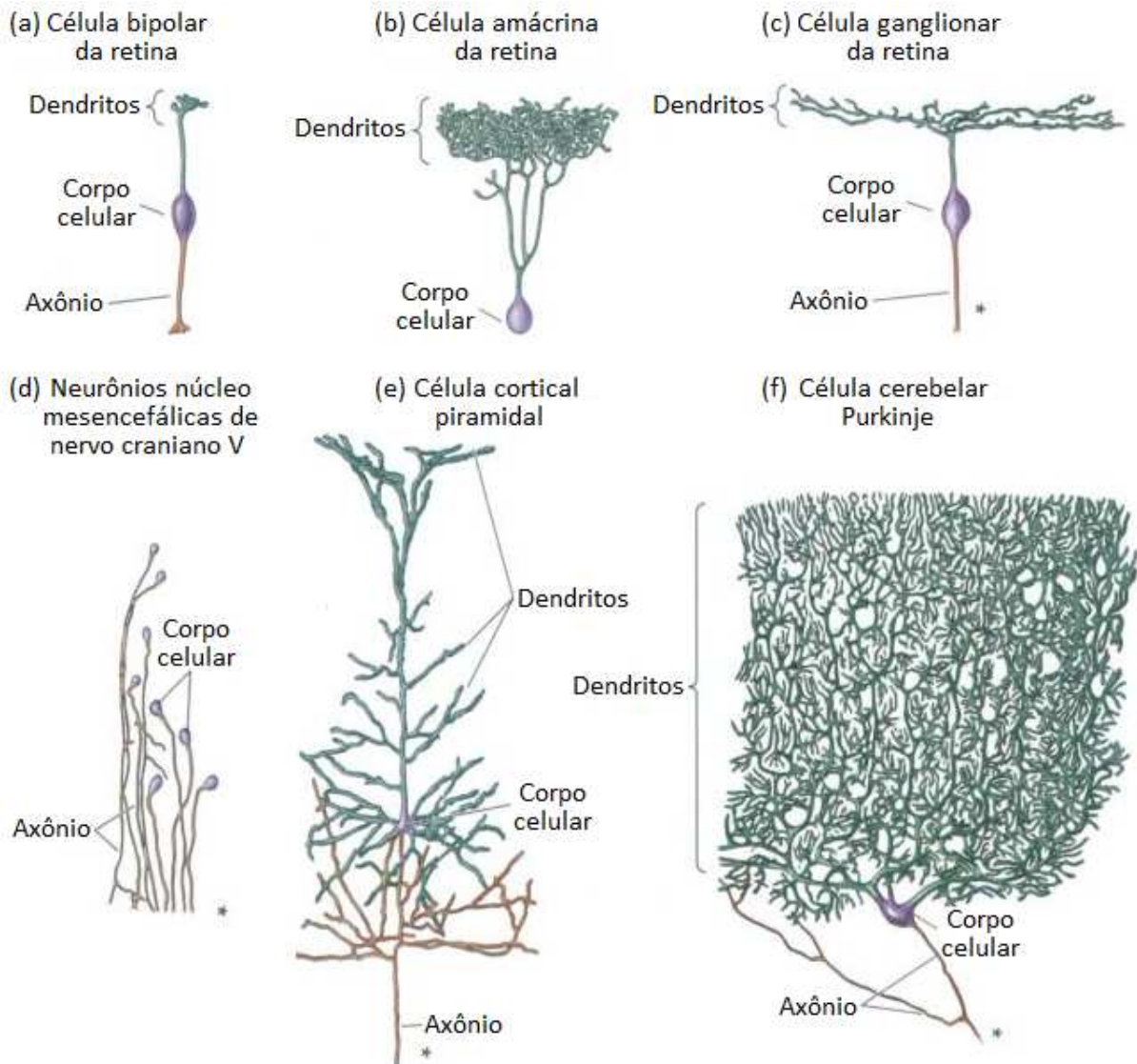
O espectro de geometrias neuronais inclui desde uma pequena minoria de células que não possuem dendritos até neurônios com ramos dendríticos que rivalizam com a complexidade de uma árvore madura de verdade – ver Fig. A8. O número de entradas que um neurônio recebe depende da complexidade de sua arborização dendrítica; células nervosas que não possuem dendritos são inervadas por poucas, senão por uma única célula, enquanto neurônios com ramos dendríticos muito elaborados podem ser inervados por um número muito maior de neurônios. O número de entradas para um único neurônio reflete o grau de convergência, enquanto o número de alvos por um dado neurônio representa sua divergência.

Os contatos sinápticos sobre dendritos (e, de modo menos frequente, sobre corpos celulares neuronais) consistem em uma elaboração especial do aparelho secretório encontrado na maioria das células epiteliais polarizadas. Em geral, o terminal pré-sináptico está imediatamente adjacente à especialização pós-sináptica da célula-alvo. Na maioria das sinapses, não há continuidade física entre esses elementos pré e pós-sinápticos. Igualmente, os componentes pré e pós-sinápticos comunicam-se pela secreção de moléculas a partir do terminal pré-sináptico, que se ligam a receptores na especialização pós-sináptica. Estas moléculas devem atravessar um intervalo de espaço extracelular entre os elementos pré e pós-sinápticos, chamado de fenda sináptica (ou simplesmente sinapse). A fenda sináptica, entretanto, não é somente um espaço vazio a ser atravessado; ela é o sítio de proteínas extracelulares que influenciam a difusão, ligação e degradação das moléculas secretadas pelo terminal pré-sináptico.

Uma característica notável das sinapses é seu pequeno tamanho, apresentando uma superfície de contato de 0.5  $\mu\text{m}$  a 2  $\mu\text{m}$ . Em contrapartida, sua abundância é extrema: por exemplo, 1  $\text{mm}^3$  de substância cinzenta do córtex contém 50 mil neurônios, ensejando cada um o nascimento de ordem de 6 mil sinapses. Ou seja, um total de 300 milhões de sinapses das quais se estima que 84% sejam do tipo 1 (que entra em contato com neurônios e vasos sanguíneos) e 16% do tipo 2 (que entra em contato apenas com neurônios). Um cálculo comparável para o conjunto do córtex humano resulta em 10 bilhões de células e 60.000

bilhões de sinapses. Esses bilhões de contatos permitem a organização de bilhões de microcircuitos dentro do espaço confinado do cérebro. De fato, o número de entradas sinápticas recebidas por cada célula do sistema nervoso humano varia de cerca de 1 a cerca de 100.000. Esse limite reflete o propósito fundamental das células nervosas, que é integrar informação de outros neurônios. O número de contatos sinápticos de diferentes neurônios pré-sinápticos sobre qualquer célula em particular é, portanto, um importante determinante da função neuronal.

Figura A8 – Exemplos da rica variedade morfológica das células nervosas encontradas no sistema nervoso humano. Os desenhos são as células nervosas verdadeiras coradas pela impregnação de sais de prata (a tão conhecida técnica de Golgi, método usado nos clássicos estudos de Golgi e Cajal). Asteriscos indicam que o axônio vai muito além do que o mostrado. Note que algumas células, como a célula bipolar da retina, têm um axônio muito curto e que outras, como a célula amácrina da retina, não têm axônio. Os desenhos não estão todos na mesma escala.



Fonte: Purves, 2010.



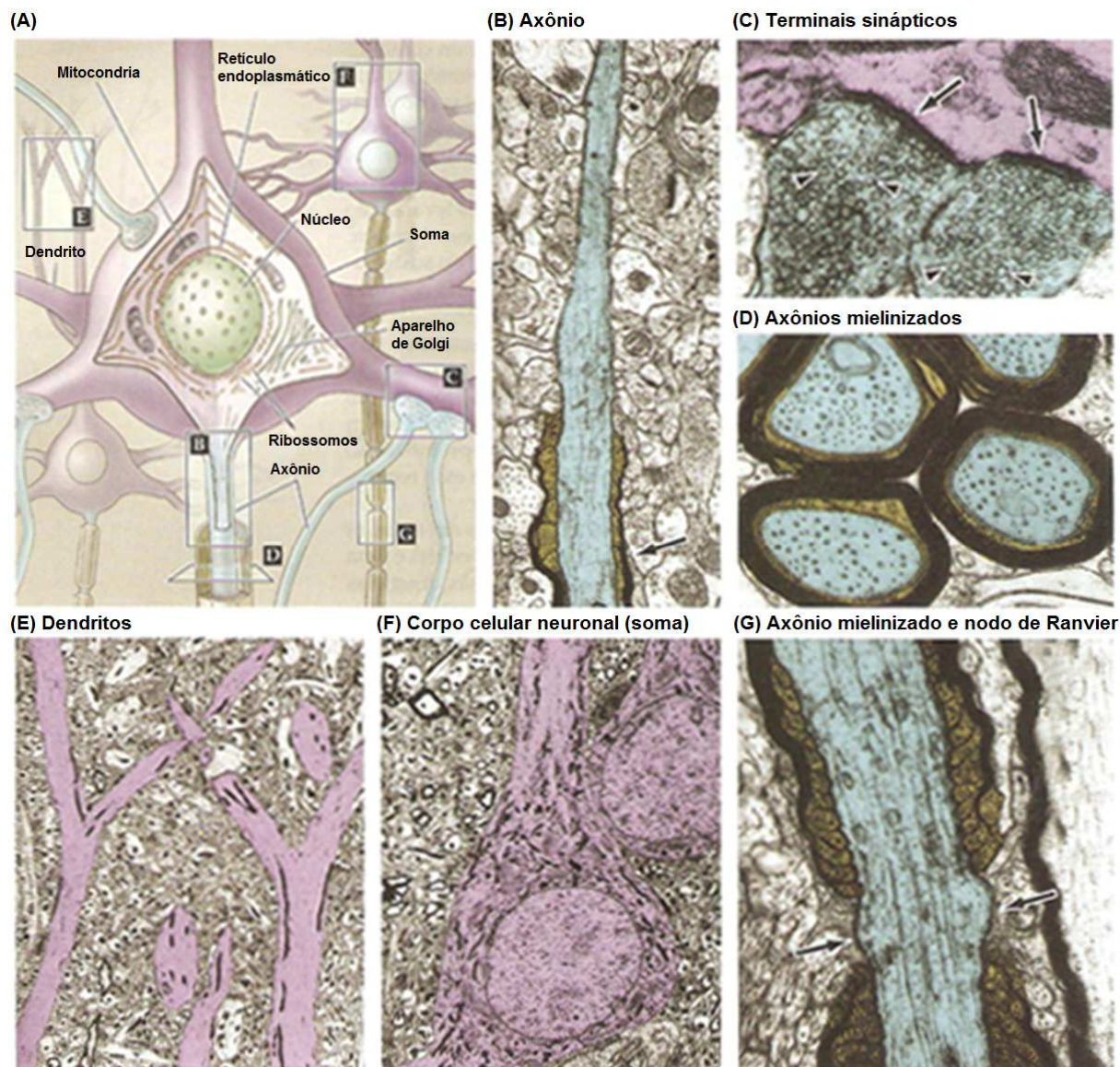
A informação conduzida pelas sinapses sobre os dendritos neuronais é integrada e “lida” na origem do axônio, a porção da célula nervosa especializada em transmitir sinais elétricos - ver Fig. A9 (B). O axônio é uma única extensão a partir do corpo celular do neurônio, que pode se estender desde poucas centenas de micrômetros até muito além, dependendo do tipo de neurônio e do tamanho da espécie. Além disso, o axônio possui um citoesqueleto distinto cujos elementos são decisivos para sua integridade. Muitas células nervosas do encéfalo humano possuem axônios com não mais do que poucos milímetros de comprimento, e alguns sequer possuem axônios.

Axônios relativamente curtos, no encéfalo, são uma característica de neurônios de circuito local, ou interneurônios. Os axônios de neurônios de projeção, entretanto, estendem-se para alvos distantes. Por exemplo, os axônios que vão da medula espinhal humana até os pés podem ter cerca de 1 m de comprimento. O evento que transporta sinais por tamanhas distâncias é uma onda de atividade elétrica autorregenerativa chamada de potencial de ação, que se propaga do ponto de iniciação no corpo celular (o cone de implantação) até o terminal axonal, onde acontecem os terminais sinápticos. As células-alvo dos neurônios – sítios onde os axônios terminam, e as sinapses são feitas – incluem outras células nervosas do encéfalo, da medula espinhal e dos gânglios neurovegetativos, bem como células musculares e de glândulas por todo o corpo.

Os processos químicos e elétricos por meio dos quais a informação codificada por potenciais de ação é passada adiante dos contatos sinápticos para a célula seguinte constituem a chamada transmissão sináptica. Terminais pré-sinápticos (também denominadas terminações sinápticas, terminais axônicos ou botões terminais – ver Fig. A9 (C) – e suas especializações pós-sinápticas são geralmente sinapses químicas, o tipo de sinapse mais abundante no sistema nervoso). Outro tipo, a sinapse elétrica (facilitada pelas junções comunicantes já mencionadas), é muito mais raro.

As organelas secretórias no terminal pré-sináptico das sinapses químicas são as vesículas sinápticas, estruturas esféricas que contém moléculas de neurotransmissores. O posicionamento das vesículas sinápticas na membrana pré-sináptica e sua fusão, que inicia a liberação de neurotransmissor, são regulados por um grupo de proteínas localizadas dentro ou associadas às vesículas. Os neurotransmissores liberados pelas vesículas sinápticas modificam as propriedades elétricas da célula-alvo por meio da ligação com receptores de neurotransmissores, localizados principalmente na especialização pós-sináptica.

Figura A9 – Principais características de neurônios em microscopia óptica e microscopia eletrônica. (A) Diagrama de células nervosas e suas partes componentes. (B) Segmento inicial do axônio (azul) entrando na bainha de mielina (bronze). (C) Botões terminais (azul) carregados com vesículas sinápticas (cabeças de setas) formando sinapses (setas) com um dendrito (púrpura). (D) Seção transversal de axônios (azul) embainhados pelos processos dos oligodendrócitos (dourado). (E) Dendritos apicais (púrpura) de células piramidais corticais. (F) Corpos de células nervosas (púrpura) ocupados por grandes núcleos redondos. (G) Porção de um axônio mielinizado (azul) ilustrando os intervalos entre segmentos adjacentes de mielina (dourado) referidos como nodos de Ranvier (setas) (Purves, 2010).



Fonte: Purves, 2010.

A intrincada e coordenada atividade de neurotransmissores, receptores, elementos do citoesqueleto e moléculas de transdução de sinais são a base da comunicação das células nervosas entre si e com as células efetoras em músculos e glândulas.

## A6. A Transmissão Sináptica

A palavra sinapse deriva do grego sendo a união de "syn" (juntas) e "haptein" (prender) formado "synaptein". Esta palavra é bem empregada ao denominar uma junção entre duas células ou, mais especificamente, dois neurônios. Estima-se que haja entre 100-500 trilhões de sinapses nervosas no cérebro. Elas dividem-se em sinapses elétricas e químicas (DRACHMAN, 2005). As elétricas ocorrem em neurônios que possuem as membranas muito próximas, a uma distância de aproximadamente 3,5 nm (KANDEL *et al.*, 2000). Devido a esta proximidade, os canais iônicos cruzam ambas as membranas permitindo a difusão de íons nos dois sentidos. Assim sendo, não há necessidade da atuação de neurotransmissores.

Nas sinapses químicas, por outro lado, as células pré e pós-sinápticas estão a uma distancia de 20 a 50 nm (HORMUZDI *et al.*, 2004). Para que haja uma comunicação entre os neurônios, o pré-sináptico, estimulado pela onda de despolarização, abre os canais de  $Ca^{2+}$ . O aumento na concentração deste íon funciona como sinal para que as vesículas liberem os neurotransmissores na fenda sináptica, que, por sua vez, se ligarão aos neuroreceptores da célula pós-sináptica, causando a abertura do canal iônico e dando continuidade à transmissão nervosa.

No equilíbrio, a membrana plasmática neuronal possui um potencial intramembrana que fica dentro do intervalo de -90 a -40 mV (PURVES *et al.*, 2010), nomeado como potencial de repouso da membrana. Este potencial deve-se à diferença de concentração iônica dos meios extra e intracelulares, que é estabelecida por meio de proteínas denominadas transportadores ativos como, por exemplo, a bomba  $Na^+/K^+$ . A Tabela A2 lista a concentração iônica dos meios intra e extracelular (BEAR *et al.*, 2007).

Tabela A2 – Concentração aproximada dos íons dentro e fora da membrana neuronal.

Íon	[ <sub>extracelular</sub> (mM)	[ <sub>intracelular</sub> (mM)	Proporção fora : dentro	$E_{ion}$ (a 37°C)
$K^+$	5	100	1 : 20	-80 mV
$Na^+$	150	15	10 : 1	62 mV
$Ca^{2+}$	2	0,0002	10000 : 1	123 mV
$Cl^-$	150	13	11,5 : 1	-65 mV

Fonte: Bear, 2007.

Os potenciais de cada íon, descritos na Tabela A2, são aqueles alcançados, à temperatura corporal e para a membrana seletivamente permeável a cada um deles. Na realidade, a permeabilidade iônica é determinada pela abertura de canais iônicos específicos.

Para uma melhor descrição desse equilíbrio eletroquímico da membrana, David Goldman (PURVES *et al.*, 2010) desenvolveu uma equação para sistemas mais complexos como células e meio extracelular a partir da equação de Nernst e que está apresentada a seguir:

$$V = 58 \log \frac{P_{K^+} [K^+] + P_{Na^+} [Na^+] + P_{Cl^-} [Cl^-]}{P_{K^+} [K^+] + P_{Na^+} [Na^+] + P_{Cl^-} [Cl^-]}, \quad (A1)$$

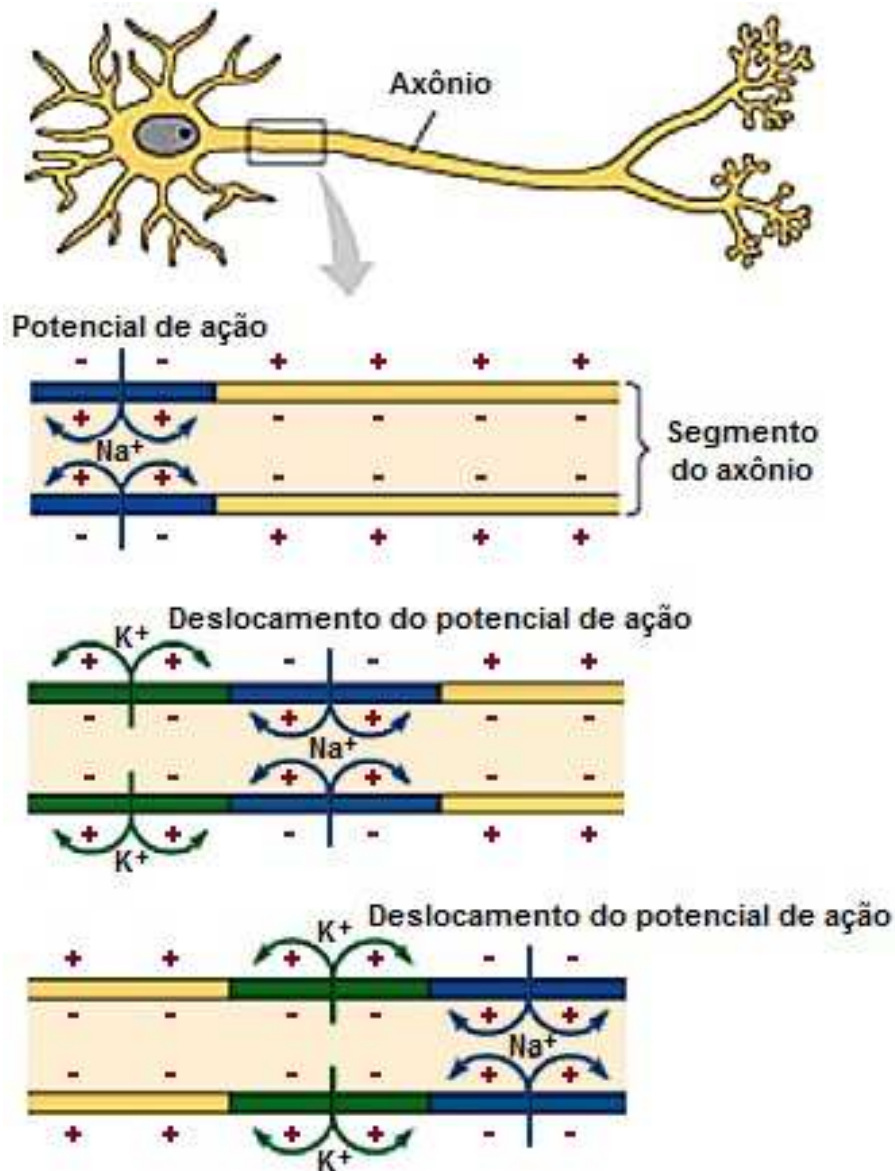
sendo  $V$  a voltagem através da membrana e  $P$  a permeabilidade da membrana a cada íon específico.

A compreensão da equação de Goldman facilita o entendimento de como os neurônios geram potenciais de repouso e de ação na medida em que demonstra como ocorre a difusão de íons pela membrana. Segundo a equação, a difusão não depende apenas das diferenças de concentração iônica intra e extracelular, mas também da permeabilidade de cada íon que é variável com o tempo.

O neurônio sai do repouso quando principia o processo da transmissão de informação. Esta se inicia quando os dendritos de um neurônio são excitados ou por um estímulo externo, como por exemplo, luz, moléculas de odor, temperatura, etc.; ou por neurotransmissores advindos de uma célula pré-sináptica, ocasionando uma despolarização local da membrana celular que causa a abertura de canais iônicos ativados por potencial. Sequencialmente, a despolarização da membrana continua ocorrendo como uma reação em cadeia até que chegue à sinapse nervosa (local de comunicação entre duas células nervosas ou uma célula nervosa e um miócito), onde a despolarização faz com que neurotransmissores sejam liberados na fenda sináptica. Este processo sequencial de despolarização da bicamada lipídica é denominado potencial de ação. Logo após a despolarização, a abertura de canais de potássio restabelece a polarização da membrana jogando íons potássio para o meio extracelular, permitindo, assim, que um novo impulso nervoso possa ocorrer. A liberação de neurotransmissores na fenda sináptica dá continuidade à transmissão do impulso nervoso no próximo neurônio. A Figura A10 ilustra a propagação do potencial de ação ao longo do axônio: a despolarização local da membrana causada pela entrada de íons  $Na^+$  na célula, seguida pela repolarização ocasionada pela saída de íons  $K^+$ .



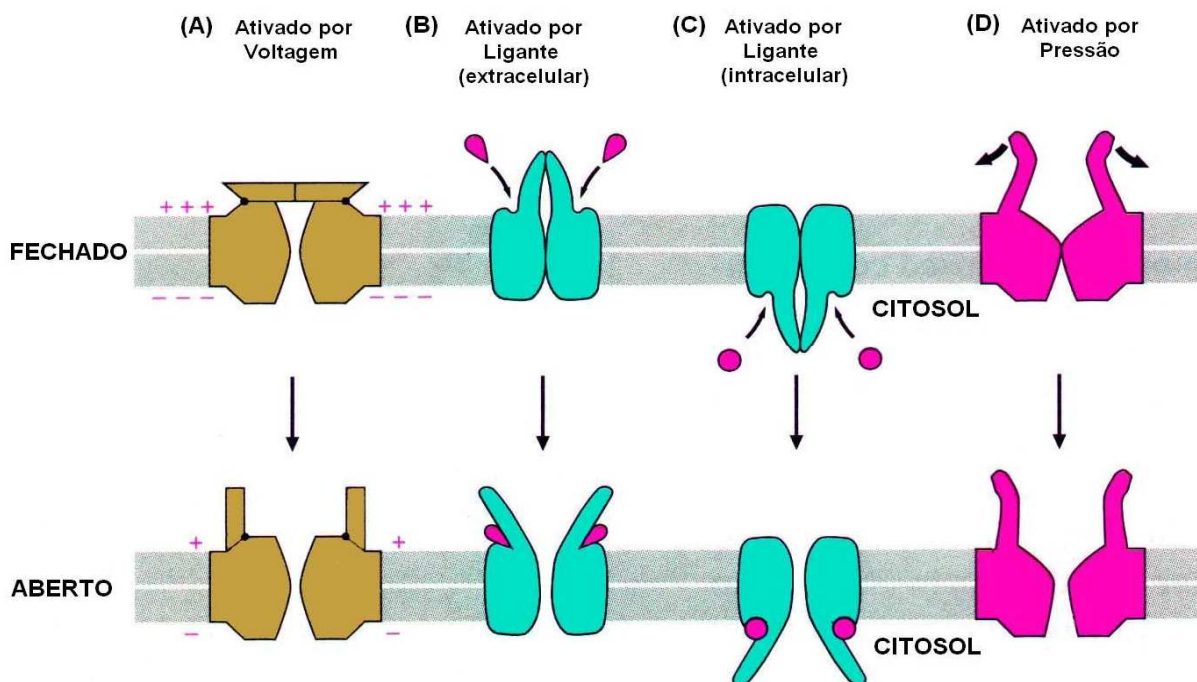
Figura A10 – Desenho esquemático mostrando a transmissão do impulso nervoso ao longo do axônio.



Fonte: [http://www.passeiweb.com/na\\_ponta\\_lingua/sala\\_de\\_aula/biologia/biologia\\_animal/sistemas\\_humanos\\_sistema\\_nervoso/sist\\_nervoso\\_impulso\\_nervoso](http://www.passeiweb.com/na_ponta_lingua/sala_de_aula/biologia/biologia_animal/sistemas_humanos_sistema_nervoso/sist_nervoso_impulso_nervoso) acessado em 10/06/11

As proteínas que funcionam como portões, permitindo a entrada e saída de íons do meio intracelular para o extracelular, são denominadas de canais iônicos. Estas, ilustradas na Figura A11, podem ser ativadas: por voltagem, como os responsáveis pela transmissão do impulso nervoso ao longo axônio; por deslocamento mecânico; por alterações na temperatura; ou por ligantes.

Figura A11 – Tipos de canais iônicos com “portões”.



Fonte: Alberts *et al.*, 1994.

Os canais iônicos ativados por potencial são seletivamente permeáveis a cada um dos íons fisiológicos permitindo a passagem de apenas um tipo de íon. Já canais ativados por ligante não são necessariamente específicos o que pode permitir o transito de mais de um tipo de íons. Estes últimos são, normalmente, encontrados em sinapses nervosas que podem ser denominadas de acordo com o tipo de ligante que ativa seus canais.

## A7. Os Neurotransmissores e seus Receptores

O neurotransmissor é uma substância química liberada pelos neurônios que permite a transmissão de informação a outras células (FERREIRA, 2010). Para que um agente químico seja considerado um neurotransmissor, este deve seguir alguns critérios, estabelecidos por neurocientistas: a molécula deve ser sintetizada e armazenada no neurônio pré-sináptico; após estímulo ela deve ser liberada pelo axônio deste neurônio e, quando aplicada experimentalmente, deve produzir uma resposta semelhante àquela ocasionada pela liberação do neurotransmissor pelo neurônio pré-sináptico.

Os neurotransmissores liberados na fenda sináptica podem se enquadrar em três categorias químicas: aminoácidos, aminas e peptídeos. Dentre os transmissores mais

importantes categorizados como aminas estão a dopamina, a serotonina e a acetilcolina, sendo esta última uma das mediadoras da transmissão sináptica rápida em todas as junções neuromusculares. As sinapses lentas de todo o SNC podem ser mediadas por qualquer uma das classes mencionadas anteriormente. Diversos tipos de neurotransmissores, algumas de suas fórmulas moleculares, o *modus operandi* de alguns deles e a sua atuação em casos clínicos são apresentados na Fig. A12, Fig. A13, Fig. A14 e Fig. A15 respectivamente.

Por outro lado, as sinapses rápidas no SNC são mediadas por aminoácidos, os quais são: o ácido gama-aminobutírico (GABA), a glicina e o glutamato. Este último é utilizado em aproximadamente 90% dos neurônios excitatórios cerebrais como seu neurotransmissor e, conseqüentemente, mais da metade das sinapses de todo o cérebro são do tipo glutamatérgicas (SIEGEL, 2006; PURVES et al., 2010.).

Cada neurotransmissor possui um grupo de receptores específicos aos quais ele se liga. Os neurorreceptores de glutamato (GluRs) estão relacionados a importantes funções neuronais como, por exemplo: a modulação da plasticidade sináptica (NAKAGAWA, 2010), que é uma propriedade cerebral diretamente relacionada à memória e à aprendizagem (DEBANNE *et al.*, 2003). Estes receptores estão divididos em dois tipos: metabotrópicos (mGluR) e ionotrópicos (iGluRs). Os iGluRs são canais iônicos ativados por ligante e dividem-se em três famílias de acordo com sua afinidade a três toxinas naturais não encontradas no cérebro: N-metil-D-aspartato (NMDA), cainato e ácido  $\alpha$ -amino-3-hidroxy-5-metil-4-isoxazolpropionico (AMPA). Na Fig. A16 está esquematizada uma sinapse glutamatérgica na qual se pode observar a presença dos diversos tipos de receptores glutamatérgicos dentre outras proteínas importantes para a sinapse.

Devido à ação do NMDA, cainato e AMPA assemelharem-se à do glutamato para cada tipo de receptor, eles são definidos como agonistas sintéticos. De acordo com os conceitos da farmacologia, compostos que se ligam a receptores fisiológicos e imitam os efeitos de regulação de compostos endógenos responsáveis pela sinalização são denominados agonistas. Existem também, os antagonistas, que se ligam aos mesmos receptores, porém não causam o efeito regulador e bloqueiam a ligação do agonista endógeno. Os agentes que são apenas parcialmente eficazes como os agonistas, não importando sua concentração, denominam-se de agonistas parciais e aqueles que estabilizam o receptor em sua conformação inativa são denominados agonistas inversos (BRUNTON *et al.*, 2008). Um fato interessante é que o cainato possui atividade tanto quando ligado a receptores cainato quanto a receptores AMPA,



mostrando-se no primeiro caso como agonista total e no segundo como agonista parcial (DINGLELINE *et al.*, 1999).

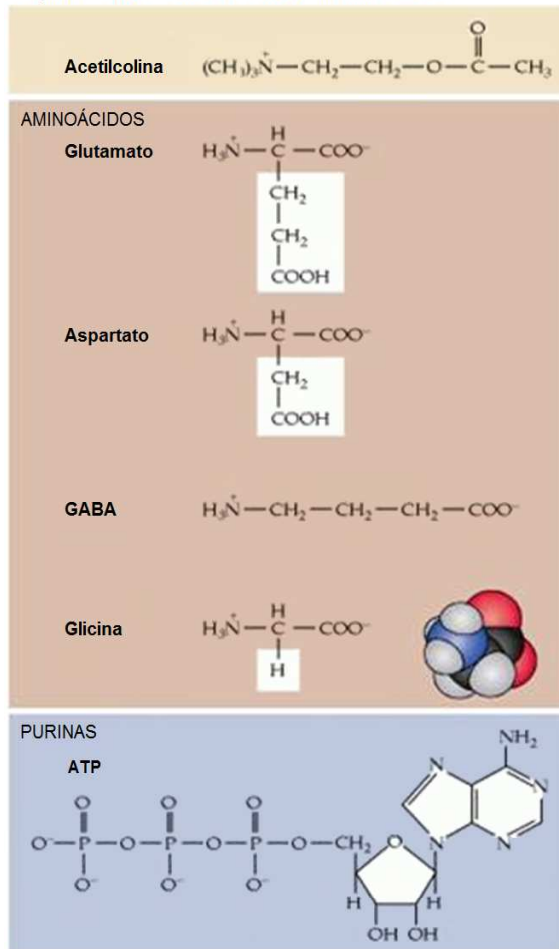
Figura A12 – Diversos tipos de neurotransmissores.

Sistema	Composto
<b>Aminoacidérgico</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>γ-Aminobutirato</li> <li>Aspartato</li> <li>Glutamato</li> <li>Glicina</li> <li>Taurina</li> </ul>
<b>Colinérgico</b>	Acetilcolina
<b>Histaminérgico</b>	Histamina
<b>Monoaminérgico</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Adrenalina</li> <li>Dopamina</li> <li>Noraadrenalina</li> <li>Serotonina</li> <li>Triptamina</li> </ul>
<b>Peptidérgico</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Angiotensina</li> <li>Família da bombesina (2 membros)</li> <li>Bradicinina</li> <li>Peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP)</li> <li>Carnosina</li> <li>*Ceruleína</li> <li>Família da colecistoquinina (5 membros)</li> <li>Corticotropina</li> <li>Hormônio liberador de corticotropina (CRF)</li> <li>Família da dinorfina (5 membros)</li> <li>*Eledoisina</li> <li>Família da endorfina (2)</li> <li>Família da encefalina (2)</li> <li>Família da gastrina(2 membros)</li> <li>Hormônio liberador do hormônio luteinizante (LHRH)</li> <li>Melatonina</li> <li>Motilina</li> <li>Neuroquininas (2 péptidos)</li> <li>Família da neuromedina (4 membros)</li> <li>Neuropeptídeo K</li> <li>Neuropeptídeo Y</li> <li>Neurotensina</li> <li>Ocitocina</li> <li>Peptídeo histidina isoleucina (PHI)</li> <li>*Fisalemina</li> <li>Péptidos de indução do sono (4 péptidos)</li> <li>Somatostatina</li> <li>Substância K</li> <li>Substância P</li> <li>Hormônio liberador do hormônio da tireóide (TRH)</li> <li>Peptídeo intestinal vasoativo (VIP)</li> <li>Vasopressina</li> </ul>
<b>Purinérgico</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Adenosina</li> <li>ADP</li> <li>AMP</li> <li>ATP</li> </ul>
<b>Neurotransmissores gasosos</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Monóxido de carbono</li> <li>Óxido nítrico</li> </ul>
<i>*encontrado principalmente em vertebrados inferiores.</i>	

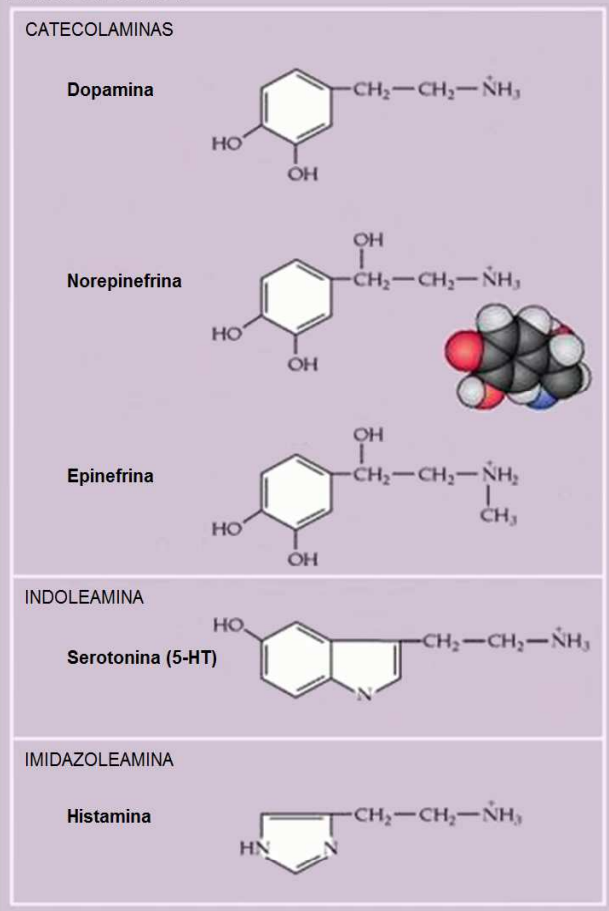
Fonte: adaptado da internet.

Figura A13 – Fórmulas moleculares de alguns neurotransmissores.

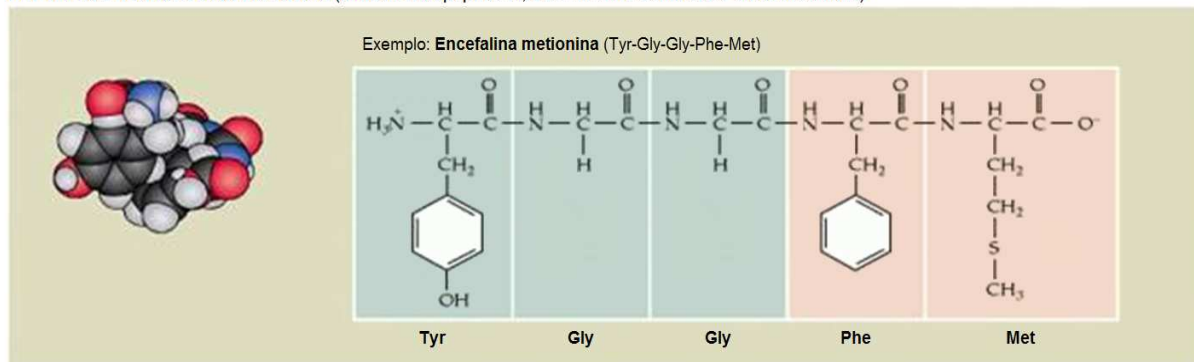
PEQUENAS MOLÉCULAS NEUROTRANSMISSORAS



AMINAS BIOGÊNICAS

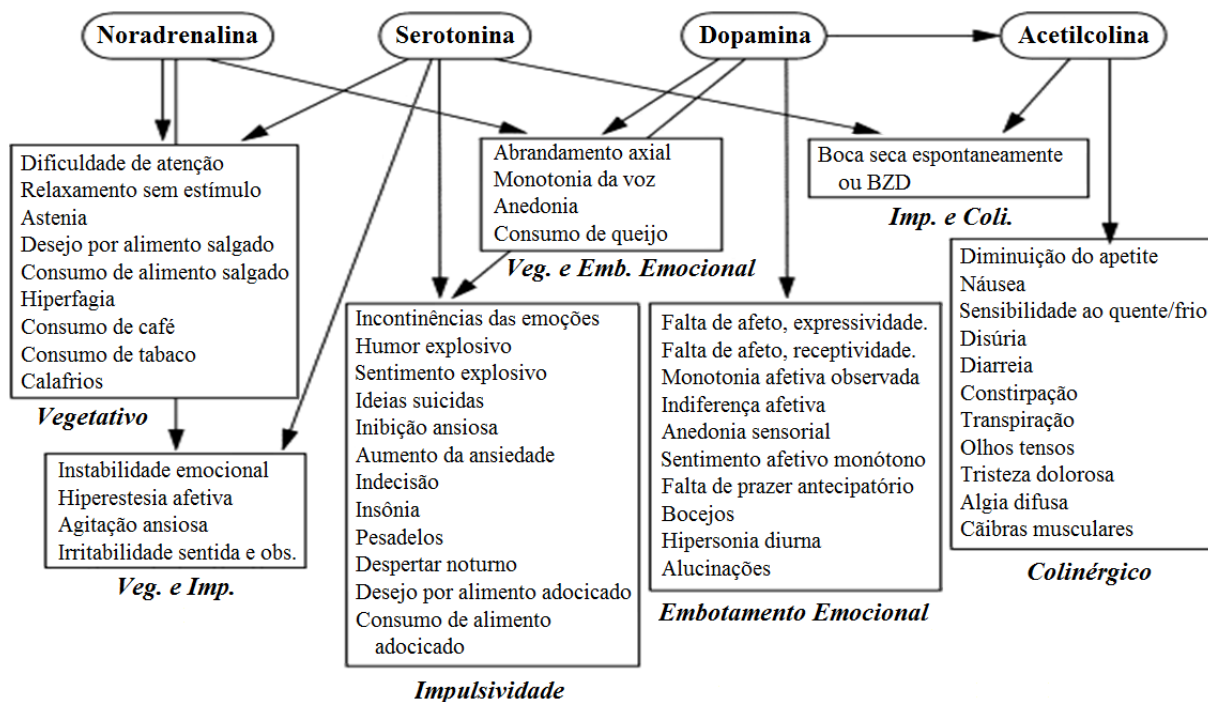


PEPTÍDEOS NEUROTRANSMISSORES (mais de 100 peptídeos, normalmente contendo 3-30 aminoácidos)



Fonte: adaptado da internet.

Figura A14 – Esquema do *modus operandi* dos tipos de neurotransmissores.



Fonte: adaptado da internet.

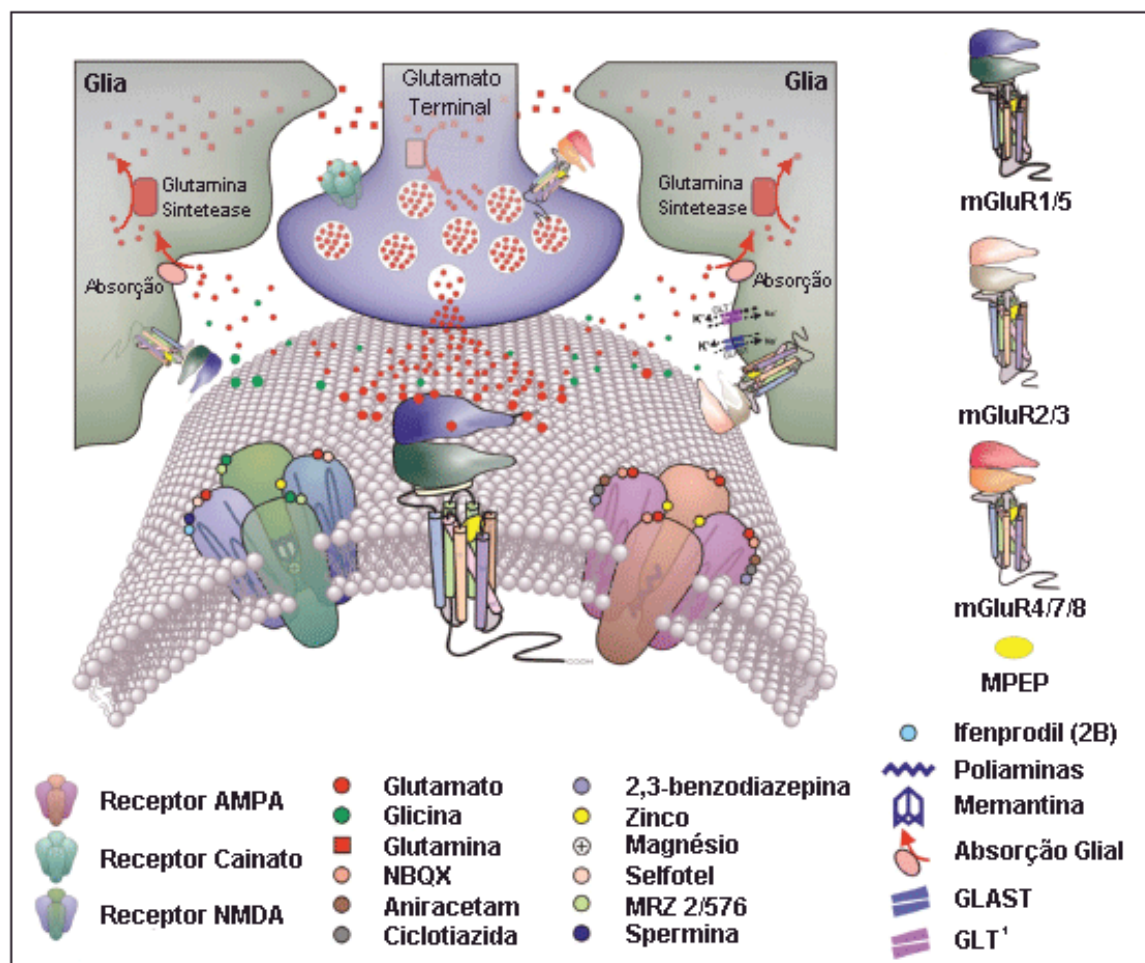
Figura A15 – A atuação de neurotransmissores em casos clínicos.

Substância	Local da Liberação	Efeito	Exemplo Clínico
Acetilcolina (ACh)	Sinapse do SNC, sinapse do SNA, e junções neuromusculares	Excitatório ou inibitório	Doença de Alzheimer (um tipo de demência senil) está associada com uma diminuição na secreção de acetilcolina pelos neurônios. Miastenia gravis (fraqueza dos músculos esqueléticos) resulta de uma redução nos receptores de acetilcolina.
Norepinefrina (NE)	Selecionadas sinapses do SNC e algumas sinapses do SNA	Excitatório	Cocaina e anfetaminas aumentam a liberação e bloqueiam a recaptação de noradrenalina, resultando em superestimulação de neurônios pós-sinápticos.
Serotonina	Sinapses do SNC	Geralmente inibitório	Ela está envolvida com o humor, ansiedade, e indução de sono. Os níveis de serotonina são elevados na esquizofrenia (delírios, alucinações, e retirada). Drogas que bloqueiam os transportadores da serotonina, tais como Prozac, são utilizados para tratar a depressão e a ansiedade.
Dopamina	Selecionadas sinapses do SNC e algumas sinapses do SNA	Excitatório ou inibitório	Doença de Parkinson (depressão do controle motor voluntário) resulta da destruição de neurônios secretores de dopamina.
Ácido γ-aminobutírico (GABA)	Sinapses do SNC	Inibitório	Drogas que aumentam a função do GABA têm sido utilizadas para tratar a epilepsia (descarga excessiva dos neurônios).
Glicina	Sinapses do SNC	Inibitório	Receptores de glicina são inibidos pela toxina estriquina. A estriquina aumenta a excitabilidade dos neurônios determinados por bloquear a sua inibição. O envenenamento por estriquina resulta em contrações musculares potentes e convulsões.
Endorfinas	Vias descendentes da dor	Inibitório	Os opiáceos morfina e heroína se ligam aos receptores de endorfina nos neurônios pré-sinápticos e reduzem a dor bloqueando a liberação do neurotransmissor.

Fonte: adaptado da internet.

Quanto à localização dos iGluRs, estudos de diferentes linhas mostram uma predominância na presença pós-sináptica de receptores NMDA e AMPA que são co-expressos na maioria das sinapses excitatórias, porém, em alguns terminais, apenas receptores NMDA estão presentes e nestes casos, eles exigem uma despolarização da membrana para que ocorra a ativação. Já com relação aos receptores cainato, estudos mostram sua maior localização em terminais pré-sinápticos (BRÄUNER-OSBORNE *et al.*, 2000). O esquema de uma sinapse glutamatérgica é mostrado na Figura A16, onde se pode observar os vários tipos de receptores de glutamato e sua respectiva localização na sinapse, seja na célula pré ou pós-sináptica ou seja em células gliais. Uma ocorrência intrigante a respeito dos receptores NMDA foi revelada por estudos biofísicos. O caso único em que ocorre a co-ativação das subunidades NR1 e NR2, simultaneamente por glutamato e glicina respectivamente (MAYER, 2006).

Figura A16 – Desenho esquemático de uma fenda sináptica glutamatérgica: moléculas de glutamato difundem-se pela fenda sináptica onde algumas se ligarão aos diferentes receptores de glutamato.



Fonte: adaptado de Oliveira, Pereira, 2009.

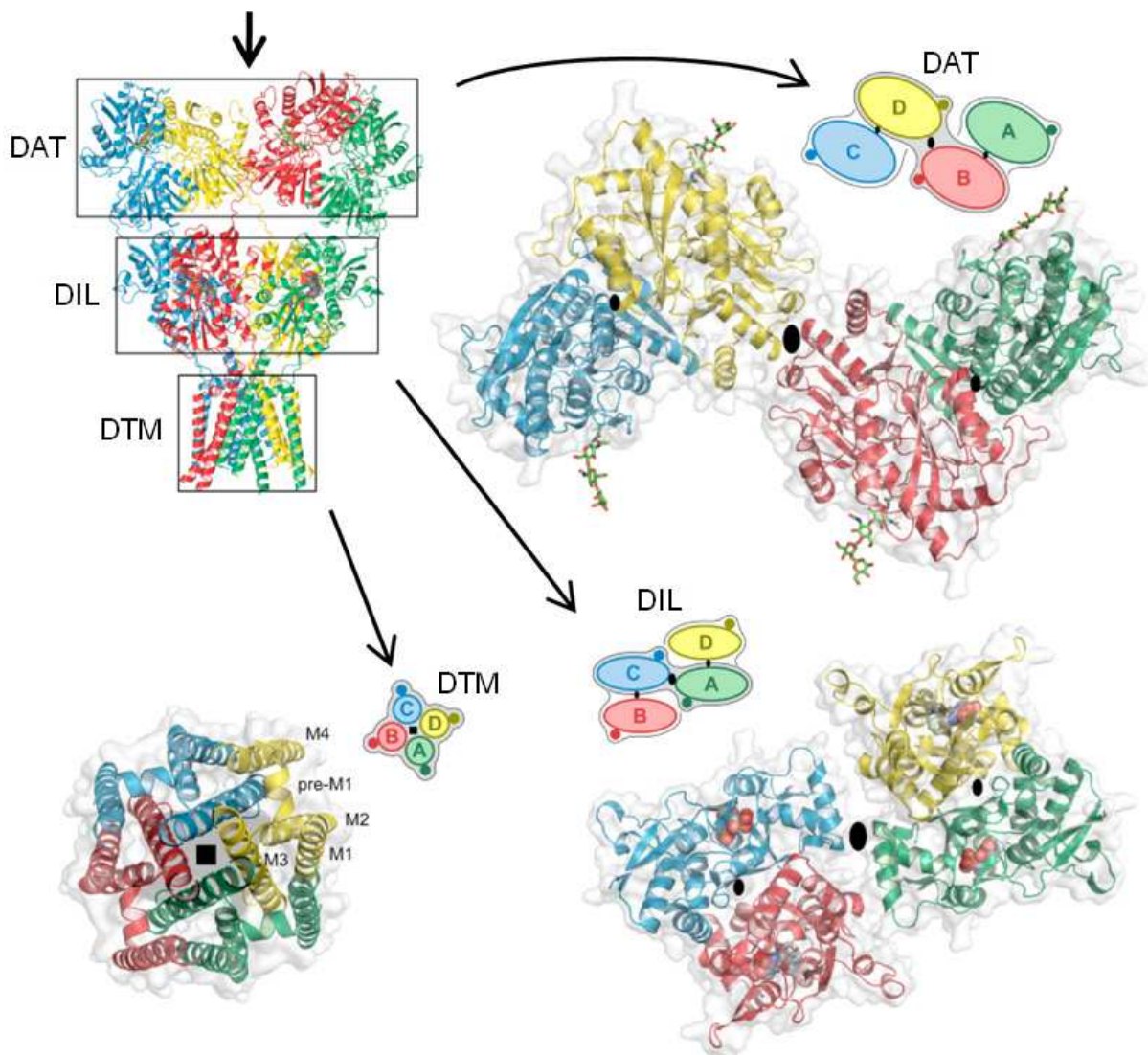
Esses receptores são proteínas de membrana que, cruzando-a, formam um canal. Ressalta-se que toda proteína é um sequenciamento de aminoácidos unidos por ligações peptídicas, e estes resíduos de aminoácidos são enumerados partindo do N-terminal até o C-terminal. Similaridades na sequência envolvendo todas as subunidades conhecidas sugerem uma semelhança nas suas arquiteturas. As subunidades iGluRs são estruturas modulares que possuem quatro domínios semi-independentes: domínio amino-terminal (DAT) que se encontra no meio extracelular; domínio de interação do ligante (DIL), também extracelular; domínio transmembranar (DTM) e o domínio carboxi-terminal intracelular (DCT) (TRAYNELIS *et al.*, 2010).

Cada GluR é composto por quatro subunidades iguais ou não, pertencentes à mesma família. Seis subunidades conhecidas pertencem à família dos receptores do tipo NMDA (NR1, NR2A-D e NR3A), para AMPA, foram caracterizadas quatro subunidades (GluR1-4) e receptores cainato podem ser construídos por cinco tipos de subunidades (GluR5-7, KA1 e KA2). Existem, ainda, duas subunidades que não compõem os receptores dos tipos NMDA, AMPA e cainato, por isso são denominadas órfãs  $\delta 1$  e  $\delta 2$  (MAYER, 2005; MAYER, 2006).

Um estudo realizado, evidenciou que esses receptores são formados por um dímero de dímeros e, recentemente, a determinação de uma estrutura cristalográfica da estrutura de um receptor AMPA homo-tetramérico completo com o DAT, DIL e DTM, depositado no banco de dados com PDB de nome 3KG2 (SOBOLEVSKY *et al.*, 2009), comprovou os resultados anteriores revelando uma simetria  $C_2$  para os domínios extracelulares DAT e DIL e uma simetria  $C_4$  para DTM (STAWSKI *et al.*, 2010), como ilustra a Figura A17.



Figura A17 – Estrutura e organização dos domínios dos receptores de glutamato.



Fonte: Sobolevsky *et al.*, 2009.

## REFERÊNCIAS

- ALBERTS, B.; BRAY, B.; LEWIS, J.; et al. **Molecular Biology of the Cell**, 3<sup>rd</sup> Ed. Garland Science, New York, 1994.
- ARMSTRONG, N; GOUAUX, E. Mechanisms for activation and antagonism of an AMPA-sensitive glutamate receptor: crystal structures of the GluR2 ligand binding core. **Neuron**, vol. 28, p. 165-181, 2000.
- BEAR, M. F.; CONNORS, B. W.; PARADISO, M. A. **Neuroscience: Exploring the Brain**. 3<sup>rd</sup> Ed. LWW, USA, 2007.
- BÄRÄUNER-OSBORNE, H.; EGEBJERG, J.; NIELSEN, E. Ø.; MADSEN, U.; KROGSGAARD-LARSEN, P. Ligands for Glutamate Receptors: Design and Therapeutic Prospects. **J. Med. Chem.**, vol. 43, p. 2609-2645, 2000.
- BRUNTON, L.; PARKER, K., BLUMENTHAL, D.; BUXTON, I. **Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics**. 11<sup>th</sup> Ed. McGraw-Hill, New York, 2008.
- DEBANNE, D.; DAOUDAL, G.; SOURDET, V.; RUSSIER, M. Brain plasticity and ion channels. **J. Physiol. Paris**, vol. 97, p. 403-414, 2003.
- DINGLELINE, R.; BORGES, K.; BOWIE, D.; TRAYNELIS, S. T., The Glutamate Receptor Ion Channels. **Pharmac. Rev.**, vol. 51, p. 7-61, 1999.
- DRACHMAN, D. Do we have brain to spare? **Neurology**, vol. 64, p. 2004-2005, 2005.
- FERREIRA, A. B. H., **Novo Dicionário da Língua Portuguesa**, 5<sup>a</sup> Ed. Positivo, Rio de Janeiro, 2272 p. 2010.
- HORMUZDI, S. G.; FILIPPOV, M. A.; MITROPOULOU G.; MONYER, H.; BRUZZONE, R. Electrical synapses: a dynamic signaling system that shapes the activity of neuronal networks. **Biochim. Biophys. Acta**, vol. 1662, p. 113-137, 2004.
- IBRO - International Brain Research Organization (2005): Neurociência: a ciência do cérebro. Disponível em [http://www.braincampaign.org/Pub/Pub\\_Front.asp](http://www.braincampaign.org/Pub/Pub_Front.asp).
- KANDEL, E. R.; SCHWARTZ, J. H.; JESSELL, T. M., **Principles of Neural Science**. 4<sup>th</sup> Ed. McGraw-Hill, New York, 2000.
- LODISH, H.; BERK, A.; MATSUDAIRA, P.; KAISER, C. A.; KRIEGER, M.; SCOTT, M. P.; ZIPURSKY, L. S.; DARNELL, J. **Molecular Cell Biology**. 5<sup>th</sup> Ed., W. H. Freeman and Company, 2004.
- MAYER, M. L., Glutamate receptor ion channels. **Cur. Opi. Neurobio.**, vol. 15, p. 282-288, 2005.
- MAYER, M. L., Glutamate receptor at atomic resolution. **Nature**, vol. 440, p. 456-462, 2006.
- NAKAGAWA, T. The Biochemistry, Ultrastructure, and Subunit Assembly Mechanism of AMPA Receptors. **Mol. Neurobiol.**, vol. 42, p. 161-184, 2010.
- OLIVEIRA, A. S. B.; PEREIRA, R. D. B. Amyotrophic Lateral Sclerosis (ALS). **Arq. Neuropsiq.**, vol. 67, p. 750-782, 2009.
- PASCUAL-LEONE, A.; AMEDI, A.; FREGNI, F.; MERABET, L. B.; The Plastic Human Brain Cortex. **An. Rev. of Neur.**, vol. 28, p. 377-401, 2005.
- PURVES, D.; AUGUSTINE, G. J.; FITZPATRICK, D.; HALL, W. C.; LAMANTIA, A.-S.; MCNAMARA, J. O.; WHITE, L. E. **Neurociências**. Tradução da 4<sup>a</sup> Ed. de Neuroscience, Porto Alegre, Brasil, Editora Artmed, 2010.



RAMACHANDRAN, V. S.; BLAKESLEE, S. **Fantasmas no cérebro**. Rio de Janeiro, Brasil, Editora Record, 2004.

SIEGEL, G. J., **Basic Neurochemistry: Molecular, cellular and medical aspects**. 7<sup>th</sup> Ed. Elsevier, USA, 2006.

SOBOLEVSKY, A. I.; ROSCONI, M. P.; GOUAUX, E. X-ray structure, symmetry and mechanism of an AMPA-subtype glutamate receptor. **Nature**, vol. 462, p. 745-758, 2009.

Society for Neuroscience (2012): Brains Facts, Disponível em <http://www.sfn.org/index.aspx?pagename=brainfacts>.

STAWSKI, P.; JANOVJAK, H.; TRAUNER, D. Pharmacology of ionotropic glutamate receptors: A structural perspective. **Bioorg. Med. Chem.**, vol. 18, p. 7759-7772, 2010.

TRAYNELIS, S. F.; WOLLMUTH, L. P.; MCBRAIN, C. J.; MENNITI, F. S.; VANCE, K. M.; OGDEN, K. K.; HANSEN, K. B.; YUAN, H.; MYERS, S. J.; DINGLEDINE, R. Glutamate Receptor Ion Channels: Structure, Regulation, and Function. **Pharmac. Rev.**, vol. 62, p. 405-496, 2010.

VINCENT, J.-D. **Viagem extraordinária ao centro do cérebro**. Rio de Janeiro, Brasil, Editora Rocco Ltda., 2007.

Wikipédia (2012a): Cérebro. Disponível em <http://pt.wikipedia.org/wiki/Cérebro>.

Site Academic: [http://academic.kellogg.edu/herbrandsonc/bio201\\_mckinley/bio201s.htm](http://academic.kellogg.edu/herbrandsonc/bio201_mckinley/bio201s.htm)

Site CVTSA: <http://www.cvtasa.com/AL00080Cardiovascularsystemanatomy/M-444-170.html>

Site Clipart: [http://www.clipart.dk.co.uk/413/subject/Biology/Nervous\\_system](http://www.clipart.dk.co.uk/413/subject/Biology/Nervous_system)

**Fundamentos Teóricos**

---

**APÊNDICE B**



A química teórica baseia-se na aplicação da física e da matemática na explicação e predição de fenômenos químicos e propriedades físicas e químicas dos sistemas de interesse, enquanto que a química computacional é a aplicação desses modelos físicos e matemáticos por meio de *softwares* para obtenção de dados a respeito de um sistema. Deve-se ressaltar que existe certa sinergia entre o desenvolvimento das teorias, modelos e *softwares* que as usam e o desenvolvimento dos *hardwares*. A grande evolução dos computadores nas últimas décadas, foi acompanhada pelo crescimento e desenvolvimento de programas de cálculo aplicáveis a sistemas químicos e às teorias por eles empregadas.

Os modelos implementados nos programas computacionais seguem formalismos que se diferenciam quanto ao seu rigor teórico e influenciam, diretamente, no custo computacional. Quanto maior o rigor, maior o custo computacional. Dentre as principais abordagens da química computacional pode-se citar: métodos clássicos, semi-empíricos, *ab initio*, e métodos de Hamiltoniano efetivo (ressaltando-se o DFT).

### **B1. Dinâmica Molecular Clássica**

A implementação de simulações numéricas de sistemas físicos usando mecânica quântica, necessária para o estudo de sistemas atômicos e moleculares, exige usualmente um alto preço computacional, sendo viável apenas para sistemas com no máximo alguns milhares de átomos (na abordagem semi-empírica). Para estruturas maiores, métodos clássicos que não exigem o cálculo de funções de onda eletrônicas são adotados. A dinâmica molecular clássica (Classical Molecular Dynamics - CMD) é um método de aproximação onde são levadas em conta tão somente as coordenadas nucleares, e onde as interações entre os átomos são representadas por campos de força, que definem uma energia potencial para cada configuração do sistema em estudo.

Os campos de força são compostos por termos harmônicos para representar ligações covalentes, e termos de Van der Waals, Coulomb e Morse para ligações não-covalentes. A parametrização desses termos é feita de modo a ajustar-se a dados experimentais e/ou teóricos obtidos a partir de simulações de primeiros princípios. Quando sistemas com até milhões de átomos precisam ser descritos sem a necessidade de detalhamento da estrutura eletrônica ou quando se deseja fazer uma simulação dinâmica de longa duração, a dinâmica molecular clássica é de grande utilidade.

Neste formalismo, modelar uma molécula de proteína formada por centenas ou milhares

de átomos é perfeitamente possível. Elementos estatísticos e termodinâmicos podem ser inseridos facilmente na metodologia, como a definição de temperatura e pressão. As propriedades macroscópicas do sistema em estudo podem ser obtidas a partir da análise do movimento das partículas e, conseqüentemente, da evolução temporal das configurações microscópicas. Partículas interagentes, dadas as condições iniciais, movimentam-se sob a ação dos campos de força já mencionados. Conhecendo posições e velocidades de todas as partículas em um dado instante  $t_o$ , pode-se computar a força resultante sobre cada partícula, devido às interações com as demais e então determinar posições e velocidades em um instante posterior,  $t_o + \delta t$ , por meio das equações newtonianas de movimento. As novas posições são utilizadas para o cálculo de novas forças e daí posições e velocidades em  $t_o + 2\delta t$ . Este procedimento é repetido sucessivamente, reproduzindo a trajetória do sistema.

A quantidade de partículas suportadas nas simulações de dinâmica molecular depende principalmente da capacidade computacional disponível, mas deve, sobretudo, ser representativa do sistema macroscópico real. O tempo total de simulação depende dos processos dinâmicos investigados, sendo possível observar diferentes velocidades de convergência para diferentes propriedades de interesse.

A seguir, é descrita a obtenção da equação que governa o método de dinâmica molecular quântica para um sistema formado por muitos núcleos e elétrons, sendo esta originada da equação de Schrödinger dependente do tempo,

$$-\frac{\hbar^2}{2m}\nabla^2\Psi(\vec{X},\vec{x},t)+V(\vec{X},\vec{x},t)\Psi(\vec{X},\vec{x},t)=i\hbar\frac{\partial}{\partial t}\Psi(\vec{X},\vec{x},t) \quad (\text{B.1})$$

que fornece as probabilidades de encontrar a partícula em qualquer posição no espaço no instante  $t$ .  $\Psi(\vec{X},\vec{x},t)$  é a função de onda, que contém toda a informação sobre o estado quântico do sistema e depende das coordenadas espaciais e de spin dos núcleos ( $\vec{X}$ ) e dos elétrons ( $\vec{x}$ ), e do tempo  $t$ .

Quando os potenciais não são explicitamente dependentes do tempo, a equação de Schrödinger pode ser separada em uma parte espacial e outra parte dependente do tempo. Assim, a função de onda é escrita como:

$$\Psi(\vec{X}, \vec{x}, t) = \psi(\vec{X}, \vec{x})f(t) \quad (\text{B.2})$$

e a parte independente do tempo da equação de Schrödinger toma a forma:

$$-\frac{\hbar^2}{2m} \nabla^2 \psi(\vec{X}, \vec{x}) + V(\vec{X}, \vec{x})\psi(\vec{X}, \vec{x}) + E\psi(\vec{X}, \vec{x}) \quad (\text{B.3})$$

em que  $E$  é a autoenergia do autoestado  $\psi(\vec{X}, \vec{x})$ .

Para um sistema formado por elétrons e núcleos, a equação de Schrödinger independente do tempo pode ser escrita de forma compacta:

$$H\psi(\vec{X}, \vec{x}) = E\psi(\vec{X}, \vec{x}) \quad (\text{B.4})$$

sendo  $H$  o operador Hamiltoniano não relativístico.

Grande parte do custo computacional de um cálculo de dinâmica quântica decorre da determinação ou aproximação de  $\psi(\vec{X}, \vec{x})$ . A função de onda dos elétrons pode ser desacoplada da função de onda dos núcleos, de acordo com a aproximação de Born-Oppenheimer. Os erros associados a esta aproximação são geralmente muito pequenos.

Na aproximação Born-Oppenheimer a função de onda do sistema é separada em sua parte nuclear e sua parte eletrônica. A função de onda dos elétrons é calculada para uma configuração fixa de coordenadas nucleares. Os núcleos, por sua vez, movem-se pela ação da força resultante das interações internucleares e das interações eletrônicas. Assim, é possível simplificar o problema dos graus de liberdade eletrônicos eliminando termos exclusivamente nucleares, definindo um Hamiltoniano puramente eletrônico e outro nuclear,

$$H_e \phi(r, R) = E(R)\phi(r, R) \quad (\text{B.5})$$

$$H_n \Phi(r, R) = E(R)\Phi(r, R) \quad (\text{B.6})$$

$H_e$  é o Hamiltoniano eletrônico obtido considerando que os núcleos estão imóveis nas posições definidas pelo vetor  $R$ , e  $r$  é o conjunto de coordenadas espaciais eletrônicas (os spins tanto dos núcleos como dos elétrons podem ser provisoriamente ignorados).  $H_n$  é o



Hamiltoniano nuclear e  $\phi(r, R)$  e  $\Phi(r, R)$  são as funções de onda eletrônica e nuclear, respectivamente.  $E(R)$  é uma autoenergia do sistema, definida a partir das posições nucleares. Pode-se representar geometricamente  $E(R)$  por uma hipersuperfície no espaço de coordenadas  $R$ , denominada de hipersuperfície de energia potencial.

A eq. B.5, aliada as restrições do princípio de exclusão de Pauli (a anti-simetria da função de onda eletrônica) permite calcular uma superfície de energia potencial gerada pela presença dos elétrons para cada posição dos núcleos. Esta energia potencial e a repulsão eletrostática entre os núcleos compõem a energia potencial total do sistema. A resolução desta equação exige o uso de ferramentas de cálculos de primeiros princípios (*ab initio*), característico dos métodos de dinâmica molecular quântica.

A eq. B.6 trata explicitamente a componente associada à energia cinética dos núcleos bem como a repulsão entre os núcleos. A interação entre elétrons, e entre núcleos e elétrons, pode ser obtida da superfície de energia potencial dos elétrons, eq. B.5. O potencial gerado pelos elétrons e a repulsão nuclear são constantes nesta equação, o que permite o cálculo das forças que agem sobre cada núcleo. As superfícies de energia potencial podem também ser usadas para encontrar as trajetórias dos núcleos em intervalos de tempo pequenos, nos quais as posições dos núcleos variam pouco.

Para a dinâmica molecular clássica considera-se uma aproximação na qual a superfície de energia potencial  $E(R)$  é ajustada através de um campo de força  $V(R)$ , ficando assim a eq. B.6 escrita na forma newtoniana:

$$-\nabla V(R) = M \cdot \frac{d^2 R}{dt^2} \quad (\text{B.7})$$

onde  $M$  é uma matriz com a informação sobre as massas nucleares e  $\frac{d^2 R}{dt^2}$  é a aceleração nuclear. O propósito da MD é justamente solucionar a eq. B.7 para um dado sistema.

Um campo de força típico possui o aspecto geral dado pela seguinte equação:

$$\begin{aligned} V(R) = & \sum_b D_b [1 - \exp(-a(b - b_0))]^2 + \sum_{\theta} H_{\theta} (\theta - \theta_0)^2 + \\ & \sum_{\phi} H_{\phi} [1 + s \cos(n\phi)] + \sum_x H_x X^2 + \sum_b \sum_{b'} F_{bb'} (b - b_0)(b' - b'_0) + \\ & \sum_{\theta} \sum_{\theta'} F_{\theta\theta'} (\theta - \theta_0)(\theta' - \theta'_0) + \sum_x \sum_{x'} F_{xx'} x x' + \sum_i \sum_{j>i} \left[ \frac{A_{ij}}{R_{ij}^{12}} - \frac{B_{ij}}{B_{ij}^6} + \frac{q_i q_j}{R_{ij}} \right] \end{aligned} \quad (\text{B.8})$$

Os primeiros quatro termos são somáticos que refletem a energia necessária para: (i) alterar comprimentos de ligação ( $b$ ); (ii) deformar os ângulos de ligação ( $\theta$ ) em relação aos seus valores de referência; (iii) girar os ângulos de torção ( $\phi$ ) deslocando átomos em torno do eixo de ligação que determina esses ângulos; (iv) deslocar átomos para fora do plano formado por suas ligações químicas com seus vizinhos ( $\chi$ ). Os cinco termos seguintes são termos cruzados de interação entre quatro tipos de coordenadas internas. Finalmente, o termo final descreve as interações não-ligantes como uma soma de termos de atração e repulsão de Lennard-Jones e termos de interação Coulombiana, os quais dependem da distância  $R_{ij}$  entre pares de núcleos.

## B2. Métodos Semi-empíricos

Métodos semi-empíricos foram extremamente importantes no início da química computacional devido às limitações impostas pelos *hardwares*, são ainda muito utilizados atualmente. Estes métodos são uma combinação de mecânica quântica (métodos *ab initio*, ou seja, *Hartree-Fock*), parâmetros empíricos e restrições matemáticas dramáticas. Essas restrições nem sempre são bem fundamentadas teoricamente, porém são compensadas por parâmetros ajustáveis que aparecem no formalismo do método. Esses métodos, devido à simplificação da metodologia mais complexa *Hartree-Fock*, são computacionalmente mais baratos e hoje são empregados a sistemas com centenas ou milhares de átomos dando resultados melhores que os obtidos por mecânica molecular.

Porém, algumas deficiências são encontradas nesses métodos, oriundas das limitações inerentes ao problema de otimização de parâmetros e das aproximações incorporadas no formalismo da metodologia. De modo geral, métodos semi-empíricos têm a tendência de apresentar alguns erros pouco sistêmicos, em contrapartida aos erros sistemáticos e previsíveis que tendem a aparecer partindo de métodos *ab initio*. Com um custo computacional relativamente baixo, há um grande estímulo relacionado ao desenvolvimento de novos métodos e formalismos semi-empíricos que representem mais corretamente as propriedades moleculares, preservando, simultaneamente o baixo custo computacional (LASCHUK, 2005).

Numa abordagem visando combinar termodinâmica, cinética química, mecânica quântica e a teoria da ligação de elétrons de valência, Michael Polanyi e Henry Eyring (1931), introduzem pela primeira vez a metodologia “semi-empírica” em química teórica. A

abordagem de Eyring e Polanyi mesclava teoria com resultados experimentais (daí o nome “semi-empírico”) para construir as hipersuperfícies de energia potencial para sistemas moleculares, mostrando que é possível obter conhecimento sobre os mecanismos de reações adiabáticas e a dinâmica de reações químicas, inclusive a descrição de estados de transição e de complexos ativados. Esta aproximação despertou controvérsias com os defensores do uso de cálculos *ab initio*, os quais julgavam ser o método semi-empírico um “feliz cancelamento de erros”, por não levar em conta “termos de importância considerável”. Esta postura dos “*ab initios*” frente aos “semi-empíricos” foi acirrada ainda mais quando James e Coolidge (1933) (COOLIDGE, JAMES, 1934) publicaram um cálculo *ab initio* onde obtiveram a energia de ligação da molécula de H<sub>2</sub> com 98% de exatidão, cálculo este que demorou um ano para ser realizado. De forma ponderada, Hirschfelder, defendia o método semi-empírico, identificando ter este um caráter *ad hoc*. Este caráter *ad hoc* envolve um risco, uma vez que pode ser perfeitamente possível forçar uma concordância entre um modelo semi-empírico e experimento, mesmo que o modelo seja baseado em uma teoria errada. Hirschfelder (1941) apresentou o cálculo de pelo menos cem energias de ativação para várias reações utilizando o método semi-empírico, mostrando que apenas em alguns casos os valores não concordavam com o experimento.

O método semi-empírico propiciou uma ferramenta de trabalho útil para obter intuições sobre como os processos físicos e químicos ocorrem, e para motivar o surgimento de novas técnicas e experimentos para estudar a combinação temporária de átomos no chamado estado de transição. Viabilizou a construção de mapas visuais de superfícies de energia potencial e a linguagem dos poços de potencial e barreira de ativação. Em contraste com o sucesso dos métodos semi-empíricos, cálculos de primeiros princípios de dinâmica quântica permanecem computacionalmente proibitivos, praticamente impossíveis de serem realizados para muitas reações químicas de interesse prático.

Uma das principais vantagens inerentes ao método semi-empírico é a possibilidade do tratamento de trabalhos publicados descrevendo orbitais moleculares, energias totais, mecanismos de reações enzimáticas, propriedades espectroscópicas de proteínas, estruturas de proteínas, entre outras (NAKAJIMA *et al.*, 2003; NIKITINA *et al.*, 2004; TITMUSS *et al.*, 2002). O desenvolvimento de métodos semi-empíricos, cada vez mais exatos para o tratamento de biomoléculas e sistemas condensados, vem adquirindo um novo e vigoroso impulso motivador.

A exatidão e o poder preditivo de métodos semi-empíricos são determinados

principalmente por três fatores: (1) os dados de propriedades que compõem o conjunto de referência, (2) a qualidade da sua parametrização e (3) o conjunto de aproximações que são usadas. Se os erros associados a estes três fatores são eliminados, tem-se então um método com alto poder preditivo.

Dessa forma, estes três fatores constituem etapas importantes na elaboração de um método semi-empírico de alta qualidade. A parametrização consiste em uma otimização não linear de uma função resposta,  $F_{resp}$ , parametricamente definida num espaço de centenas de dimensões que é calculada a partir dos desvios dos resultados previstos,  $q^{calc}$ , com os de referência,  $q^{ref}$ , geralmente experimentais.

$$F_{resp} = \sum_i (q_i^{calc} - q_i^{ref})^2 w_i^2 \quad (\text{B.9})$$

Para a parametrização ser bem sucedida, um grande conjunto de dados é necessário. Tanto uma ampla faixa de moléculas quanto propriedades obtidas com precisão são essenciais. E em relação à qualidade do método, o esperado é encontrar um mínimo global aceitável na hipersuperfície de parâmetros que faça sentido químico, e esta superfície pode atingir dezenas de dimensões.

Dentre as aproximações semi-empíricas mais usadas, podem ser citadas: CNDO (em inglês *Complet Neglect of Differential Overlap*, usa parametrização *ab initio*), ZINDO/S (*Zerner-Intermediate Neglect of Differential Overlap/Spectroscopy*, parametrização para obtenção do espectro de excitação óptica), reparametrização do INDO (*Intermediate Neglect of Differential Overlap*, parametrização *ab initio*), NDDO (*Neglect of Diatomic Differential Overlap*, parametrização *ab initio*), que são métodos baseados na aproximação ZDO (*Zero Differential Overlap Approximation*), AM1 (*Austin Method One*, parametrização experimental) e PM3 (*Parametric Method 3*, parametrização experimental).

### B3. Métodos *ab initio*

Métodos *ab initio* (do latim “desde o começo”) buscam resolver diretamente a equação de onda desenvolvida por Schrödinger sem uso de nenhum dado experimental, excetuando-se algumas constantes da física. Na prática, excluindo-se os átomos de hidrogênio e hélio, essa

equação é insolúvel para todos os sistemas. Assim, algumas restrições matemáticas são aplicadas para se obter a solução do problema.

### B.3.1 O Hamiltoniano geral

Sistemas em nível atômico e molecular são regidos pelos princípios e leis da mecânica quântica, tendo a equação de Schrödinger como a fundamental. Como sistemas com mais elétrons que átomos hidrogenóides ou o átomo de hélio não apresentam solução analítica exata, métodos aproximados e soluções numéricas são as saídas inevitáveis para resolver os problemas mais complexos, e o fazem, em geral, de maneira satisfatória.

Dado o Hamiltoniano para sistemas multieletrônicos, a equação de Schrödinger não-relativística dependente do tempo será:

$$i\hbar \frac{\partial \Psi(\{\vec{r}_i\}; t)}{\partial t} = \hat{H} \Psi(\{\vec{r}_i\}; t) \quad (\text{B.10})$$

onde, de forma a simplificar a notação, define-se que as coordenadas de spin da  $i$ -ésima partícula estão inseridas no conjunto de coordenadas denotada por  $\Psi(\{\vec{r}_i\}; t) = \Psi(\vec{r}_1, \vec{r}_2, \dots, \vec{r}_N; t)$ . Um Hamiltoniano adequado para sistemas multieletrônicos e multinucleares pode ser escrito no sistema de unidades atômicas, em que  $\hbar = m_e = e = 4\pi/\epsilon_0 = 1$ , da seguinte forma:

$$\hat{H} = \hat{T}_e + \hat{V}_{Ne} + \hat{V}_e + \hat{T}_N + \hat{V}_N$$

$$H = -\frac{1}{2} \sum_i \nabla_i^2 - \sum_{i,I} \frac{Z_I}{|\vec{r}_i - \vec{R}_I|} + \sum_{i \neq j} \frac{1}{|\vec{r}_i - \vec{r}_j|} - \frac{1}{2M_I} \sum_I \nabla_I^2 + \sum_{I \neq J} \frac{Z_I Z_J}{|\vec{R}_I - \vec{R}_J|} \quad (\text{B.11})$$

onde usamos as letras minúsculas para variáveis relativas aos elétrons e as maiúsculas, para os núcleos atômicos. De forma a buscar correlações eletrônicas descritas satisfatoriamente, as interações coulombianas elétron-elétron são os termos de muitos corpos em que reside boa parte das aproximações hoje utilizadas. Para um sistema atômico, podemos separar esse hamiltoniano em duas partes: uma, levando em consideração a parte eletrônica e a outra, a

nuclear. Se levarmos em conta que a massa do núcleo é muito maior que a do elétron, então o único termo suficientemente pequeno da Eq. B.11 para  $M_I \rightarrow 1$ , e que pode ser considerado como uma perturbação, é o termo de energia cinética. Assim:

$$\hat{H} = \hat{H}_{ele} + \hat{V}_N \quad (\text{B.12})$$

onde,

$$\hat{H}_{ele} = \hat{T}_e + \hat{V}_{Ne} + \hat{V}_e \quad (\text{B.13})$$

A interpretação física dessa aproximação, conhecida como Aproximação de Born-Oppenheimer, é de que ao menor movimento nuclear, os elétrons instantaneamente se rearranjam de forma a recuperar a estrutura eletrônica para a nova configuração nuclear. Por outro lado, as variações sentidas pelos núcleos devido o movimento eletrônico podem ser negligenciadas, de modo que podemos considerar os núcleos “fixos” e desacoplar o movimento eletrônico do nuclear. Dessa forma, resolve-se a equação de Schrödinger para o hamiltoniano eletrônico, dada uma configuração nuclear, e se obtém um potencial efetivo, que seria utilizado no cálculo do movimento nuclear, de maneira iterativa.

Em geral, sistemas quânticos ordinários se apresentam em estados estacionários, de forma que a função de onda pode ser separada em duas partes, uma dependente das coordenadas; e a outra, do tempo:

$$\Psi(\{\vec{r}_i\}, t) = \phi(\{\vec{r}_i\}) e^{-i(E/\hbar)t}$$

De acordo com o princípio variacional, a energia do sistema é um mínimo variacional para a classe de funções  $|\phi\rangle$  escolhida, assim  $E = E[\phi]$ , que é o limite superior para a energia exata. Assim, para qualquer estado dinâmico, onde  $E_0$  é a energia do estado fundamental teremos:

$$E[\phi] \geq E_0 \quad (\text{B.14})$$

em que a energia do sistema será dada pelo valor esperado do Hamiltoniano,

$$E[\phi] \equiv \langle \hat{H} \rangle = \frac{\langle \Psi | H | \Psi \rangle}{\langle \Psi | \Psi \rangle} \quad (\text{B.15})$$

e que o princípio variacional leva à equação de autovalor, que é a equação de Schrödinger independente do tempo dada na notação de Dirac

$$\hat{H}|\Psi\rangle = E|\Psi\rangle \quad (\text{B.16})$$

Dada a impossibilidade de se resolver analiticamente e de forma exata sistemas multieletrônicos, e.g. moleculares, recorre-se constantemente a aproximações. A primeira aproximação geralmente usada para resolver a equação de Schrödinger baseia-se na ideia de que a densidade eletrônica espacial dos átomos é muito baixa, ou seja, o raio atômico é compreendido em sua maior parte por regiões sem ocupação eletrônica, de forma que esse fato é utilizado para justificar a aproximação e considerar as partículas independentemente. Essa aproximação prevê que a função de onda do sistema de N elétrons pode ser descrita como um produto de N funções de um elétron, construídas de forma que o princípio de exclusão de Pauli seja satisfeito, o que ocorre pela construção de uma função de onda totalmente anti-simétrica nas coordenadas eletrônicas  $\vec{r}_1, \vec{r}_2, \dots, \vec{r}_N$ , devido ao spin. Essas aproximações podem ser classificadas, basicamente, em não-interagentes (Hartree) e Hartree-Fock, que se diferenciam pelo fato de a segunda levar em consideração explicitamente termos da interação coulombiana elétron-elétron na energia, enquanto que o primeiro faz a correção a partir de um potencial efetivo.

### B.3.3 Hartree-Fock

Na aproximação de Hartree-Fock, a função de onda anti-simétrica é escrita como um determinante formado por funções de estado de uma partícula, e.g. orbital molecular e spin (chamada aqui de spin-orbital molecular), que minimiza a energia total para o hamiltoniano (Eq. B.11), usando o método variacional. A principal consideração feita para o método de Hartree-Fock restrito se deve ao fato de que o número de elétrons é par e a camada orbital molecular é “fechada”. Nos casos em que não há interação spin-órbita, o determinante função de onda  $\Phi$  pode ser escrito como o determinante de Slater:



$$\Phi = \frac{1}{\sqrt{N!}} \begin{vmatrix} \phi_1(r_1, \sigma_1) & \phi_1(r_2, \sigma_2) & \cdots & \phi_1(r_N, \sigma_N) \\ \phi_2(r_1, \sigma_1) & \phi_2(r_2, \sigma_2) & \cdots & \phi_2(r_N, \sigma_N) \\ \vdots & \vdots & \ddots & \vdots \\ \phi_N(r_1, \sigma_1) & \phi_N(r_2, \sigma_2) & \cdots & \phi_N(r_N, \sigma_N) \end{vmatrix} \quad (\text{B.17})$$

em que  $\phi_i(r_j, \sigma_j)$  são funções dos orbitais dependente de spin, onde cada partícula é um produto da função da posição  $\psi_i^\sigma(r_j)$  e da função da variável de spin  $\xi_i(\sigma_j)$ .

$$\xi_i(\sigma_j) = \begin{cases} \alpha(j) \uparrow \\ \beta(j) \downarrow \end{cases} \quad (\text{B.18})$$

Dado o operador anti-simetrizador  $\hat{A}$ , a função de onda  $\Phi$  pode ser escrita como:

$$\Phi = (N!)^{1/2} \hat{A} \{ \phi_1^{(1)} \phi_2^{(2)} \dots \phi_N^{(N)} \} \quad (\text{B.19})$$

$$\hat{A} = \frac{1}{N!} \sum_P \lambda_P \hat{P} \quad (\text{B.20})$$

onde o índice inferior se refere ao estado eletrônico e o superior à partícula em questão.  $\hat{P}$  é o operador permutação e  $\lambda_P = (-1)^{\mathcal{E}P}$ , com  $\mathcal{E}P$  o número de permutações de  $\hat{P}$ . A energia do sistema é dada por:

$$E = \langle \hat{H} \rangle = \int \Phi^* H \Phi dr \equiv E[\Phi]$$

onde o operador hamiltoniano é dado pela Eq. B.13. A equação acima resulta em:

$$E = 2 \sum_i h_i + \sum_{i,j} (2J_{ij} - K_{ij}) \quad (\text{B.21})$$

onde  $h_i$  é a parte do hamiltoniano eletrônico relativo à energia cinética e à interação elétron-núcleo. Os termos  $J_{ij}$  e  $K_{ij}$  são termos de muitos corpos relacionados com a interação elétron-elétron e são dados por:

$$J_{ij} = \iint \phi_i^{*\mu} \phi_j^{*\nu} \phi_i^{\mu} \phi_j^{\nu} \frac{1}{r^{\mu\nu}} d\vartheta^{\mu\nu} \quad (\text{B.22})$$

$$K_{ij} = \iint \phi_i^{*\mu} \phi_j^{*\nu} \phi_j^{\mu} \phi_i^{\nu} \frac{1}{r^{\mu\nu}} d\vartheta^{\mu\nu} \quad (\text{B.23})$$

em que  $\phi_i^{\mu}$  representa a função de spin-orbital molecular para o estado eletrônico  $i$  do elétron  $\mu$ . A Eq. B.22 representa a interação coulombiana entre as densidades  $|\phi_i|^2$  e  $|\phi_j|^2$ , enquanto que o termo  $K_{ij}$  não possui análogo clássico, e é conhecido como energia de troca, devido ao desacordo entre os estados eletrônicos da mesma partícula, ou seja, temos o produto  $\phi_i^{*\mu} \phi_j^{*\mu}$ .

Podemos definir um operador de Coulomb,  $\hat{J}_i$ , e um operador de Troca,  $\hat{K}_i$ , dados por:

$$\hat{J}_i^{\mu} \phi^{\mu} = \left( \int \frac{\phi_i^{*\nu} \phi_i^{\nu}}{r^{\mu\nu}} d\vartheta^{\nu} \right) \phi^{\mu} \quad (\text{B.24})$$

$$\hat{K}_i^{\mu} \phi^{\mu} = \left( \int \frac{\phi_i^{*\nu} \phi_i^{\nu}}{r^{\mu\nu}} d\vartheta^{\nu} \right) \phi_i^{\mu} \quad (\text{B.25})$$

onde

$$J_{ij} = \int \phi_i^{*\mu} \hat{J}_j^{\mu} \phi_i^{\mu} d\vartheta^{\mu\nu}$$

$$K_{ij} = \int \phi_i^{*\mu} \hat{K}_j^{\mu} \phi_i^{\mu} d\vartheta^{\mu\nu}$$

Se definirmos o operador de interação eletrônica total  $\hat{G}$  e o operador de Fock  $\hat{F}$  por:

$$\hat{F} = \hat{h} + \hat{G}$$

$$\hat{G} = \sum_i (2\hat{J}_i - \hat{K}_i)$$

teremos que a equação a ser resolvida passa a ser:

$$\hat{F}\phi_i = \sum_j \phi_j \varepsilon_{ji} \quad (\text{B.26})$$

ou em notação matricial:

$$\hat{F}\bar{\phi} = \bar{\phi}\bar{\varepsilon} \quad (\text{B.27})$$

Nota-se que a equação acima deve ser resolvida de maneira auto-consistente, uma vez que o operador de Fock definido em termos dos operadores de Coulomb e de Troca (Eqs. B.22 e B.23) depende da própria função de onda que se está buscando saber. A Eq. B.27, também mostra que o problema de  $N$  elétrons se transformou em  $N$  problemas de um elétron. Embora tenha sido descrito apenas para o método de Hartree-Fock restrito, pode-se ter uma ideia de como o método se desenvolve para os casos não-restritos, que é uma generalização do primeiro. A principal consideração feita no caso restrito, foi devido ao fato de o número de elétrons ser par e a camada orbital molecular ser “fechada”, assim a permutação de linhas ou colunas no determinante de Slater considerado (Eq. B.19) gera o mesmo resultado. No caso não-restrito deve-se buscar uma formulação em que a classe de funções de onda  $\Phi$  é formada por monodeterminantes sem que haja qualquer relação entre as partes espaciais dos spin-orbitais e as funções de spin  $\alpha$  e  $\beta$ , de forma que permutações nas linhas ou colunas desses determinantes levem a diferentes resultados. O principal problema das aproximações do tipo Hartree-Fock é devido à consideração inicial de que os elétrons são não-interagentes dada pela independência das funções de estado spin-orbitais de cada elemento. Dessa forma, em princípio, a energia de Hartree-Fock ( $E_{HF}$ ) diferencia-se da energia exata ( $E_{exata}$ ), pela ausência da correlação eletrônica ( $E_{corr}$ ), assim:

$$E_{exata} = E_{HF} + E_{corr}$$

## B4. Teoria do Funcional da Densidade

A teoria do funcional da densidade (*Density Functional Theory* - DFT) é o método mais amplamente utilizado para o estudo da estrutura eletrônica de sólidos e moléculas. Muitos problemas abordados usando métodos *ab initio* pós-Hartree-Fock podem ser resolvidos utilizando-se DFT com custo computacional menor e muitas vezes com acurácia similar. De fato, sistemas com até centenas de átomos podem ser estudados e comparados com dados experimentais a um custo computacional que, algumas vezes, corresponde a uma fração daquele obtido utilizando-se métodos tradicionais de incorporação da correlação eletrônica como, por exemplo, teoria de perturbação e *coupled cluster*. O desenvolvimento de funcionais de troca e correlação mais precisos e de algoritmos eficientes de integração numérica impulsionam mais ainda a adoção de simulações DFT.

O uso da densidade eletrônica,  $\rho(r)$ , como variável básica na descrição de um sistema eletrônico remonta ao início do século XX, quando Drude (1900) aplicou a teoria dos gases a um metal, considerando este como um gás homogêneo de elétrons, para desenvolver a sua teoria sob condução térmica e elétrica. Desde então, vários modelos (Drude, Drude-Sommerfeld, Thomas-Fermi, Thomas-Fermi-Dirac) foram propostos e aperfeiçoados. O modelo de Thomas-Fermi utiliza-se de argumentos estatísticos para aproximar a distribuição de um gás de elétrons e desenvolver o funcional da energia do sistema usando a densidade eletrônica. Esse modelo foi, em seguida, aperfeiçoado para incluir a energia de troca para um gás de elétrons desenvolvida por Dirac. O funcional da energia ( $E$ ) de Thomas-Fermi-Dirac (TFD) é dado por:

$$E_{TFD}[\rho] = C_F \int \rho(r)^{\frac{5}{3}} dr + \int \rho(r)v(r)dr + \frac{1}{2} \iint \frac{\rho(r_1)\rho(r_2)}{|r_1 - r_2|} dr_1 dr_2 - C_x \int \rho(r)^{\frac{3}{4}} dr \quad (\text{B.28})$$

onde:

$$C_F = \frac{3}{10} (3\pi^2)^{\frac{2}{3}} \quad \text{e} \quad C_x = \frac{3}{4} \left( \frac{3}{\pi} \right)^{\frac{1}{3}}$$

e os quatro termos da direita, correspondem, à energia cinética, ao potencial externo, ao potencial de Coulomb e à energia de troca, respectivamente.  $\rho$  e  $r$ , são a densidade

eletrônica e as coordenadas espaciais, nesta ordem.

A publicação de dois teoremas por Hohenberg e Kohn (1964), consolidou o uso da densidade eletrônica,  $\rho(r)$ , como variável básica e lançou os fundamentos da teoria do funcional da densidade moderna (DFT). A partir do formalismo de Hohenberg e Kohn, conceitos importantes na descrição química, tais como: potencial químico, maciez e dureza química, além dos princípios dos ácidos e bases duros e macios, de Pearson, e o da equalização da eletronegatividade, de Sanderson, podem ser calculados, em princípio, de modo exato. Kohn e Sham (1965) propuseram uma forma de aproximar o funcional energia eletrônica, o método KS, que permitiu a implementação prática de cálculos DFT.

O desenvolvimento da metodologia computacional para fazer cálculos no formalismo da teoria do funcional da densidade leva a equações matemáticas semelhantes às equações Hartree-Fock-Roothan. Porém, apesar da semelhança, os resultados de cálculos DFT incorporam a correlação eletrônica em certa medida (por conta da inexistência dos funcionais).

### B.4.1 Análise dos Teoremas

#### B.4.1.1 Teoremas de Hohenberg e Kohn

O Hamiltoniano de um sistema eletrônico molecular, com  $M$  núcleos e  $N$  elétrons, na aproximação de Born-Oppenheimer e desprezando-se os efeitos relativísticos, é dado, em unidades atômicas, por:

$$\hat{H}_{BO} = \underbrace{-\sum_i^N \frac{1}{2} \nabla_i^2}_{\hat{T}} - \underbrace{\sum_A^M \sum_i^N \frac{Z_A}{|R_A - r_i|}}_{\hat{U}} + \underbrace{\sum_{i<j}^N \sum_i^N \frac{1}{|r_i - r_j|}}_{\hat{V}_e} + \underbrace{\sum_{B<A}^M \sum_A^M \frac{Z_A Z_B}{|R_A - R_B|}}_{\hat{R}_{rep}} \quad (\text{B.29})$$

Em que  $i$  e  $j$  representam elétrons;  $A$  e  $B$ , representam os núcleos atômicos;  $r_i$  e  $R_A$ , as coordenadas, do elétron  $i$  e do núcleo  $A$ , respectivamente; e  $Z_A$  o número atômico do átomo  $A$ . Na mesma equação  $\hat{T}$  é o operador da energia cinética;  $\hat{V}_e$ , o operador de repulsão elétron-elétron, que inclui a repulsão Coulombiana e todos os termos não-clássicos (troca e correlação).  $\hat{U}$  é o potencial externo relacionado, normalmente devido às cargas dos núcleos,  $Z_A$ :

$$\hat{U} \sum_A^M \sum_i^N - \frac{Z_A}{|R_A - r_i|} = \sum_i^N v(r_i) \quad (\text{B.30})$$

A densidade eletrônica é dada por:

$$\rho(r) = \int \dots \int \Psi(r_1, r_2, \dots, r_N)^* \Psi(r_1, r_2, \dots, r_N) dr_1 dr_2 \dots dr_N \quad (\text{B.31})$$

onde  $\Psi(r_1, r_2, \dots, r_N)$  é o estado fundamental do sistema. A energia total do sistema é dada, então, por

$$E_0 = \int \Psi(r_1, r_2, \dots, r_N)^* \hat{H}_{BO} \Psi(r_1, r_2, \dots, r_N) dr_1 dr_2 \dots dr_N = \langle \Psi | \hat{H}_{BO} | \Psi \rangle \quad (\text{B.32})$$

O potencial externo pode ser separado em um funcional trivial da densidade eletrônica e nesse caso, a energia total do estado fundamental eletrônico é escrita da seguinte forma:

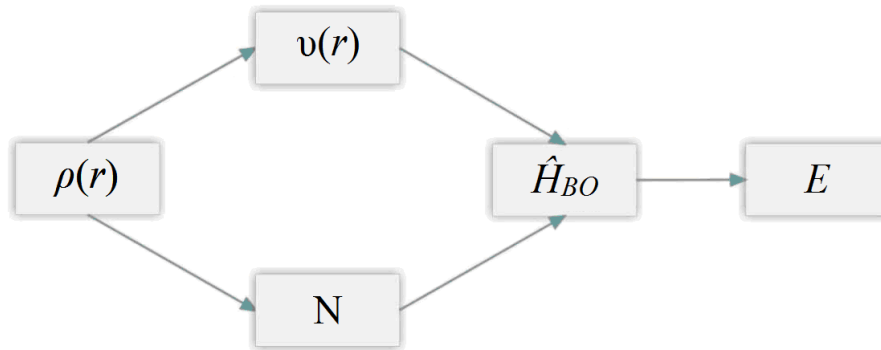
$$E_0 = \langle \Psi | \hat{T} + \hat{V}_e | \Psi \rangle + \int \rho(r) v(r) dr \quad (\text{B.33})$$

O Hamiltoniano do sistema de muitos elétrons é definido pelo número de elétrons, N, e pelo potencial externo no qual os elétrons se movem.

**Teorema B.1** - *O potencial externo  $v(r)$  é um funcional único de  $\rho(r)$  a menos de uma constante aditiva.*

Em outras palavras, demonstra que a densidade eletrônica de um sistema determina o potencial externo e o número de elétrons, N, e, conseqüentemente, o Hamiltoniano do sistema. Na Figura B1 está representada a interdependência das variáveis básicas do primeiro teorema HK:

Figura B1 – Interdependência das variáveis básicas DFT.



Fonte: Martins, 2012.

Como a energia do sistema é calculada mediante a resolução da equação de Schödinger,  $\hat{H}_{BO}\Psi = E\Psi$ , a energia de um sistema eletrônico é determinada pela densidade eletrônica  $\rho(r)$ , ou seja,

$$E = E_v[\rho] \quad (\text{B.34})$$

O índice  $v$  é colocado para explicitar a dependência no potencial externo  $v(r)$ .

**Teorema B.2** - A energia do estado fundamental  $E_0[\rho]$  é mínima para a densidade  $\rho(r)$  exata.

Ou seja, o segundo teorema HK estabelece que, havendo qualquer aproximação da densidade eletrônica,  $\tilde{\rho}(r)$ , de modo que  $\tilde{\rho}(r) \geq 0$  e  $\int \tilde{\rho}(r)dr = N$ , a energia total no estado fundamental será sempre maior ou igual à energia exata do sistema, ou seja,

$$E|\rho| \geq E|\rho_0| = E_0 \quad (\text{B.35})$$

Pode-se, então, definir um funcional universal:

$$F|\rho| = \langle \Psi | \hat{T} + \hat{V}_e | \Psi \rangle \quad (\text{B.36})$$

pois  $\hat{T}$  e  $\hat{V}_e$  são comuns a todos os sistemas eletrônicos. É preciso observar que  $\tilde{\rho}(r)$



define seu próprio  $\tilde{v}(r)$  e, conseqüentemente, o Hamiltoniano  $\tilde{H}$  e  $\tilde{\Psi}(r_1, r_2, \dots, r_N)$ . Pode-se usar uma função  $\tilde{\Psi}(r_1, r_2, \dots, r_N)$  para aproximar o estado fundamental para o sistema submetido ao potencial externo  $v(r)$ . De acordo com o princípio variacional, temos:

$$E_0 = E_v[\rho] = F[\rho] + \int \rho(r)v(r)dr \leq E_v[\tilde{\rho}] = F[\tilde{\rho}] + \int \tilde{\rho}(r)v(r)dr. \quad (\text{B.37})$$

Os teoremas acima apresentados constituem o arcabouço fundamental para a DFT, uma vez que eles estabelecem: primeiro, a energia é um funcional da densidade, cujo mínimo de energia do estado fundamental é dado quando a densidade  $\rho(r)$  equivale à exata; segundo, o potencial externo  $v(r)$  é funcional único da densidade eletrônica  $\rho(r)$ , ou seja, o potencial externo em questão determina a densidade. Assim, para um sistema multi-atômico, a solução eletrônica – de acordo com a aproximação de Born-Oppenheimer – será dada considerando um potencial “externo” gerado pela configuração nuclear. Portanto, se unirmos os dois teoremas, temos que, dada a relação única entre esse potencial “externo” e a densidade  $\rho(r)$  que deve ser a densidade exata, conseqüentemente, encontraremos a energia mínima do sistema. Ou seja, a densidade eletrônica para um dado arranjo nuclear que gera um mínimo de energia será a densidade exata. O grande problema da DFT consiste justamente no fato de que não se sabe como construir *ab initio* a dependência do funcional da energia com a densidade exata, portanto recorreremos a métodos aproximados a saber os mais importantes: Aproximação Local da Densidade (LDA, do inglês *Local Density Approximation*); e Aproximação do Gradiente Generalizado (GGA, do inglês *Generalized Gradient Approximation*).

Para resolver o problema de encontrar a densidade para o sistema de muitos elétrons interagentes, Kohn e Sham (1965) demonstraram que existe uma equivalência entre as densidades eletrônicas do sistema real e de um sistema modelo de elétrons não-interagentes submetidos ao potencial efetivo,  $v_{ef}$ .

### B.4.1.2 Equações de Kohn-Sham

A densidade eletrônica do estado fundamental satisfaz o princípio estacionário, tal como requerido pelo princípio variacional, dado pela Eq. B.37.

$$\delta \left\{ E_v[\rho] - \mu \left[ \int \rho(r) dr - N \right] \right\} = 0 \quad (\text{B.38})$$

O multiplicador de Lagrange,  $\mu$ , é o potencial químico eletrônico que quantifica a tendência dos elétrons de escaparem do sistema em equilíbrio.

Kohn e Sham reescreveram a equação da energia total, tornando explícita a repulsão elétron-elétron de Coulomb e definindo uma nova função universal  $G[\rho]$ :

$$E_v = G[\rho] + \frac{1}{2} \iint \frac{\rho(r_1)\rho(r_2)}{|r_1 - r_2|} dr_1 dr_2 + \int \rho(r)v(r)dr \quad (\text{B.39})$$

em que

$$G[\rho] = T_s[\rho] + E_{xc}[\rho] \quad (\text{B.40})$$

$T_s[\rho]$  é o funcional de energia cinética de um sistema de elétrons que não interagem, mas que tem a mesma densidade eletrônica do sistema de elétrons interagentes.  $E_{xc}[\rho]$  inclui não só o termo de interação elétron-elétron não-clássica (troca e correlação) mas também a parte residual da energia cinética,  $T[\rho] - T_s[\rho]$ , em que  $T[\rho]$  é a energia cinética exata para o sistema de elétrons que interagem.

De acordo com Kohn e Sham, o sistema de referência de elétrons não-interagentes possui um hamiltoniano com potencial local efetivo  $v_{ef}(r)$ :

$$H^{KS} = -\frac{1}{2}\nabla^2 + v_{ef}(r) \quad (\text{B.41})$$

Para achar a função de onda  $\Psi^{KS}$  do estado fundamental do sistema de referência de elétrons não-interagentes, descrito pelo Hamiltoniano acima, deve-se utilizar uma aproximação parecida com a do método Hartree-Fock. A função de onda  $\Psi^{KS}$  é escrita

como um produto anti-simétrico de  $N$  funções de onda de um elétron,  $\Psi_i(r_i)$ , de acordo com o determinante de Slater:

$$\Psi^{KS} = \frac{1}{\sqrt{N!}} \begin{vmatrix} \psi_1^{KS}(r_1) & \psi_2^{KS}(r_1) & \cdots & \psi_N^{KS}(r_1) \\ \psi_1^{KS}(r_2) & \psi_2^{KS}(r_2) & \cdots & \psi_N^{KS}(r_2) \\ \vdots & \vdots & \ddots & \vdots \\ \psi_1^{KS}(r_N) & \psi_2^{KS}(r_N) & \cdots & \psi_N^{KS}(r_N) \end{vmatrix} \quad (\text{B.42})$$

Portanto os orbitais Kohn-Sham (KS),  $\Psi^{KS}$ , são obtidos a partir da equação de Schrödinger de um elétron:

$$\left( -\frac{1}{2} \nabla^2 + v_{et} \right) \psi_i^{KS} = \varepsilon_i \psi_i^{KS} \quad (\text{B.43})$$

A conexão entre esse sistema hipotético e o sistema real pode ser estabelecida escolhendo-se o potencial efetivo, de forma que a densidade eletrônica resultante seja igual à densidade eletrônica do estado fundamental:

$$\rho_s(r) = \sum_i^N 2 |\psi_i^{KS}(r)|^2 = \rho_0(r) \quad (\text{B.44})$$

A energia cinética é calculada mediante um procedimento autoconsistente:

$$T_s[\rho] = \sum_i^N \left\langle \psi_i^{KS} \left| -\frac{1}{2} \nabla_i^2 \right| \psi_i^{KS} \right\rangle \quad (\text{B.45})$$

O potencial efetivo é obtido minimizando-se a expressão da energia, com a restrição de que as funções de um elétron sejam ortogonais, ou seja,  $\langle \psi_i^{KS} | \psi_j^{KS} \rangle = \delta_{ij}$ :

$$v_{ef}(r) = v(r) + \int \frac{\rho(r_1)}{|r - r_1|} dr_1 + v_{xc}(r), \quad (\text{B.46})$$

em que

$$v_{xc} = \frac{\delta E_{xc}[\rho]}{\delta \rho(r)} \quad (\text{B.47})$$

é o potencial de troca e correlação. As Eqs. B.43, B.46 e B.47 definem o esquema de Kohn-Sham autoconsistente (KS-SCF, *Kohn Sham - Self Consistent Field*). Como o potencial efetivo,  $v_{ef}(r)$ , depende da densidade eletrônica,  $\rho(r)$ , as equações de Kohn-Sham são resolvidas por meio de um procedimento autoconsistente.

#### B.4.2 Funcionais de troca e correlação

##### B.4.2.1 Aproximação da Densidade Local

A base da LDA está em considerar a energia de troca e correlação  $E_{xc}$  para um sistema de densidade  $\rho(\vec{r})$  como sendo a energia de troca e correlação para um gás de elétrons uniforme com a mesma densidade, que é conhecida de forma precisa. Ela ainda supõe que a densidade  $\rho(\vec{r})$  varia suavemente nas proximidades de  $\vec{r}$ , ou seja, a energia de troca e correlação de um elétron em um dado ponto depende da densidade eletrônica nesse ponto, em vez de depender da densidade eletrônica em todos os pontos do espaço. Dessa forma, a energia de troca e correlação será escrita como:

$$E_{xc}[\rho(\vec{r})] = \int \rho(\vec{r}) \varepsilon_{xc}^h[\rho(\vec{r})] d^3r \quad (\text{B.48})$$

e o potencial  $v_{xc}$ :

$$v_{xc}[\rho(\vec{r})] = \frac{d}{d\rho(\vec{r})} (\rho(\vec{r}) \varepsilon_{xc}^h[\rho(\vec{r})]) \quad (\text{B.49})$$

Uma das sugestões para o cálculo da  $E_{xc}$ , é separar os termos de troca (que para o caso do gás homogêneo pode ser obtido facilmente) e de correlação, e assim teremos:

$$E_{xc}[\rho(\vec{r})] \approx E_{xc}^{LDA}[\rho(\vec{r})] = \int \rho(\vec{r}) \{ \varepsilon_x[\rho(\vec{r})] + \varepsilon_c[\rho(\vec{r})] \} d^3r \quad (\text{B.50})$$

Uma extensão da LDA para casos não restritos ou para sistemas de camadas abertas (ou seja, sistemas em que a configuração eletrônica apresenta elétrons não-emparelhados) leva à

Aproximação da Densidade de Spin Local (LSDA, do inglês *Local Spin-Density Approximation*). Para incluir esse efeito, consideraremos a função do spin  $\xi(\sigma)$ , que pode ser escrita como de forma semelhante à Eq. B.11. Assim, a Eq. B.48 fica:

$$E_{xc}^{LSDA}[\rho_\alpha(\vec{r}), \rho_\beta(\vec{r})] = \int \rho(\vec{r}) \varepsilon_{xc}[\rho_\alpha(\vec{r}), \rho_\beta(\vec{r})] d^3r \quad (\text{B.51})$$

em que uma correção análoga a Eq. B.50 pode ser feita. Ainda, pode-se usar a distribuição de densidade de spin para descrever onde elétrons  $\alpha(\uparrow)$  e  $\beta(\downarrow)$  estão localizados em um dado sistema, ou seja, calcular a diferença  $\rho_\alpha(\vec{r}) - \rho_\beta(\vec{r})$ . Assim, em um sistema em que todos os elétrons estão emparelhados, a densidade de spin é zero em todos os pontos no espaço, enquanto que qualquer sistema que contenha elétrons desemparelhados irá mostrar regiões de densidade de spin não nulas. A integral da densidade de spin em todo o espaço

$$\int [\rho_\alpha - \rho_\beta] d^3r \quad (\text{B.52})$$

fornece o número total de elétrons desemparelhados (por exemplo, zero para o estado singleto, um para o dubleto, dois para o tripleto, e assim por diante).

#### B.4.2.2 Aproximação do Gradiente Generalizado

Em sistemas que apresentam na densidade eletrônica  $\rho(r)$  heterogeneidades significativas, métodos baseados na aproximação local da densidade (LDA e LSDA) não oferecem a precisão desejada (como ocorre para a maior parte das aplicações na química e na biologia), levando a erros de forma não sistemática, por exemplo, no comprimento e nas energias de ligação. Um avanço, no sentido de resolver essas pendências que a LDA deixa, consiste em introduzir a dependência com o gradiente da densidade  $\rho(\vec{r})$  na expressão do funcional dado pela Eq. B.48. Para um sistema de camada aberta, esse funcional pode ser genericamente escrito da seguinte forma:

$$E_{xc}^{GGA}[\rho_\alpha, \rho_\beta] = \int f[\rho_\alpha, \rho_\beta, \nabla\rho_\alpha, \nabla\rho_\beta] d^3r \quad (\text{B.53})$$

Também no formalismo da GGA, o funcional  $E_{xc}^{GGA}$  é geralmente dividido em duas partes, uma contendo os termos do funcional de troca  $E_x^{GGA}$  e a outra, do funcional de correlação  $E_c^{GGA}$ . No artigo de Filippi *et. al.* (1994) é feita uma comparação entre funcionais de densidade exatos e aproximados para um modelo que pode ser resolvido exatamente, usando alguns dos funcionais mais utilizados.

Existem também os chamados funcionais híbridos, que são formados a partir de uma mistura de uma fração do termo de troca de Hartree-Fock no funcional de troca da DFT, a partir de dados experimentais para sistemas moleculares conhecidos, contendo parâmetros ajustáveis. O uso desses funcionais faz com que alguns autores questionem a DFT como sendo uma teoria de primeiros princípios ou *ab initio*. Para referência, podemos citar alguns dos funcionais mais conhecidos:

- ▶ PBE - baseado nos trabalhos de Perdew, Burke e Erzenhof (1996; 1997);
- ▶ BLYP - combinação do termo de troca desenvolvido por Becke (1986) com o de correlação, por Lee-Yang-Parr (1988);
- ▶ BP86 - combinação do termo de troca de Becke (1986) e o de correlação dado por Perdew (1986);
- ▶ B3LYP - termo de troca exato desenvolvido por Becke (1993);
- ▶ PW91 - aproximação do gradiente generalizado desenvolvido por Perdew-Wang (1992).

Embora o uso da GGA melhore consideravelmente a descrição de ligações (principalmente ligações de hidrogênio) quando comparado com a LDA sem que haja um aumento proibitivo do custo computacional, a descrição de ligações fracas (e.g. interações de van der Waals) permanece problemática.

### ***B.4.3 Conjuntos de base***

Anteriormente, mostrou-se que os métodos aproximativos para solução do problema de um sistema multieletrônico e multinuclear levam a equações que são resolvidas de forma autoconsistente, Eqs. B.26, B.27, B.43. Uma lacuna, entretanto, ficou aberta até aqui, pois o

processo autoconsistente reside também no fato de que os operadores (no caso do Hartree-Fock) e dos funcionais (no caso da DFT) apresentam dependência com a função de onda, de forma que para se construir esses operadores e funcionais, e para encontrar a função de onda, é necessário conhecê-la de antemão. A autoconsistência também serve, então, para se otimizar a função de onda na medida em que se minimiza a energia, ou a densidade, no caso da DFT.

Em geral, supõe-se que a função de onda para um dado sistema apresenta alguma simetria que possa facilitar os cálculos, de acordo com a simetria do próprio sistema. É desejável, principalmente, que se possa escolher a função de onda com parâmetros que sejam ajustáveis durante a autoconsistência. De acordo com cada metodologia, existem, por exemplo para a DFT, duas formas de se estimar a função de onda: (i) Orbitais Numéricos, em que se calcula previamente as funções de onda para os orbitais atômicos e os utiliza para construir os orbitais moleculares, e.g. construção da densidade a partir dos orbitais na Eq. B.44; (ii) Conjuntos de Bases, em que as funções de onda  $\psi_i(\vec{r})$  (ou os orbitais de Kohn-Sham) são expandidas em um conjunto de base  $\phi_{ij}(\vec{r})$ ,

$$\psi_i(\vec{r}) = \sum_j c_j \phi_{ij}(\vec{r}) \quad (\text{B.54})$$

A expansão acima deve ser, em princípio, realizada até o infinito, contudo ela é sempre truncada, de forma que apenas um conjunto limitado de funções de base é usado. Uma das funções mais utilizadas em expansões desse tipo são funções gaussianas, de forma que a expansão mostrada na Eq. B.54 será dada por:

$$\psi_i(\vec{r}) = \sum_j c_j e^{-a_j r^2} \quad (\text{B.55})$$

A precisão do cálculo dada pela expansão para um determinado conjunto de base, e.g. a base gaussiana (Eq. B.55) depende do número de funções que são usadas para representar cada momentum angular atômico, e do “espalhamento” da função gaussiana, dado pelo valor do expoente  $\alpha$  (valores grandes/pequenos de  $\alpha$  resultam em funções compactas/difusas). Várias notações são utilizadas para especificar um conjunto particular funções atômicas gaussianas, tais como o conjunto de base de valência dividida de Pople (e.g., 3–21G, 6–31G ou 6–311++G(2d; 2p)) ou os conjuntos de base *N-zeta valência polarizada consistente-correlacionada* de Dunning (N = duplo, triplo, etc., e.g., cc-pVDZ, cc-pVTZ) dentre outros.



Outra forma de se determinar os orbitais de KS, está no conjunto de base obtido com a expansão em ondas planas (OP) para sistemas periódicos (cristais),

$$\psi_i(\vec{r}) = \frac{1}{\Omega^{1/2}} \sum_G^{G_{\max}} G e^{i\vec{G}\cdot\vec{R}} \quad (\text{B.56})$$

onde  $\Omega$  é o volume da célula e  $G$  é o *momentum de ondas*. Conjuntos de bases de OP são denotados por um valor de energia  $E_{cut}$  relacionado com o máximo valor de  $G$  da expansão B.56.

Uma terceira possibilidade é usar orbitais numéricos para as funções de base, assim cada função corresponde a um orbital atômico. As funções de base  $\chi_{\mu}$  são apresentadas numericamente como valores em um malha esférica-polar atômica centrada, em vez de funções analíticas (ou seja, orbitais Gaussian). A parte angular de cada função é o harmônico esférico apropriado  $Y_{lm}(\theta, \varphi)$ . A porção radial  $F(r)$  é obtida resolvendo-se as equações DFT atômicas numericamente. O uso dos orbitais atômicos esféricos DFT exatos tem várias vantagens. Por um lado, a molécula pode ser dissociado exactamente aos seus átomos constituintes (dentro do contexto DFT). Por causa da qualidade destes orbitais, efeitos de sobreposição de base são minimizadas (Delley, 1990), e é possível obter uma descrição excelente, mesmo para ligações fracas.

#### ***B.4.4 Correção de dispersão para DFT***

Forças não covalentes, como ligações de hidrogênio e interações de van der Waals (vdW), são cruciais para a formação, estabilidade e função de moléculas e materiais. Atualmente, as interações vdW onipresentes só podem ser contabilizados corretamente por funções de onda quânticas de alto nível ou pelo método de Monte Carlo Quântico (*Quantum Monte Carlo* - QMC). Em contraste, as interações de longo alcance (por exemplo, para moléculas separadas) estão ausentes de todos os populares termos de troca e correlação (XC) de funcionais DFT (LDA e GGA), bem como da aproximação Hartree-Fock (HF).

Existe uma variedade de soluções semiempíricas híbridas que introduzem correções de dispersões de pares atômicos amortecidos da forma  $C_6R^{-6}$  no formalismo DFT. Os esquemas mais conhecidos foram apresentadas por Grimme (2006), Jurecka *et al.* (2007), Ortmann *et al.* (2006), e mais recentemente por Tkatchenko e Scheffler (2009). Estas abordagens

semiempíricas proporcionam a melhor combinação entre o custo da avaliação dos primeiros princípios dos termos de dispersão e à necessidade de melhorar as interações não-covalentes na descrição da DFT padrão. A última necessidade é ilustrada de forma conclusiva pelos resultados da determinação da estrutura e predição polimorfa para um número de cristais moleculares oferecidos como um teste cego para a comunidade (DAY *et al.*, 2009). Uma ampla revisão dos resultados mostrou que a combinação semiempírica da abordagem DFT com correções de pares proporciona uma melhoria dramática sobre os métodos DFT puros ou métodos de campo de força puros, ambos em termos da descrição da estrutura e ordenação de polimorfos por suas energias (ASMADI *et al.*, 2009).

Todos estes esquemas foram testados para avaliar o papel das interações de dispersão de longo alcance na adsorção do prototípico molecular azobenzeno nas superfícies de cobre, prata e ouro (MCNELLIS *et al.*, 2009). Os resultados mostram que, enquanto que a correção de dispersão introduz uma alteração apreciável tanto na estrutura e energética do complexo adsorvido, há também uma separação significativa entre as diferentes formas de correção de dispersão.

#### B.4.4.1 Esquemas de correção de dispersão semiempírica

Na abordagem da correção de dispersão semiempírica, a contribuição da dispersão que falta para a interação interatômica é aproximada por um potencial isotrópico simples. A longo alcance, este potencial é dado pelo termo  $C_{6,ij}R_{ij}^{-6}$ , onde  $C_{6,ij}$  é uma especificidade do material, chamada de coeficiente de dispersão entre o par atômico  $i$  e  $j$  a uma distância de  $R_{ij}$ .

A pequenas distâncias, a expressão de longo alcance é comparada com o potencial da DFT multiplicada por uma função de amortecimento  $f(R_{ij}^0, R_{ij})$ , o que reduz a contribuição adicional de dispersão para zero, sujeito a um corte definido por uma combinação  $R_{ij}^0$  adequadamente calculada do raio vdW do par atômico. A dispersão corrigida do funcional de troca e correlação é então formada pela simples adição da correção do potencial para o funcional DFT de troca e correlação comum. Como os coeficientes  $C_{6,ij}$  são aditivos, a energia total da dispersão corrigida  $E_{tot}$  pode, então, ser escrita como:

$$E_{tot} = E_{DFT} + s_i \sum_{i=1}^N \sum_{j>i}^N f(S_R R_{ij}^0, R_{ij}) C_{6,ij} R_{ij}^{-6}, \quad (\text{B.56})$$

sendo  $E_{DFT}$  a energia DFT total padrão e a soma passa por todos os  $N$  átomos do sistema.

Em sistemas existentes,  $R_{ij}^0$  heteronuclear e os coeficientes  $C_{6,ij}$  são aproximados a partir de parâmetros homonucleares determinados semiempiricamente. Diferenças entre funcionais DFT de troca e correlação na descrição de interações de dispersão de curto à médio alcance são levados em consideração por uma modificação adequada do potencial através da correção dos parâmetros  $s_6$  ou  $S_R$ .

Este esquema é computacionalmente simples de implementar, a questão principal (frequentemente o caso com descrições semiempíricas) é a necessidade de um conjunto de parâmetros transferíveis. Essa questão de transferência é extremamente importante - este esquema, tal como apresentado, ignora a variação substancial entre as propriedades entre “átomos” efetivos da mesma espécie na molécula, por exemplo, a influência de estados de hibridação em polarizabilidade efetiva é desprezada. Isto pode ser particularmente grave para a superfície metálica, onde o abaixamento da constante dielétrica efetiva devido ao rastreo deve ser refletido por coeficientes de dispersão de átomos reduzidos em camadas mais profundas no substrato.

O estado da arte em métodos de correções semiempíricas é representado pelo esquema de Tkatchenko-Scheffler (TS) (2009). A correção TS explora a relação entre polarizabilidade e volume, e, assim, é responsável, em certa medida pela variação relativa em coeficientes de dispersão de átomos ligados de forma diferente. Isto é conseguido por valores de ponderação tomados a partir de banco de dados de primeiros princípios de alta qualidade com volumes atômicos derivados do particionamento de Hirshfeld da densidade eletrônica auto-consistente. O esquema de TS usa a mesma função de amortecimento empregada no esquema de Grimme (2006), mas seguindo Jurecka *et al.* (2007) em vez escalar o raio vdW combinado por um fator dependente XC-funcional  $SR \neq 1$  ( $S6 \equiv 1$ ), corrigindo assim onde a influência XC-funcional é mais forte e deixando assintóticos intacto.

Figura B2 – Elementos com cobertura para o esquema de correcção de dispersão TS. Os elementos de cor verde estão disponíveis.

## TS

<b>H</b>																<b>He</b>		
<b>Li</b>	<b>Be</b>										<b>B</b>	<b>C</b>	<b>N</b>	<b>O</b>	<b>F</b>	<b>Ne</b>		
<b>Na</b>	<b>Mg</b>										<b>Al</b>	<b>Si</b>	<b>P</b>	<b>S</b>	<b>Cl</b>	<b>Ar</b>		
<b>K</b>	<b>Ca</b>	<b>Sc</b>	<b>Ti</b>	<b>V</b>	<b>Cr</b>	<b>Mn</b>	<b>Fe</b>	<b>Co</b>	<b>Ni</b>	<b>Cu</b>	<b>Zn</b>	<b>Ga</b>	<b>Ge</b>	<b>As</b>	<b>Se</b>	<b>Br</b>	<b>Kr</b>	
<b>Rb</b>	<b>Sr</b>	Y	Zr	Nb	Mo	Tc	Ru	Rh	Pd	<b>Ag</b>	Cd	<b>In</b>	<b>Sn</b>	<b>Sb</b>	<b>Te</b>	<b>I</b>	<b>Xe</b>	
Cs	Ba	*	Lu	Hf	Ta	W	Re	Os	Ir	Pt	<b>Au</b>	Hg	Tl	Pb	Bi	Po	At	Rn
Fr	Ra	**	Lr	Rf	Db	Sg	Bh	Hs	Mt	Ds	Rg	Uub	Uut	Uuq	Uup	Uuh		
* lantanídeos			La	Ce	Pr	Nd	Pm	Sm	Eu	Gd	Tb	Dy	Ho	Er	Tm	Yb		
** actínídeos			Ac	Th	Pa	U	Np	Pu	Am	Cm	Bk	Cf	Es	Fm	Md	No		

Fonte: Tutorial do software *Material Studio 5.5* da *Accelrys*.

---

**REFERÊNCIAS**

- ASMADI, A.; NEUMANN, M. A.; KENDRICK, J.; GIRARD, P.; PERRIN, M. A.; LEUSEN, F. J. J. Revisiting the Blind Tests in Crystal Structure Prediction: Accurate Energy Ranking of Molecular Crystals. **J. Phys. Chem. B**, vol. 113, p. 16303-16313, 2009.
- BECKE, A. D. Density functional calculations of molecular bond energies. **J. Chem. Phys.**, vol. 84, p. 4524-4529, 1986.
- BECKE, A. D. A new mixing of Hartree-fock and local density functional theories. **J. Chem. Phys.**, vol. 98, p. 1372-1377, 1993.
- COOLIDGE, A. S.; JAMES, H. M. The Approximations Involved in Calculations of Atomic Interaction and Activation Energies. **J. Chem. Phys.**, vol. 2, p. 811-817, 1934.
- DAY, G. M. *et al.* Significant progress in predicting the crystal structures of small organic molecules - a report on the fourth blind test. **Acta Cryst. B**, vol. 65, p. 107-125, 2009.
- DELLEY, B. An all-electron numerical method for solving the local density functional for polyatomic molecules. **J. Chem. Phys.**, vol. 92, p. 508-517, 1990.
- DRUDE, P. Zur electronen theorie der matalle. **Annalen der Physik**, vol. 37, p. 566-613, 1989.
- EYRING, H.; POLANYI, M. Z. **Z. Phys. Chem. B**, vol. 12, p. 279, 1931.
- FILIPPI, C.; UMRIGAR, C. J.; TAUT, M. Comparison of exact and approximate density functionals for an exactly soluble model. **J. Chem. Phys.**, vol. 100, p. 1290-1296, 1994.
- GRIMME, S. Semiempirical GGA-Type Density Functional Constructed with a Long-Range Dispersion Correction. **J. Comput. Chem.**, vol. 27, p. 1787-1799, 2006.
- HIRSCHFELDER, J. O. Semi-Empirical Calculations of Activation Energies. **J. Chem. Phys.**, vol. 9, p. 645-653, 1941.
- HOHENBERG, P.; KOHN, W. "Inhomogeneous electron gas". **Physical Review B**, vol. 136, p. 864-872, 1964.
- JAMES, H. M.; COOLIDGE, A. S. The Ground State of the Hydrogen Molecule. **J. Chem. Phys.**, vol. 1, p. 825-835, 1933.
- JURECKA, P.; CERNY, J.; HOBZA, P.; SALAHUB, D. R. Density Functional Theory Augmented with an Empirical Dispersion Term. Interaction Energies and Geometries of 80 Noncovalent Complexes Compared with *Ab Initio* Quantum Mechanics Calculations. **J. Comput. Chem.**, vol. 28, p. 555-569, 2007.
- KOHN, W.; SHAM, L. Self-consistent equations including exchange and correlation effects. **Physical Review B**, vol. 140, p. 1133-1138, 1965.
- LASCHUK, E. F. **Novo Formalismo Semi-Empírico para Cálculos Químico-Quânticos**. 2005. 143 f. Tese (Doutorado em Química), Programa de Pós-graduação em Química, Universidade Federal do Rio grande do Sul, Porto Alegre, 2005.
- LEE, C. T.; YANG, W. T.; PARR, R. G. Development of the collesalvetti correlation-energy formula into a functional of the electron-density. **Phys. Rev. B**, vol. 37, p. 785-789, 1988.
- MCNELLIS, E. R.; MEYER, J.; REUTER, K. Azobenzene at Coinage Metal Surfaces: Role of Dispersive Van Der Waals Interactions. **Phys. Rev. B**, vol. 80, p. 205414(1-10), 2009.
- NAKAJIMA, S.; OHNO, K.; INOUE, Y.; SAKURAI, M. Quantum Chemical Study of the pKa Control Mechanism for the Active Center in Bacteriorhodopsin and Its M Intermediate. **J. Phys. Chem. B**, vol. 107, p. 2867-2874, 2003.

NIKITINA, E.; SULIMOV, V.; ZYETS, V.; ZAITSEVA, N. Semiempirical Calculations of Binding Enthalpy for Protein–Ligand Complexes **Int. J. Quant. Chem.**, vol. 97, p. 747-763, 2004.

ORTMANN, F.; BECHSTEDT, F.; SCHMIDT, W. G. Semiempirical van der Waals correction to the density functional description of solids and molecular structures. **Phys. Rev. B**, vol. 73, p. 205101(1-10), 2006.

PERDEW, J. P. Density-functional approximation for the correlation-energy of the inhomogeneous electron-gas. **Phys. Rev. B**, vol. 33, p. 8822-8824, 1986.

PERDEW, J. P. et al. Atoms, molecules, solids, and surfaces: Applications of the generalized gradient approximation for exchange and correlation. **Phys. Rev. B**, vol. 46, p. 6671-6687, 1992.

PERDEW, J. P.; BURKE, K.; ERNZERHOF, M. Generalized gradient approximation made simple. **Phys. Rev. Lett.**, vol. 77, p. 3865-3868, 1996.

PERDEW, J. P.; BURKE, K.; ERNZERHOF, M. Generalized gradient approximation made simple. **Phys. Rev. Lett.**, vol. 78, p. 1396-1396, 1997.

TKATCHENKO, A.; SCHEFFLER, M. Accurate Molecular Van Der Waals Interactions from Ground-State Electron Density and Free-Atom Reference Data. **Phys. Rev. Lett.**, vol. 102, p. 073005(1-4), 2009.

TITMUSS, S. S.; CUMMINS, P. L.; RENDELL, A. P.; BLIZNYUK, A. A.; GREASY, J. E. Comparison of Linear-Scaling Semiempirical Methods and Combined Quantum Mechanical/Molecular Mechanical Methods for Enzymic Reactions. II. An Energy Decomposition Analysis. **J. Comput. Chem.**, vol. 23, p. 1314-1322, 2002.

# APÊNDICE C

**Resumos em Congressos  
e Artigos Publicados**

---





Sociedade Brasileira de Química (SBQ)

## Ligados nos neurotransmissores: bioquímica quântica do mecanismo de ativação e antagonismo de neuroreceptores tipo glutamato iGluR2

Ana Caroline V. Martins<sup>1</sup> (PG) \*, Pedro de Lima Neto<sup>1</sup> (PQ), Ito L. Barroso Neto<sup>2</sup> (PG), Benildo S. Cavada<sup>2</sup> (PQ), Carmem Gottfried<sup>3</sup> (PQ), Valder N. Freire<sup>4</sup> (PQ). carolinevmartins@gmail.com

<sup>1</sup> Departamento de Química Analítica e Físico-Química, UFC, Campus do Pici, Bloco 940, 60455-960 Fortaleza, CE

<sup>2</sup> Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, UFC, Campus do Pici, 6041-970 Fortaleza, CE

<sup>3</sup> Departamento de Bioquímica, ICBS, UFRGS, Ramiro Barcelos, 2600, 90035-003 Porto Alegre, RS

<sup>4</sup> Departamento de Física, UFC, Campus do Pici, Bloco 922, 60455-960 Fortaleza, CE

Palavras Chave: GluR2, glutamato, AMPA, bioquímica quântica.

### Introdução

A transmissão de impulsos nervosos é feita através das sinapses, envolvendo neurotransmissores e neuroreceptores. Os neuroreceptores glutamatérgicos (iGluRs) são importantes canais iônicos do sistema nervoso central. São encontrados em sinapses de excitação rápida e estão relacionados a funções cerebrais importantes como aprendizagem e memória. Os agonistas totais glutamato e AMPA, o agonista parcial kainato, e o antagonista DNQX foram co-cristalizados com o neuroreceptor iGluR2, tendo suas estruturas resolvidas com resolução de 1,9, 1,7, 1,6 e 1,9 Å, respectivamente<sup>1</sup>. Estes dados permitiram que um estudo dos sítios de ligação destes neurotransmissores no iGluR2 fosse realizado no escopo da bioquímica quântica, cujos resultados são apresentados neste trabalho. Cálculos bioquímico quânticos foram realizados dentro da abordagem da teoria da funcional da densidade e com o esquema de fracionamento molecular com capas conjugadas para obtenção de uma descrição detalhada da energia total e de interação entre os resíduos no sítio de ligação do iGluR2, caracterizado pela distância de 5,5 Å, que envolve os neurotransmissores em foco.

### Resultados e Discussão

Os sítios de ligação dos neurotransmissores e os principais resíduos envolvidos na ligação dos mesmos ao iGluR2 são apresentados na Figura 1.

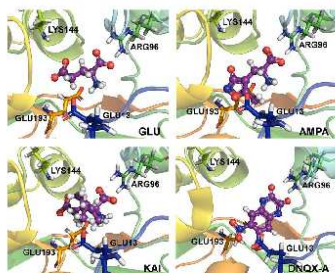


Figura 1. Sítios de ligação do glutamato, AMPA, kainato e DNQX no iGluR2.

34<sup>a</sup> Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química

O gráfico BIRD da energia de interação dos principais resíduos atrativos (Lys144, Arg92) e repulsivos (Glu193, Glu13) é apresentado na Figura 2.

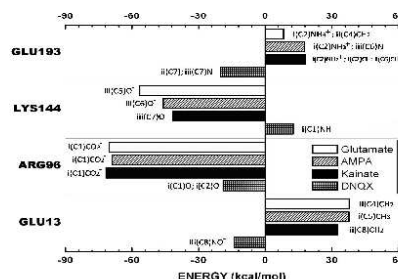


Figura 2. Energia de interação dos principais resíduos com glutamato, AMPA, kainato e DNQX.

A energia total da ligação os neurotransmissores ao sítio de ligação no iGluR2 é apresentado na Figura 3, a qual consegue explicar as respostas eletrofisiológicas semelhantes dos agonistas totais glutamato e AMPA, a parcialidade do agonista kainato, e a mais fraca resposta do antagonista DNQX.

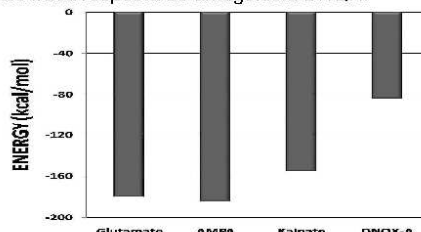


Figura 3. Energia total do glutamato, AMPA, kainato e DNQX no sítio de ligação do iGluR2.

### Conclusões

Foi realizada a primeira descrição baseada na bioquímica quântica do mecanismo de ativação e antagonismo dos neurotransmissores glutamato, AMPA, kainato e DNQX no neuroreceptor iGluR2.

### Agradecimentos e Referências

CAPES, CNPq, FUNCAP e FINEP

<sup>1</sup> Armstrong, N.; Gouaux, E., *Neuron* **2000**, 28, 165.



XVI Simpósio Brasileiro de Química Teórica – SBQT 2011  
Ouro Preto – MG, 20-23 Novembro de 2011  
30 Anos SBQT

### An improved quantum biochemistry description of the glutamate, AMPA, kainate, and DNQX GluR2 binding pocket domain

Ana Caroline V. Martins<sup>1</sup> (PG), Pedro de Lima Neto<sup>1</sup> (PQ), Ito L. Barroso Neto<sup>2</sup> (PG), Benildo S. Cavada<sup>2</sup> (PQ), Carmem Gottfried<sup>3</sup> (PQ), Valder N. Freire<sup>4</sup> (PQ).

<sup>1</sup>Departamento de Química Analítica e Físico-Química, UFC, Campus do Pici, Bloco 940, 60455-960 Fortaleza, CE

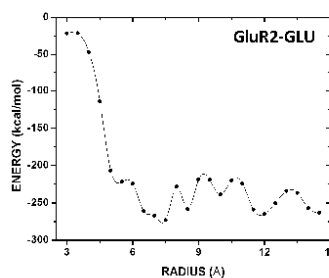
<sup>2</sup>Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, UFC, Campus do Pici, 6041-970 Fortaleza, CE

<sup>3</sup>Departamento de Bioquímica, ICBS, UFRGS, Ramiro Barcelos, 2600, 90035-003 Porto Alegre, RS

<sup>4</sup>Departamento de Física, UFC, Campus do Pici, Bloco 922, 60455-960 Fortaleza, CE

**Key-words:** GluR2 receptor, glutamate, AMPA, quantum biochemistry

At synapses throughout the brain and spinal cord, the amino-acid glutamate is the major excitatory neurotransmitter. The glutamate-receptor ion channels (iGluRs), namely AMPA, kainate and NMDA receptors, are the major mediators of excitatory synaptic transmission in the central nervous system<sup>1</sup>. Crystal structures of the GluR2 ligand binding core (S1S2) have been determined in the Apo state and in the presence of the antagonist DNQX, the partial agonist kainate, and the full agonists AMPA and glutamate<sup>2</sup>. We take full advantage of this published crystallographic data to perform in this work density functional theory based computer simulations of the glutamate, AMPA, kainate, and DNQX binding energetic to GluR2. The radius of the binding pocket is changed, going beyond of what is generally accepted as the crystallographic binding pocket (cbp) radius. The quantum biochemistry calculations are performed within the framework of the molecular fractionation with conjugate caps (MFCC) strategy<sup>3</sup>, using, both, the local density and generalized gradient approximations, LDA and GGA. Stability of the total binding energy is achieved only for radius larger than 8 Å, with a well characterized irregular oscillatory behavior related mainly to the contribution of charged residues. Arg485 and Lys730 (Glu402 and Glu657) are demonstrated to be the most important attracting (repelling) residues in the cbp radius, the binding strength of the formers being higher than that of the latters. Lys449 and Arg660 contribute significantly to the ligands total binding energy beyond the cbp radius. The estimated ligand-GluR2 total binding energy AMPA > glutamate > kainate > DNQX is in agreement with electrophysiological opening of the glutamate and AMPA ionic channels, the kainate partial agonist and the weak GluR2-GLU DNQX antagonism. To the knowledge of the authors, this is the first quantum biochemistry description of the working behavior of the glutamate-receptor ion channel iGluR2, which is one of the major mediators of excitatory synaptic transmission in the central nervous system.



<sup>1</sup> M. L. Mayer, Nature **440**, 456 (2006).

<sup>2</sup> N. Armstrong, E. Gouaux, Neuron **28**, 165 (2000).

<sup>3</sup> D. W. Zhang, J. H. Zhang, J. Chem. Phys. **119**, 3599 (2003).

Support: CAPES, CNPq-INCT (Proc. 573925/2008-9).

**Agonism and antagonism of the glutamatergic receptor iGluR2**

Martins, A.C.V. (1\*); Lima-Neto, P. (1); Freire, V. N. (3)

<sup>1</sup> Departamento de Química Analítica e Físico-Química, Universidade Federal do Ceará, Campus do Pici, 60455-960 Fortaleza, Ceará<sup>2</sup> Departamento de Física, Universidade Federal do Ceará, Caixa Postal 6030, 60455-760 Fortaleza, Ceará  
Email: carolinevmartins@gmail.com

Keywords: glutamatergic receptor, agonism, antagonism, quantum biochemistry

**Introduction**

The ionotropic glutamate receptors iGluRs are important ionic channels of the central nervous system, founded in rapid excitation synapses, and related to important cerebral functions like learning and memory. Besides, iGluRs are also associated with important neurological and psychiatric diseases like Alzheimer, Parkinson, epilepsy, cerebral ischemia, amyotrophic lateral sclerosis, and schizophrenia. The full agonist glutamate ( $C_5H_9NO_4$ ) and AMPA ( $C_7H_{10}N_2O_4$ ), the partial agonist kainate ( $C_{10}H_{15}NO_4$ ) and the antagonist DNQX ( $C_8H_2N_4O_6$ ) was co-crystallized with the iGluR2 receptor<sup>(1)</sup>. In this work, we take advantage of these published data in the literature to initialize LDA and GGA-DFT quantum calculations of the interaction between these four iGluR2 ligands with the amino acid residues in the common binding pocket.

**Results and Discussion**

The ligand-iGluR2 total energy interaction is a function of the distance between the ligand centroid and the residues, which allows its correlation with the activation strength and antagonism.

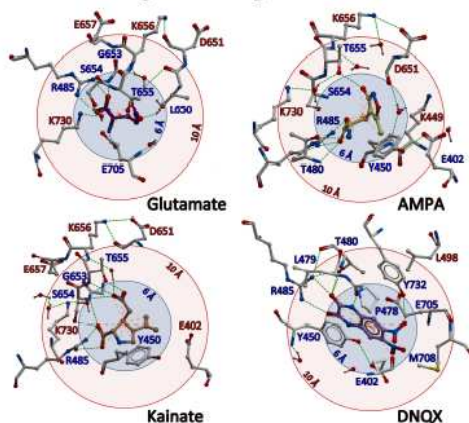


Figure 1. The iGluR2 agonists AMPA and glutamate, the partial agonist kainate, and the antagonist DNQX in the iGluR2 binding pocket.

6th Brazilian Symposium on Medicinal Chemistry – BrazMedChem2012

The order AMPA > glutamate > kainate > DNQX follows only when a large enough binding pocket radius is taken into account, explaining: (i) experimental data published on the activation and antagonism of the glutamatergic receptor GluR2; (ii) that the next-closed residues can be important to determine the receptor functioning.

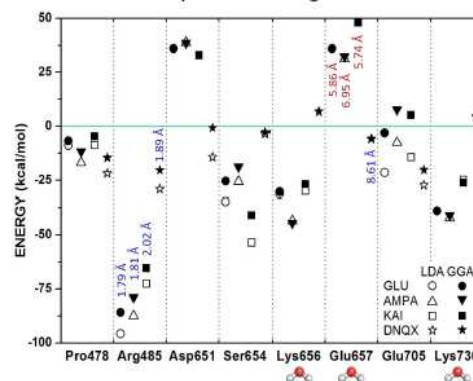


Figure 2. The LDA- and GGA-DFT calculated interaction energy of the most important iGluR2 residues interacting with the agonists AMPA and glutamate, the partial agonist kainate, and the antagonist DNQX.

**Conclusions**

The agonism and antagonism of iGluR2 was described by quantum biochemistry DFT calculations. Among the perspectives, one can highlight the possibility to develop glutamatergic agonists with specificities envisaged to decrease their side effects in the treatment of maladies related with the glutamatergic neurotransmission.

**Acknowledgements**

P.L.N. and V.N.F. are senior researchers of the Brazilian National Research Council (CNPq). They would like to acknowledge the financial support received during the development of this work.

<sup>1</sup> Armstrong, N.; Gouaux, E.; *Neuron*. 28, 165-181, 2000.



**Explaining *ab initio* the activation and antagonism strenght  
of an AMPA-sensitive glutamate receptor**

Ana Caroline V. Martins, Pedro de Lima-Neto<sup>†</sup>, Ito Liberato Neto<sup>§</sup>, Benildo S. Cavada<sup>§</sup>,  
Valder N. Freire<sup>‡</sup>, and Ewerton W. S. Caetano<sup>‡</sup>

*Departamento de Química Analítica e Físico-Química, Centro de Ciências, Universidade Federal do Ceará,  
60455-760 Fortaleza, Ceará, Brazil*

RECEIVED DATE (automatically inserted by publisher); E-mail: plimaneto@gmail.com

**Abstract:** Taking full advantage of the X-ray data of the ionotropic glutamate receptor GluR2 co-crystallized with the full agonists AMPA and glutamate, the partial agonist kainate, and the antagonist DNQX, we report the first quantum biochemistry calculations focusing their binding pockets. The attraction/repulsion balance between the main interacting residues is quantified, and the total binding energy strength calculated within the density functional theory (DFT) approach follows the order AMPA > glutamate > kainate > DNQX, which explains published experimental data on the activation and antagonism strength of iGluR2.

Glutamatergic receptors (iGluRs) are an important group of ion channels of the central nervous system (CNS). They are found in fast excitatory synapses and are related to important functions like learning and memory [1]. Studies propose that the iGluRs overstimulation can be, possibly, related to injury to neurons and, as a consequence, be connected with CNS diseases range from stroke, epilepsy and trauma to dementia, Parkinson's and Huntington's diseases and amyotrophic lateral sclerosis among other illnesses [2]. iGluRs are classified according the responses to these three amino acids: N-methyl-D-aspartic acid (NMDA), (RS)-2-amino-3-(3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolyl)propionic acid (AMPA) and kainic acid (Kainate). Each receptor is formed by four subunits non necessary equal [3,4]. Excellent reviews about the iGluRs can be found elsewhere [2-5]

The iGluR2, a subunit of AMPA receptor, among other subunits, has been the focus of several studies since X-ray crystallographic dates to molecular dynamics [6-9]. Studies have already been performed using quantum molecular dynamics, but no similar study to what we do, allowing defining the importance of each residue to the binding protein interaction and defining the total interaction energy by DFT quantum calculation [10-13] are reported in the literature. *Ab initio* calculations can give us information at the molecular level about the chemical interactions between iGluRs and the aminoacid residues in the binding pocket.

Using the scheme of molecular fraction with conjugative caps (MFCC) according the authors [14], taking full advantages of x-ray data deposited in Protein Data Bank (PDB) [15] and using

computational *ab initio* molecular modeling it was possible to calculate and to compare the binding energy of the iGluR2 with different ligands in the binding pocket. Four PDBs are used, each one of the GluR2 binding a different ligand. Two of the binders (glutamate and AMPA) are full agonists, which cause the complete opening of the ionic channel; one is partial agonist (Kainate) that causes a partial opening and the last is an antagonist (DNQX chain A) that inhibits the channel aperture. It is difficult to crystallize the transmembrane part of the protein and the interest is on the ligand binding domain, so according Eric Gouaux et al.[16] the transmembrane and the amino terminal domain were removed.

In the domain GluR2 S1S2, radius of 6 and 10 Å and its caps were selected, ensuring that the binding sites containing 89 amino acids (residues) for glutamate, 88 residues for AMPA and 81 for Kainate and DNQX. After the selection, they were hydrogenated. Fixing all the others atoms, the geometry of the hydrogen atoms was optimized with the FORCIT of the Material Studio package adopting the universal force field (UFF) and also the CVFF force field.

In this study, the energies being calculated afterwards using the DMOL3 DFT code. The exchange-correlation functional within the Local Density Approximation (LDA) was chosen using the PWC [D] parameterization. The DNP numerical basis set was adopted to expand the Kohn-Sham orbitals, and the following parameters were used to perform the self-consistent field (SCF) calculations: core treatment: DFT All Electron, SCF convergence threshold:  $10^{-6}$ , orbital cutoff: 3.7 Å.

Since there is not a simple relationship between the interaction energy and the studied molecules-amino acid residues distance, and that the MFCC method allows to calculate the interaction energy between a given residue and closer atom of each studied molecule at the quantum level, it was assumed that the binding pocket sphere (BPS) with radius  $r$  (see Figure 1) is a imaginary sphere centered in the ligand centroid, while a binding pocket of radius  $r$  (BP( $r$ )) was defined as the set of amino acid residues with at least one atom inside the corresponding BPS.

Figure 1 shows the most relevant amino acid residues in each binding pocket of the iGluRs at the radius of 6 Å and 10 Å with each studied molecules.

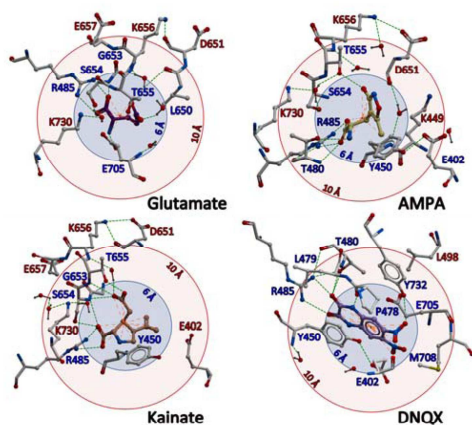


Figure 1. iGluR2 S1S2 monomers with the agonists AMPA and glutamate, the partial agonist kainite, and the antagonist DNQX-A in their binding pockets. The most important residues bonded with these molecules are shown.

In Figure 2, are shown the three most important residues in the attractive interaction of GluR2 with each ligand and some of the most repulsive amino acid residues of agonists. The DNQX is not repelled, in a relevant way, for any residue. In figure 2 are also listed aminoacid residues that present interaction with the ligand mediated by water molecule (residues Lys656 and Lys730) and water that has attached, but not intermediate interaction with the ligand Glu657. It should be noted that the water attached to Lys656 was considered by Vijayan et al. [13] as structurally important for the system.

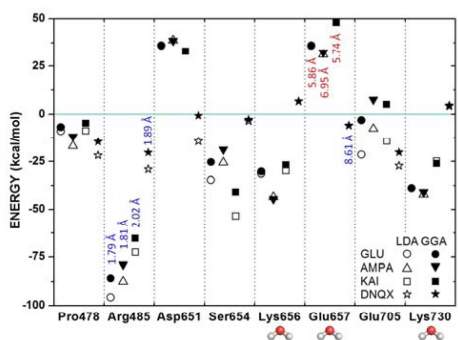


Figure 2. asdls hasdasdh afdkhsd.

In addition, it can be observed in Figure 2 that the higher energy interaction is presented by Arg485. On the other hand, Armstrong and Gouaux [7,8] showed that the most relevant amino acid residue is the E705 and that the energies of interaction obtained for the residue with agonists, are relatively low.

This result suggests that its importance for the binding site is not related to direct interaction with the ligand, confirming the results of the study and Speranskiy Kurnikova [11] in which, although removing the negative charge of E705, there was great change in interaction energy of the protein with the ligand. In addition, the E705 residues proves to be as relevant as the Arg485 in the interaction of protein with the antagonist DNQX, revealing a large difference in the way of interaction of ligands with respect to others.

In previous studies other residues were also highlighted as important in the site of interaction among them is presented in Figure 2 only Ser654 and Pro478. Among these, only Ser654 proved to be truly relevant in the interaction with the three agonists, with no great importance in the interaction with DNQX. On the other hand, Pro478 is relevant only to the interaction with the antagonist.

Figure 3 shows the total energy of interaction of protein with the ligands present in the rays of 6 Å and 10 Å.

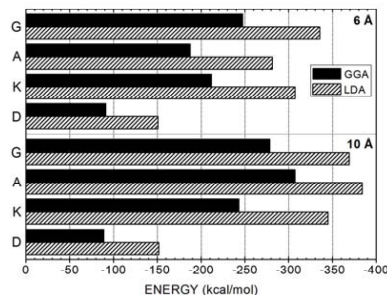


Figure 3. asdls hasdasdh afdkhsd

Another interesting fact is noted that residues of the ligand at a distance greater than 5 Å interact more strongly with the ligand residues closer. Table 1 is the radius at which each residue belongs (the radius was considered as the distance from the centroid of the ligand to the residue) and the distance of each ligand to the residue, considering the closest atoms.

Tabela 1

RESIDUE	d[r] <sub>GLU</sub> (Å)	d[r] <sub>AMPA</sub> (Å)	d[r] <sub>KAI</sub> (Å)	d[r] <sub>DNQX</sub> (Å)
E705	3.5 [1.70]		4.5 [2.26]	3.5 [2.74]
S654	3.0 [1.86]	3.0 [3.04]	4.5 [1.64]	7.5 [4,71]
P478	4.5 [1.91]		5.0 [2.13]	4.5 [1.74]
R485	5.0 [1.79]		5.5 [2.02]	6.0 [1.98]
K730	6.5 [5.24]		8.0 [5.31]	7.0 [6.42]
K656	6.5 [3.89]		7.5 [3.88]	11.0 [8.21]
E657	8.0 [5.86]		9.0 [5.74]	12.5 [8.61]
D651	9.0 [6.87]		9.5 [7.00]	12.5 [9.54]

## Acknowledgments

The authors wish to thank the following Brazilian agencies, CNPq and CAPES, to support this work.

## References

- [1]. Dean R. Madden. The structure and function of glutamate receptor ion channels. *Nature Reviews*, 91-101, 2002.
- [2]. Raymond Dingleline, Karin Borges, Derek Bowie and Stephen F. Traynelis. The Glutamate Receptors Ion Channels. *Pharmacological Reviews*, 7-, 1999.
- [3]. Willem Tichelaar, Markus Safferling, Kari Keinänen, Holger Stark and Dean R. Madden. The Three-dimensional Structure of an Ionotropic Glutamate Receptor Reveals a Dimer-of-Dimers Assembly. *J. Mol. Biol.* 435-442, 2004.
- [4]. Christian Rosenmund, Yael Stern-Bach, Charles F. Stevens. The tetrameric Structure of a Glutamate Receptor Channel. *Science* 280, 1596-1599, 1998.
- [5]. Traynelis, S. F.; Wollmuth, L. P.; McBain, C. J.; Menniti, F. S.; Vance, K. M.; Ogden, K. K.; Hansen, K. B.; Yuan, H.; Myers, S. J.; Dingleline, R.; Glutamate Receptor Ion Channels: Structure, Regulation, and Function, in: *Pharmacol. Rev.* 62, 405-496, 2010.
- [6]. Hans Bräuner-Osborne, Jan Egebjerg, Elsebet Ø. Nielsen, Ulf Madsen, and Povl Krosgaard-Larsen. Ligands for Glutamate Receptors: Design and Therapeutic Prospects. *Jour. Med. Chem.* 43, 2609-2645, 2000.
- [7]. Armstrong, N.;Gouaux, E.; Mechanism for Activation and Antagonism of a AMPA-Sensitive Glutamate Receptor: Crystal Structures of the GluR2 Ligand Binding Core, *Neuron*. 28, 165-181, 2000.
- [8]. Sobolevsky, A. I.; Rosconi, M. P.; Gouaux, E.; X-ray Structure, Symmetry and mechanism of an AMPA-Subtype Glutamate Receptor, *Nature* 462, 745-758, 2009.
- [9]. Arinaminpathy, Y.; Sansom, M. S. P.; Biggin, P. C.; Molecular Dynamics Simulations of the Ligand-Binding Domain of the Ionotropic Glutamate Receptor GluR2, *Biophys. J.* 82, 678-683, 2002.
- [10]. Speranskiy, K.; Kurnikova, M.; On the Binding Determinants of the Glutamate Agonist with the Glutamate Receptor Ligand Binding Domain, *Biochemistry* 44, 11508-11517, 2005.
- [11]. Mamonova, T.; Speranskiy, K.; Kurnikova, M. Interplay between structural rigidity and electrostatic interactions in the ligand binding domain of GluR2, *Proteins. Struct., Funct., Bioinf.* 73, 659-671, 2008.
- [12]. Vijayan, R.; Sahai, M. A.; Czajkowski, T.; Biggin, P. C.; A Comparative Analysis of the Role of Water in the Binding Pockets of Ionotropic Glutamate Receptors, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 12, 14057-14066, 2010.
- [13]. Zhang, D. W.; Zhang, J. Z. H.; Molecular fractionation with conjugate caps for full quantum mechanical calculation of protein-molecule interaction energy, *J. Chem. Phys.* 119, 3599-3605, 2003.
- [14]. incluir a referência dos PDBs
- [15]. inserir a referência do Eric et al.
- [16]. Perdew, J. P.; Wang, Y. Accurate and simple analytic representation of the electron-gas correlation energy. *Phys. Rev. B*, 45, 13244-13274, 1992.



