

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE FÍSICA

Estudo da Dinâmica de Íons em Canais Iônicos*

Franco Valduga de Almeida Camargo

Dissertação realizada sob a orientação do Professor Dr. Yan Levin e apresentada ao Instituto de Física da UFRGS, em preenchimento parcial dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Física.

Porto Alegre, agosto de 2012.

* Trabalho financiado pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

Agradecimentos

Ao Prof. Dr. Yan Levin pela orientação, apoio e compreensão durante o curso deste trabalho.

Ao meu irmão Vinícius, pelo auxílio com os *scripts*, pelas dicas valiosas sobre detalhes computacionais e pela amizade de sempre.

Aos meus pais Elisabete e Umberto pelo constante apoio e incentivo que sempre me forneceram.

À Juliana Paukowski, pelo auxílio com os problemas com o *cluster* e demais detalhes computacionais.

Aos meus amigos, em especial aqueles que estiveram envolvidos nesse trabalho, de uma forma ou outra: Guilherme Cañete Vebber, Rodrigo Link Federizzi, Kelen Trentin, Magnus Kaldieff Pereira, Patrícia Loren, Alex Soares Duarte, Roberto Reis, Rafael Reis, Ricardo Wickert e Emmanuel Gräve de Oliveira.

Ao Instituto de Física e à Universidade Federal do Rio Grande do Sul pelo suporte e pela oportunidade.

Resumo

Canais iônicos são nanoporos aquosos formados por proteínas imersas na membrana celular. Sua função biológica básica é permitir o transporte de íons no sentido de seu gradiente eletroquímico. Dada a enorme quantidade de processos biológicos relacionados ao movimento iônico, a importância dos canais iônicos em biologia e medicina dificilmente pode ser exagerada. Neste trabalho, apresentamos uma introdução à vasta área do conhecimento de canais iônicos, discutimos suas perspectivas em pesquisa básica e aplicada e, em especial, a importância do estudo computacional da permeação iônica por canais. Seguimos analisando o estado da arte em relação a modelos computacionais de canais iônicos e discutindo criticamente as vantagens e desvantagens das abordagens existentes, fazendo considerações sobre suas perspectivas. Concluindo que a técnica de Dinâmica Browniana apresenta potencial para o estudo de propriedades básicas da condução iônica por nanoporos, propomos um modelo simples de canal iônico unidimensional através desta técnica para uma geometria que permite solução analítica da equação de Poisson, a qual é apresentada. A simplicidade do modelo proposto lhe confere grande eficiência computacional, a qual é ampliada com a proposta de um critério de “tempo de injeção” dos íons no canal, cuja expressão é demonstrada e que poupa o simulador de considerar explicitamente dois reservatórios eletrolíticos junto ao canal. O simulador desenvolvido baseado neste modelo é estudado e comparado com a literatura, mostrando bons resultados em sua região esperada de validade. Dado o estágio atual do estudo computacional de canais iônicos, é importante dispormos de modelos conceitualmente simples e computacionalmente eficientes. A sua existência possibilita, por exemplo, estudos de Dinâmica Molecular muito eficientes considerando a água explicitamente, algo importante para a análise de novos modelos da água adequados a nanoporos.

Abstract

Ion channels are nanopores formed through the cell membrane by proteins. Their basic biological function is allowing ionic transport down the electrochemical gradient. Given the huge amount of biological processes that are related to ionic fluxes, the biological and medical importance of ion channels hardly can be overstated. In this work we present a brief introduction to the vast field of ion channels and discuss its perspectives in basic and applied research, emphasizing the importance of computational approaches to study ion permeation through channels. Next, we analyze the state of the art regarding computational models of ion channels, critically discussing the advantages and disadvantages of the current approaches and considering the perspectives of each. We conclude that the Brownian Dynamics approach has potential to be used to study ionic conductance through nanopores and we propose a simple Brownian Dynamics unidimensional channel model for a geometry that allows analytical solution of the Poisson equation, which is presented. The simplicity of the proposed model grants it great computational efficiency, which is further amplified with the proposal of an “injection time” criterion to allow ions to enter the channel. The formula for the “injection time” is demonstrated and its implementation lifts the requirement to simulate two *reservoirs* next to the channel. The simulator developed based on this model is studied and its results are compared with the literature, showing good agreement in its expected region of validity. Given the current state of computational study of ion channels, it is important to have simple and efficient models, such as ours, available. For instance, their existence allows the realization of very fast Molecular Dynamics studies that consider water explicitly, something very important for the analysis of new explicitly polarizable water models that are required for nanopores.

Sumário

1. Canais Iônicos	1
1.1 Introdução	1
1.2 Estudo de canais iônicos	7
1.3 Importância biomédica	9
2. Modelos de Permeação	12
2.1 Introdução	12
2.2 Teoria de Taxa de Reação	12
2.3 Poisson-Nernst-Planck	13
2.4 Dinâmica Browniana	15
2.5 Dinâmica Molecular Clássica	23
2.6 Dinâmica Molecular <i>ab Initio</i>	26
2.7 Eletrostática em canais	28
3. Simulações	36
3.1 Introdução	36
3.2 Tempo de Injeção	36
3.3 Testes da simulação	38
3.4 Canal permeável a íons de \mathbf{K}^+	39
3.5 Canal neutro permeável a íons de \mathbf{Na}^+ e \mathbf{Cl}^-	44
3.6 Canal carregado permeável a íons de \mathbf{Na}^+ e \mathbf{Cl}^-	51
4. Conclusão	59
A. Algoritmo de terceira ordem para a equação de Langevin	61

Referências 65

Capítulo 1

Canais Iônicos

1.1 Introdução

Canais iônicos são poros macromoleculares subnanométricos presentes nas membranas celulares. Sua função biológica de maior relevância é permitir a excitação de células excitáveis. Pode-se dizer que canais iônicos possuem a mesma relação com sinais elétricos em nervos, músculos e sinapses que enzimas possuem com o metabolismo (ainda que a diversidade de canais seja menor que a de enzimas). São os vários tipos diferentes de canais, abrindo e fechando em concerto, que moldam os sinais e respostas do sistema nervoso. No entanto, canais iônicos não são um privilégio somente das formas de vida mais evoluídas: são eles que dizem ao *Paramecium* que nade para trás após uma colisão, e são eles que propagam o fechamento das folhas da planta *Mimosa*.

Desde que as formas mais primitivas de vida desenvolveram uma membrana celular lipídica, criou-se a necessidade de algum mecanismo que permitisse à célula o acesso a substâncias ionizadas, bem como o descarte de subprodutos ionizados. Uma possibilidade de solução seria a presença de poros membranares pequenos o bastante para reter macromoléculas, mas grandes o bastante para permitir a passagem de íons. De fato, as membranas externas da mitocôndria e das bactérias Gram-negativas apresentam tais poros. Os organismos contemporâneos mais evoluídos, no entanto, utilizam um *design* muito mais elaborado, com mecanismos de transporte seletivos, cada qual cumprindo uma função e controlado por mecanismos fisiológicos distintos.

O transporte celular pode ocorrer de duas formas diferentes, segundo o mecanismo de transporte. Um deles corresponde aos canais iônicos, caracterizados por uma proteína

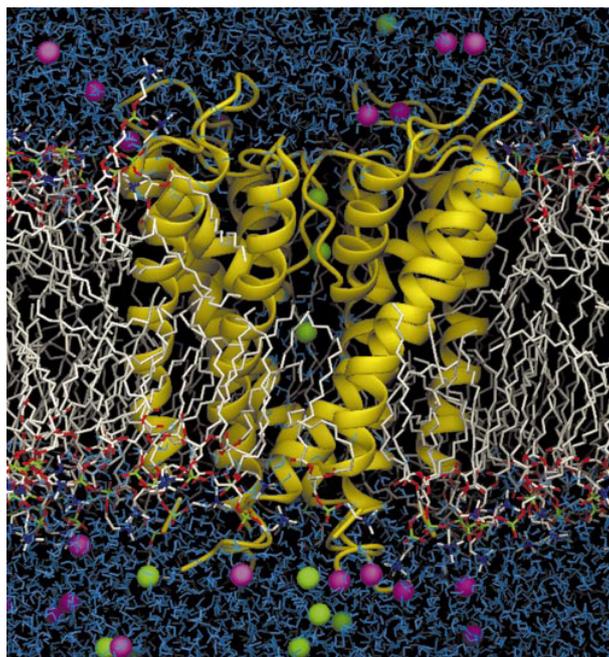


Fig. 1.1: *Representação molecular do modelo atômico do canal bacteriano KcsA de K^+ imerso em uma membrana fosfolipídica, banhada em ambos os lados por uma solução aquosa de 150 mM de KCl. A partir de [7].*

formadora de um poro com um caminho aquoso contínuo através da membrana. Nesse caso, o transporte segue o gradiente eletroquímico dos íons para os quais o canal é permeável. O outro corresponde a proteínas carregadoras, nome originado no século XX, quando o conhecimento sobre transporte transmembranar era baseado principalmente em medidas de fluxo. O transporte por proteínas carregadoras pode ser ativo (movido a ATP) ou passivo, enquanto o transporte por canais é sempre passivo. Proteínas carregadoras são maiores que as proteínas formadoras de canais, e seu mecanismo é mais complexo e lento, visto que elas precisam realizar trabalho sobre os íons para estabelecer os gradientes eletroquímicos necessários à célula. Exemplos desse mecanismo são a bomba de sódio-potássio e a bomba de cálcio. Ao contrário dos canais iônicos, a estrutura de transporte através de proteínas carregadoras ainda não está totalmente estabelecida [5].

Enquanto as proteínas carregadoras são responsáveis pelo estabelecimento dos gradientes eletroquímicos necessários, o processo de excitação celular e propagação de sinais elétricos no sistema nervoso são resultado do movimento de íons por canais iônicos. Praticamente todos os fenômenos decorrem da permeação de quatro tipos de íons: Na^+ , K^+ ,

Ca^{2+} e Cl^- .

Os canais podem ser pensados como moléculas excitáveis, dado que encontram-se abertos ou fechados, sendo que são abertos em resposta a algum estímulo. Quando abertos, apresentam a propriedade de permeabilidade seletiva, permitindo que íons de uma (ou mais) espécie flua por eles a altíssimas taxas ($> 10^6$ íons por segundo), enquanto eles se mantêm fortemente impermeáveis às demais espécies iônicas. O processo de abertura dos canais, chamado de chaveamento (*gating*, do inglês) varia conforme o tipo de canal. Há canais ativados por tensão elétrica, por neurotransmissores ou outros estímulos químicos e por estímulos mecânicos.

Um exemplo destes conceitos pode ser dado com o funcionamento de canais chaveados por neurotransmissores em fibras musculares de organismos evoluídos. Na junção neuromuscular, o axônio do nervo instrui a fibra muscular sobre quando se contrair. Os chamados potenciais de ação, mensagens elétricas na forma de potencial membranar, são mandadas do sistema nervoso central para o nervo motor. Ao atingir o terminal do nervo, os potenciais de ação causam a liberação do neurotransmissor acetilcolina, que, por sua vez, é difundido até a superfície muscular e faz com que canais iônicos sensíveis a acetilcolina ali sejam abertos. Essa abertura desencadeia um processo bioquímico complexo de contração, com a propagação do sinal de contração ao restante do tecido muscular sendo realizada por canais de sódio e de potássio do próprio tecido.

Neste exemplo, vemos o papel essencial dos canais iônicos nas várias etapas. Em primeiro lugar, a propagação do sinal elétrico através dos axônios se dá em virtude do fato de que a abertura dos canais no axônio geram correntes, que, por sua vez, geram diferenças de potencial, que abrem mais canais e geram mais correntes, permitindo a propagação do sinal.

Naturalmente, a propagação do sinal elétrico normalmente tem como objetivo ativar uma resposta não elétrica, e canais iônicos também estão diretamente envolvidos nessa parte do processo. Até onde se sabe, a transdução final sempre é iniciada por um processo comum: a abertura ou o fechamento de canais de Ca^{2+} , quer na superfície da membrana ou em uma membrana interna [5]. Isso altera o fluxo de Ca^{2+} no citoplasma, alterando controladamente a concentração do mesmo, o que leva ao resultado final desejado. A contração de fibras musculares, a secreção de neurotransmissores, neurohormônios, enzimas

digestivas, entre vários outros são controlados por processos dessa forma. A concentração interna de Ca^{2+} também controla o chaveamento de alguns canais iônicos, a atividade de inúmeras enzimas e a expressão de vários genes [5].

Organismos avançados na escala evolutiva possuem um grande número diferente de canais. Cada célula especializada possui inúmeros canais diferentes para transportar cada tipo de íon, cada qual para uma função fisiológica diferente. Por exemplo, a mesma célula pode possuir canais de cálcio ativados por voltagem e canais de cálcio ativados quimicamente. Além disso, cada canal pode possuir inúmeras isoformas, a nível de estrutura atômica da proteína.

Dessa forma, vemos que estabelecer uma nomenclatura adequada aos canais iônicos não é uma tarefa simples. Esse trabalho começou a ser sistematizado pela IUPHAR (*International Union of Pharmacology*) a partir de 1999, resultando, até o momento, em um compêndio com a nomenclatura de canais iônicos chaveados por voltagem [28]. Para os demais canais, a nomenclatura existente ainda é arbitrária e baseada nos mais diversos fatores, como qual o principal íon permeante (problemática quando não há um principal permeante ou quando vários canais possuem o mesmo principal permeante), moléculas inibidoras do canal, neurotransmissores, mutações ou doenças associadas com defeitos no canal. A partir da década de 1980, quando avanços em genética molecular permitiram a clonagem de canais, a situação se tornou ainda mais caótica, em virtude de vários laboratórios clonarem as mesmas sequências simultaneamente e publicarem com acrônimos diferentes, tornando nomenclatura múltipla algo abundante [5].

Apesar da enorme diversidade de canais iônicos a nível molecular, eles podem ser divididos em famílias de canais que apresentam comportamento semelhante. Por exemplo, as semelhanças entre canais chaveados por potencial elétrico de sódio, potássio e cálcio foram notadas por cientistas há muito tempo. O mesmo ocorreu com os canais sinápticos chaveados por acetilcolina, glicina e ácido γ -aminobutírico. Análises de genética molecular mostraram o mesmo quadro que se aplica a várias classes de proteínas em biologia. Grupos de canais apresentam sequências de aminoácidos previstas com fortes similaridades estruturais, permitindo inferir sobre canais semelhantes que evoluíram de ancestrais comuns [5].

Dentre as proteínas que promovem transporte de soluto através da membrana celular,

canais iônicos são as mais simples conceitualmente, por formarem um poro aquoso que liga os meios intra e extracelulares. Embora a dinâmica da proteína possa ter efeitos sobre o fenômeno de transporte, este ocorre como uma difusão eletroquímica, não requerendo grandes alterações conformacionais. Na verdade, o fato de eletrodifusão ser o único mecanismo de transporte compatível com os fluxos observados experimentalmente ($\sim 10^7$ íons por segundo, ordens de grandeza maior que as taxas de proteínas carregadoras) foi um ponto de apoio importante para que a comunidade científica apoiasse o conceito de canal iônico antes que a existência dos poros aquosos fosse diretamente comprovada em 1984 [114].

Alterações conformacionais da proteína assumem um papel no chaveamento do canal, ou seja, ajudam a determinar se o mesmo encontra-se aberto (e permeável aos íons selecionados) ou fechado (e impermeável a todos os íons). Experimentos que utilizam uma região muito pequena de membrana fosfolipídica com canais chaveados por neurotransmissores podem ilustrar este conceito. Caso a concentração de neurotransmissores nas soluções seja muito baixa e a corrente através da membrana seja monitorada com um equipamento suficientemente sensível, é possível observar picos de corrente transmembranar, aproximadamente de mesmo valor, com duração de alguns *ms*, correspondendo a eventos de abertura e fechamento de um único canal. Para tensões aplicadas de até $200mV$, valores característicos da corrente através de um único canal iônico são da ordem de $5pA$ [5].

Claramente o processo de chaveamento dos canais é muito importante e de grande interesse, visto que ele precisa ser extremamente bem regulado, dados os grandes fluxos resultantes quando eles estão abertos. O enfoque deste trabalho, no entanto, é no funcionamento dos canais enquanto eles estão abertos, que também corresponde a um grande desafio e cujo objetivo é compreender as relações entre estrutura e funcionamento dos canais.

Do ponto de vista físico, podemos fazer uma estimativa da situação de um íon em um nanoporo utilizando eletrostática. Tendo em mente que o canal é um poro muito estreito (de raio tipicamente menor que 10 \AA) preenchido por água ($\epsilon_w = 80$) e cercado por uma proteína e por uma membrana fosfolipídica ($\epsilon_p \approx 2$), imaginemos uma carga pontual nesse meio. As linhas do campo deslocamento elétrico tenderão a ser fortemente confinadas na água, o que acarretará em uma barreira energética para a carga, caso a mesma tente

cruzar o poro. De fato, a barreira de potencial encontrada por um íon em um poro de comprimento de 25 Å e raio de 3 Å é da ordem de $6k_B T$ [61, 62], incompatível com os fluxos iônicos conhecidos, que são próximos ao limite difusivo.

Além disso, vários canais são capazes de distinguir entre íons quimicamente muito semelhantes, como Na^+ e K^+ , de modo que a compreensão da seletividade dos diferentes canais também constitui um desafio relevante. As evidências experimentais indicam também que a maioria dos canais requer a presença simultânea de vários íons para conduzir. Isso significa que correlações eletrostáticas devem ter um papel importante na permeação iônica. Finalmente, em poros particularmente estreitos, como o de gramicidina A (gA), sabe-se que os íons movem-se em fila única durante a permeação, incapazes de ultrapassar mesmo moléculas de água [1].

Embora o conceito de canal iônico tenha sido comprovado diretamente em 1984 [114], a primeira estrutura molecular de um canal real, o canal bacteriano KcsA de K^+ , foi publicada somente em 1998 [115], através de análise cristalográfica. Desde então, a estrutura cristalina de vários canais iônicos foi obtida [116, 117, 118, 119, 120, 121, 122], e espera-se que novas sejam publicadas em uma taxa crescente. Até a disponibilidade de estruturas de canais reais, no entanto, grande esforço foi dedicado para estudar o transporte através de poros transmembranares formados por outras moléculas. No início da aplicação das técnicas experimentais de fixação de membrana, descobriu-se que a solução de diversos compostos nos eletrólitos separados por uma membrana bilipídica impermeável tornava a membrana permeável. Posteriormente, se descobriu que alguns destes compostos formavam poros transmembranares, enquanto outros formavam proteínas carregadoras.

O caso mais importante é o do antibiótico gramicidina A (gA), que forma um poro transmembranar cuja presença impede a célula de manter seu equilíbrio fisiológico. Desde 1971, já existia uma estrutura com resolução atômica proposta para o poro de gA [110]. Em 1986, ela foi determinada experimentalmente [111] e, posteriormente, refinada [112, 113]. Com isso, o poro de gA recebeu grande atenção teórica e experimental, sendo o poro para o qual há a maior quantidade de dados experimentais disponíveis [1, 5] e, portanto, sendo um importante candidato para modelos teóricos de permeação.

1.2 Estudo de canais iônicos

Uma vez que o objetivo do estudo teórico de canais iônicos é estabelecer os mecanismos de funcionamento dos mesmos, elucidando suas relações com a estrutura física do canal, convém discutir brevemente aspectos gerais da estrutura e do funcionamento de canais iônicos. Conforme foi mencionado anteriormente, o movimento iônico em um poro de alta constante dielétrica confinado por um meio de baixa constante dielétrica envolve uma barreira de potencial, decorrente das cargas de polarização induzidas na interface água-membrana. Dessa forma, fica claro que a geometria da interface possui um papel importante na permeação. Da mesma forma, a distribuição de resíduos de carga na proteína também desempenha um papel crítico.

O formato geral de canais iônicos biológicos resulta de dois requerimentos conflitantes. Por um lado, a condução do maior número de íons possível em um tempo muito curto sugere que os canais apresentem grandes seções transversais. Por outro lado, a condução precisa ser seletiva somente aos íons desejados, que muitas vezes possuem inclusive a mesma carga elétrica que íons indesejados. Para selecionar entre íons semelhantes, poros mais estreitos são convenientes. A solução normalmente encontrada para esse dilema é a de canais com seções transversais relativamente grandes, com uma região estreita, utilizada para seleção (notamos que o mecanismo de seleção é complexo e não envolve somente o tamanho, mas a interação da região de menor raio com o íon e sua camada de hidratação). O formato preciso de cada canal varia, mas esta linha geral tende a estar presente nos canais biológicos [1]. Canais sintéticos não necessariamente seguem essa linha geral, sendo que o próprio canal de gA apresenta uma estrutura aproximadamente cilíndrica de raio de 2 Å [5].

Com relação a resíduos de carga, os mesmos desempenham um papel importante na permeação. Por exemplo, a estrutura cristalina do canal KcsA apresenta três cátions na região interna do canal [115], embora para concentrações de 150mM de KCl o esperado seria que algum íon ocupasse o canal somente em 20% do tempo. Sabe-se que o mecanismo que propicia esta ocupação do canal de KcsA é a existência de resíduos de carga negativa na parede interna da proteína, o que favorece a permeação por cátions [115, 1]. A presença de resíduos carregados tão próximos aos íons permeantes também indica a importância de modelar adequadamente a polarização, como será discutido extensivamente nas seções 2.5

e 2.6.

Experimentalmente, a propriedade mais estudada de canais iônicos é a corrente de canal único, normalmente medida através da técnica de fixação de membrana conhecida como *patch-clamp* [8, 9]. As medidas mais populares são as de corrente contra tensão aplicada (I-V) e de corrente contra concentração (I-c).

Para diferenças de potencial membranares na região fisiológica ($-100mV < V < 50mV$), muitas curvas I-V são aproximadamente lineares, quando a concentração em ambos os lados da membrana é a mesma. Para concentrações assimétricas e para potenciais maiores que $100mV$, é normal que as curvas I-V apresentem não linearidades. Conforme elucidado por Edwards *et al.*, a reprodução de curvas I-V lineares por modelos computacionais é uma tarefa relativamente simples que inúmeros modelos atingem simplesmente ajustando o valor do coeficiente de difusão dos íons dentro do canal [29]. Portanto, o desenvolvimento de modelos computacionais precisos é beneficiado por medidas experimentais com tensões aplicadas tão altas quanto for viável [1].

Outra curva que não pode ser trivialmente reproduzida por modelos computacionais é a I-c, obtida medindo a corrente através de um único canal com uma tensão aplicada, mas para diferentes valores da concentração do eletrólito, ainda que igual entre os dois lados da membrana. O comportamento dessa curva é comum a todos os canais iônicos, com ela crescendo linearmente para concentrações baixas e, eventualmente, apresentando um valor de saturação. Esse comportamento é descrito pela função de Michaelis-Menten [5]:

$$I = \frac{I_{max}}{\left(1 + \frac{c_s}{c}\right)}, \quad (1.1)$$

onde a concentração de meia altura, c_s , apresenta uma grande variação de valores para diferentes canais, desde $10mM$ para canais de Ca^{2+} até aproximadamente $300mM$ para canais de gA [1]. Para cada tensão aplicada, há um valor diferente da corrente de saturação, mas a relação com a concentração dos reservatórios permanece fiel à relação 1.1.

Além da informação experimental a nível fisiológico, no entanto, os modelos computacionais ainda se beneficiam de estudos experimentais a nível microscópico. Todas as técnicas computacionais com perspectiva de serem utilizadas para estudar canais nas próximas décadas, discutidas em detalhe no capítulo 2, apresentam dificuldades decorrentes de modelar um sistema com as peculiaridades de canais iônicos.

As técnicas de Poisson-Nernst-Planck (seção 2.3) e Dinâmica Browniana (seção 2.4) apresentam dificuldades para modelar as constantes dielétricas e de difusão no ambiente confinado dos canais. Atualmente, esses parâmetros são tratados de forma relativamente arbitrária e não sistemática, o que constitui um grande problema para o desenvolvimento de modelos.

Já a técnica de Dinâmica Molecular Clássica (seção 2.5) peca por trabalhar com campos de força intrinsecamente não polarizáveis e calibrados para condições de *bulk*. Dessa forma, com a polarização sendo tratada exclusivamente como um campo médio e com os indícios de que os modelos clássicos para a água falham em ambientes confinados, há espaço para muito aprimoramento até que a técnica possa ser frutiferamente utilizada de forma preditiva em canais iônicos.

1.3 Importância biomédica

Para encerrar este capítulo, comentamos brevemente sobre a vasta importância biomédica de canais iônicos e as perspectivas fornecidas pela compreensão do funcionamento dos mesmos. Do fluxo iônico dependem processos como secreção hormonal, contração muscular, excitação cardíaca, transmissão de informação no sistema nervoso, entre muitos outros [5]. A fisiologia celular normal requer concentração celular de Na^+ aproximadamente 10 vezes menor que a extracelular, concentração celular de K^+ em torno de 30 vezes maior do que a extracelular, e concentrações de Na^+ e K^+ ambas muito maiores que as concentrações de Ca^{2+} .

Dada a imensa quantidade de processos fisiológicos relacionados diretamente ao fluxo desses íons, não chega a ser uma surpresa que canais iônicos desempenhem papéis importantes em diversas condições clínicas em seres humanos e animais, variando desde expressão e atividade excessiva de alguns tipos de canais em certas doenças até medicamentos ou doenças cujo princípio ativo está diretamente associado a canais. A seguir, listamos apenas alguns exemplos da pesquisa aplicada a medicina e veterinária que envolve diretamente canais iônicos.

Embora não haja um consenso a respeito dos mecanismos que levam a dano neural na doença de Alzheimer, inúmeras evidências apontam para o conceito de que distúrbios da

homeostase de Ca^{2+} intracelular desempenhe um papel patológico na neurodegeneração associada à doença. A abertura dos canais $A\beta$ de Alzheimer permite o fluxo de Ca^{2+} para dentro da célula, e substâncias bloqueadoras desses canais podem ser uma forma de tratamento para a doença [10]. Outras doenças importantes, como acidentes vasculares cerebrais e epilepsia demonstram relações com excesso de Ca^{2+} no interior celular, motivando pesquisas relacionadas a controlar os canais de cálcio em neurônios [11].

Um exemplo de doença diretamente ligada a canais iônicos em veterinária é a condição neurológica “*Ryegrass staggers*”, desenvolvida por gado que pastou em campos contaminados por um tipo específico de fungo. As neurotoxinas produzidas por esse fungo atuam como um potente inibidor de canais de K^+ ativados por Ca^{2+} de grande condutância e o resultado é que o gado perde controle sobre sua função motora. Estudos com camundongos que possuem e não possuem esse tipo de canal confirmaram sintomas semelhantes nos que apresentam os canais, e reação assintomática em camundongos sem o canal [12].

A atividade de canais iônicos também está intimamente relacionada ao processo de apoptose, ou morte celular programada, utilizado por organismos multicelulares para eliminar células abundantes ou potencialmente perigosas. Desde a sinalização da apoptose até a sua execução, canais iônicos estão diretamente envolvidos [13].

Da mesma forma, canais iônicos também são essenciais para a proliferação celular e há fortes evidências de que desempenham um papel no desenvolvimento de câncer, proliferação de tumores malignos e metástase [14, 17]. De fato, sabe-se que células de câncer de próstata podem ter sua habilidade para metástase classificada com base em seus canais iônicos [16], sendo que as mais propensas apresentam canais que as tornam resistentes à apoptose e fornecem maior capacidade de manter o volume celular adequado.

Além disso, o grande número de processos controlados por sinais relacionados a canais iônicos implicam que controle farmacológico sobre os canais pode ser utilizado para controlar os processos relacionados. Wu *et al.* (2009) propõem controle de canais de potássio para tratamento clínico de casos avançados de câncer gástrico, no qual o controle dos canais pode ser utilizado para impedir o crescimento dos tumores [15]. Inúmeros tipos de canais já foram associados com o crescimento, migração e invasão de diversos tipos de tumores, o que, além de atrair o interesse para desenvolvimento de medicamentos que atuem diretamente nesses canais, proporciona novos meios de diagnóstico e avaliação de tratamentos

adequados [18].

As relações entre canais iônicos, doenças e potenciais terapias são tão vastas que poderíamos nos estender quase indefinidamente mencionando exemplos relevantes. Entre eles, estariam medicamentos anestésicos que atuam diretamente nos canais e as implicações disso para anestesia clínica [19, 22], o papel de canais iônicos de células não excitáveis no sistema vascular [20, 21], no desenvolvimento de medicamentos para tosse [23], e muitos outros mais.

Apesar do grande potencial para o desenvolvimento de fármacos que atuam sobre canais iônicos, uma parcela minúscula dos canais de seres humanos são alvo de medicamentos comerciais atualmente [24]. Dada a recente história do campo de canais iônicos, todas as drogas comerciais que atuam sobre canais foram desenvolvidas relativamente ao acaso e seu princípio microscópico de funcionamento foi elucidado somente *a posteriori*. De fato, a história do desenvolvimento de medicamentos raramente apresentou triunfos de desenvolvimento racional [25].

Na era genômica, o foco passou a ser identificar alvos moleculares específicos que são relevantes para a doença de interesse, como forma de direcionar o desenvolvimento. No caso de canais iônicos, além do enorme potencial para desenvolvimento, existem grandes desafios associados. O principal deles é relacionado ao grande número de isoformas dos canais com diferentes expressões celulares e subcelulares. Os desafios são identificar quais as isoformas relevantes à doença em questão e desenvolver fármacos suficientemente seletivos aos alvos escolhidos [25]. A ambição maior de modelos computacionais de canais iônicos é atingir o ponto no qual eles possam ser utilizados para tornar tais desenvolvimentos mais eficientes. O estágio atual dos modelos computacionais existentes e suas perspectivas de evolução são discutidos no próximo capítulo.

Capítulo 2

Modelos de Permeação

2.1 Introdução

O estudo teórico de canais iônicos possui como objetivo estabelecer modelos que elucidem os princípios microscópicos de funcionamento dos canais e que reproduzam quantitativamente o comportamento dos mesmos. Em razão de se tratar de um sistema altamente inhomogêneo, com milhares de átomos e envolvendo interações de longo alcance, é possível conceber inúmeras abordagens para a modelagem. Neste capítulo, discutimos as diversas opções computacionais utilizadas para estudar canais iônicos, suas vantagens, desvantagens e as perspectivas de cada uma.

2.2 Teoria de Taxa de Reação

Historicamente, o primeiro modelo que se estabeleceu para a interpretação de dados experimentais de canais iônicos foi a teoria de taxa de reação (do inglês, *reaction rate theory*). Trata-se de um modelo cinético que consiste em postular a existência de sítios de ligação dos íons permeantes com o canal. Considera-se que entre os sítios haja barreiras de potencial e que a probabilidade de um íon ultrapassar a barreira e saltar ao sítio vizinho seja inversamente proporcional à exponencial da altura da barreira.

Embora a teoria de taxa de reação seja ainda hoje utilizada para analisar dados experimentais e tenha proporcionado avanços conceituais importantes na compreensão de canais iônicos, as propriedades físicas dos canais não possuem relação com os parâmetros do modelo, o que limita sua utilidade [91].

2.3 Poisson-Nernst-Planck

A alternativa mais simples à teoria de taxa de reação é a teoria de Poisson-Nernst-Planck (PNP), que consiste na combinação das equações da continuidade e de Poisson com as leis de Ohm e de Fick. Visto que esta é a forma mais simples de estudar o problema que permite a incorporação direta de informações estruturais do canal, sua aplicação foi muito popular a partir da segunda metade da década de 1980, encorajada por seu sucesso na descrição de outros sistemas biológicos [1]. Sua validade em canais iônicos é limitada, no entanto, conforme será discutido mais adiante.

Em PNP, o fluxo de cada espécie iônica do sistema é descrito pela equação de Nernst-Planck, que associa a cada ponto do espaço um fluxo devido ao gradiente de concentração e ao campo elétrico ali presentes:

$$\mathbf{J}_\nu = -D_\nu \left(\nabla n_\nu + \frac{z_\nu e n_\nu}{k_B T} \nabla \phi \right), \quad (2.1)$$

onde D_ν , n_ν e $z_\nu e$ são, respectivamente, o coeficiente de difusão, a densidade (em número de íons por unidade de volume) e a carga dos íons da espécie ν . Para escrever o termo devido ao potencial elétrico em termos do coeficiente de difusão, foi utilizada a relação de Einstein. Claramente, para uma abordagem autoconsistente, o potencial elétrico na equação para o fluxo deve obedecer a equação de Poisson:

$$\epsilon_0 \nabla \cdot [\epsilon(\mathbf{r}) \nabla \phi(\mathbf{r})] = - \sum_\nu z_\nu e n_\nu - \rho_{ex}, \quad (2.2)$$

onde $\epsilon(\mathbf{r})$ é a constante dielétrica. No lado direito da equação temos o negativo da densidade de cargas, que consiste nos íons móveis no eletrólito, representada pela soma sobre ν , e nas demais cargas do sistema, representada por ρ_{ex} .

O método PNP, portanto, consiste na resolução simultânea das equações 2.1 e 2.2, resultando no potencial elétrico, na concentração e no fluxo de íons para cada ponto do espaço. As equações de PNP são extremamente difíceis de tratar analiticamente, sendo que somente são conhecidas soluções para casos muito especiais, como a equação de Goldman-Hodgkin-Katz (que não é autoconsistente) [5, 1] e limites para grande campo elétrico [35, 36]. Para aplicações práticas, incluindo estudos de permeação, são utilizados métodos numéricos de diferenças finitas.

É importante notar que, nesta abordagem, todos os íons do eletrólito são descritos pela sua concentração, que é pensada como uma função contínua e diferenciável do espaço. Notamos também que a hipótese básica para tal tratamento macroscópico é de que cada “ponto” do espaço físico é pensado como uma região muito pequena quando comparada com as dimensões do sistema, mas ainda assim grande o bastante para conter um grande número de partículas. No caso de canais iônicos, a própria existência de tal limite é questionável.

Por exemplo, se considerarmos um poro cilíndrico de raio de 3 \AA em uma membrana de espessura de 30 \AA para concentrações fisiológicas, esperamos que o volume do poro ($\sim 10^3 \text{ \AA}^3$) esteja ocupado por algum íon, cátion ou ânion, em 10% do tempo. No tratamento desse sistema via PNP, o sistema seria dividido em pequenas células com volume de, por exemplo, 1 \AA^3 cada. Portanto, cada célula teria uma concentração da ordem de 10^{-4} cátions e 10^{-4} ânions durante todo o tempo. Tal cenário claramente é muito diferente da realidade física, na qual o número de íons é inteiro em cada momento e cada um possui uma localização específica.

Nestas condições, espera-se que a teoria apresente falhas nos dois seguintes quesitos quando aplicada a canais iônicos. Primeiramente, ela deve superestimar amplamente o efeito de blindagem elétrica por parte dos íons. Isso ocorre pois ela trata a densidade de carga como uma função contínua no espaço que pode assumir valores infinitamente pequenos e se distribuir ao longo da totalidade do volume do canal, dando a ela uma flexibilidade que íons não possuem na realidade.

Em segundo lugar, além da falha na interação entre os íons, a teoria também não leva em conta corretamente as interações dos íons com o canal. Sendo o canal um poro preenchido por água ($\epsilon \sim 80$) em uma bicamada fosfolipídica ($\epsilon \sim 2$), a entrada de uma carga localizada induz cargas de polarização (que possuem o mesmo sinal que a carga que as induz) na interface entre os dielétricos. No entanto, como cada célula do sistema possui uma densidade de cargas positiva e uma negativa, a tendência é que em PNP sejam induzidas muito menos cargas de polarização na interface do que na realidade. Isso ocorre pois o cenário real de cargas localizadas em um ponto do espaço é substituído por funções densidade de carga definidas em cada ponto do espaço, de modo que cada ponto comporte cargas positivas e negativas ao mesmo tempo. Isso resulta em um cancelamento parcial da carga elétrica que é artificial e impede o modelo de contabilizar adequadamente a carga de

polarização, que é induzida pela presença de cargas localizadas somente em alguns pontos.

De fato, os trabalhos [2, 3] realizam uma comparação detalhada entre PNP e dinâmica browniana, demonstrando que a aplicação de PNP em poros estreitos leva a resultados errôneos pelos motivos citados acima. Mesmo assim, a teoria de PNP converge para os resultados obtidos por dinâmica browniana quando o raio do poro é a partir de duas e três vezes o comprimento de Debye do sistema. Assim, também fica clara a razão da aplicação bem sucedida de PNP em diversos sistemas biológicos maiores que canais iônicos.

Para levar em conta corretamente a interação dos íons com o canal e entre os próprios íons, foram propostas formas de levar em consideração o tamanho finito dos íons, por exemplo, incluindo explicitamente um termo no potencial para representar a interação com as cargas induzidas [37, 38, 39, 40, 68]. Tais abordagens apresentam melhoras em relação a PNP tradicional, mas perdem a simplicidade e eficiência computacional da mesma, o que sugere que uma abordagem por dinâmica browniana seja mais interessante.

Por fim, a utilização de PNP para o estudo de canais iônicos supõe que o canal seja uma estrutura rígida e o sistema possa ser descrito pela eletrostática contínua. Como a técnica de dinâmica browniana também utiliza tais aproximações, elas serão discutidas na próxima seção.

Notamos também que a teoria de Poisson-Boltzman, muito utilizada na década de 1980 para calcular a energia potencial em canais iônicos em situações de equilíbrio, também é intrinsecamente de campo médio e falha nas mesmas situações que a teoria PNP.

2.4 Dinâmica Browniana

Tendo em vista que PNP falha em virtude do tratamento dos íons como uma função concentração contínua no espaço e da aproximação de campo médio, o passo natural a ser dado em busca de um modelo mais realista é tratar os íons como cargas pontuais, mantendo o tratamento da água, da proteína e da membrana celular como meios dielétricos contínuos.

A modelagem de sistemas de muitas partículas frequentemente é realizada com alguns graus de liberdade do sistema sendo tratados explicitamente, enquanto os demais graus de liberdade são representados exclusivamente por seu efeito estocástico nos primeiros. A esse conjunto de abordagens, dá-se o nome de Dinâmica Estocástica. A forma mais simples de

Dinâmica Estocástica ocorre quando a força estocástica não apresenta correlações espaciais ou temporais e é chamada de Dinâmica Browniana (DB).

Originalmente proposta por Einstein, em 1905, no contexto do estudo do movimento browniano, DB corresponde à abordagem com melhor custo-benefício para o estudo de permeação em canais iônicos. Nela, os íons são tratados explicitamente, com o i -ésimo íon possuindo massa m_i e coeficiente de fricção com a água γ_i . A trajetória do i -ésimo íon é calculada através da equação de Langevin:

$$m_i \frac{d\mathbf{v}_i}{dt} = -m_i \gamma_i \mathbf{v}_i + \mathbf{R}_i + \mathbf{F}_i, \quad (2.3)$$

onde \mathbf{v}_i é a velocidade do i -ésimo íon. A força total sentida pelo íon, que compreende o lado direito da igualdade, é separada em três termos. O termo \mathbf{F}_i corresponde a todas as forças sistemáticas sentidas pelo íon, que são a força devida ao potencial elétrico aplicado na membrana e as forças de interação do íon com o canal e demais íons presentes no mesmo. Os dois primeiros termos do lado direito da equação 2.3 são, respectivamente, de origem friccional e estocástica. Ambos decorrem diretamente da abordagem de DB, modelando o efeito da água sobre os íons. Como ambos os termos possuem a mesma origem física, eles não são independentes, sendo que a relação entre eles é dada pelo teorema da flutuação-dissipação [41]:

$$m_i \gamma_i = \frac{1}{2k_B T} \int_{-\infty}^{\infty} \langle \mathbf{R}_i(0) \cdot \mathbf{R}_i(t) \rangle dt. \quad (2.4)$$

O integrando é a função de autocorrelação da força estocástica e os parenteses angulares indicam a média sobre um *ensemble* de equilíbrio. Além disso, em DB, se assume que a força $\mathbf{R}_i(t)$ é um processo estocástico estacionário, markoviano ($\langle \mathbf{R}_i(t) \cdot \mathbf{R}_j(t') \rangle = 2m_i \gamma_i k_B T \delta_{ij} \delta(t - t')$), gaussiano de média zero, e sem apresentar correlações com velocidades anteriores ou com a força sistemática. Isso pode ser resumido com as seguintes propriedades:

$$\langle R_i \rangle = 0 \quad (2.5)$$

$$W(R_i) = (2\pi \langle R_i^2 \rangle)^{-\frac{1}{2}} \exp\left(\frac{-R_i^2}{2\langle R_i^2 \rangle}\right) \quad (2.6)$$

$$\langle v_i(0) R_j(t) \rangle = 0, \quad \forall i, j; t \geq 0 \quad (2.7)$$

$$\langle F_i(0) R_j(t) \rangle = 0, \quad \forall i, j; t \geq 0 \quad (2.8)$$

Estritamente falando, a hipótese markoviana somente é válida quando a partícula browniana é muito mais pesada que as moléculas do solvente. Caso contrário, utiliza-se a equação generalizada de Langevin, que é obtida a partir de 2.3 substituindo-se a constante de fricção por um *kernel* dependente do tempo, ou seja:

$$m_i \frac{d\mathbf{v}_i}{dt} = -m_i \int_0^t dt' \xi_i(t') \mathbf{v}_i(t') + \mathbf{R}_i + \mathbf{F}_i, \quad (2.9)$$

onde a função ξ_i é chamada de função memória. Quando a partícula browniana é muito mais pesada que as moléculas do solvente, $\mathbf{v}_i(t')$ é aproximadamente constante na integral da força de fricção, resultando na equação de Langevin tradicional, com $\gamma_i = \int \xi_i(t) dt$. Isso é equivalente a utilizar a função memória como sendo uma delta de Dirac.

Como íons claramente não estão inclusos no limite sugerido por esta aproximação, cabe a pergunta de quão adequado é utilizar a equação de Langevin para estudar canais iônicos. De fato, a discrepância entre o comportamento esperado pela equação de Langevin e simulações de dinâmica molecular para as funções de autocorrelação de velocidade em eletrólitos é um resultado bem conhecido [42]. Rey *et al.* (1992) mostraram que o comportamento observado nas simulações de dinâmica molecular pode ser reproduzido com a utilização da equação generalizada de Langevin e uma função memória adequada, que contabiliza adequadamente as correlações do ruído com a velocidade [43].

Isso motivou Bastug e Kuyucak (2005) a estudarem explicitamente como a adição de uma função memória alteraria a descrição de canais iônicos [42]. O trabalho constata diferença nos resultados gerados por ambas equações quando o fenômeno de ultrapassagem de barreiras de potencial é estudado, especialmente para barreiras de pequena largura (1 Å). Como as barreiras de potencial presentes nos estudos deste trabalho são todas de largura muito maior que 1 Å, não há razão para esperar grandes efeitos decorrentes da hipótese markoviana. Portanto, a imensa maioria das aplicações a canais iônicos utiliza a equação de Langevin tradicional, e é o que fazemos neste trabalho.

Outro tópico relevante abordado por Bastug e Kuyucak [42] que é raramente mencionado é o fato de que, *a priori*, não há justificativa para utilizar a equação de Langevin com passos de tempo menores que o tempo de relaxação γ^{-1} dos íons. Como pode ser visto na tabela 2.1, o tempo de relaxação de íons fisiológicos varia entre 12 e 31 *fs*, mas algoritmos de DB na literatura frequentemente usam passos de tempo tão curtos quanto 2 *fs*. Bastug

e Kuyucak (2006) utilizaram passos de até 2 fs e constataram resultados adequados em *bulk*, evidência de que valores de passo pequenos podem ser utilizados.

Íon	m ($10^{-26}kg$)	r (Å)	D ($10^{-9}m^2s^{-1}$)	γ^{-1} (fs)
Na^+	3,8	0,95	1,33	12
K^+	6,5	1,33	1,96	31
Ca^{2+}	6,6	0,99	0,79	13
Cl^-	5,9	1,81	2,03	29

Tab. 2.1: *Parâmetros dos íons fisiologicamente importantes em solução eletrolítica. [5]*

Com relação à implementação prática de DB para o estudo de canais, há alguns obstáculos. A promessa de DB para o estudo de canais iônicos foi primeiramente elucidada por Cooper *et al.* [54, 55, 56] na década de 1980. No entanto, sua aplicação em canais de forma realista requer o conhecimento das forças de interação dos íons do sistema entre si e com o canal. No nível de DB, com o canal e a água sendo modelados como meios dielétricos contínuos, as forças são obtidas através do potencial eletrostático. Como a obtenção do potencial eletrostático requer a solução da equação de Poisson, que precisa ser resolvida novamente a cada nova posição dos íons do sistema, a implementação da técnica pode ser uma tarefa formidável.

De fato, os poucos estudos utilizando a técnica até o final da década de 1990 restringiram-se a modelos de canais unidimensionais ocupados por somente um íon [58, 59] ou que desconsideravam a interação íon-canal [60]. Mesmo no início dos anos 2000, o custo computacional associado com a solução numérica da equação de Poisson a cada passo de tempo de uma simulação de DB aplicada a canais iônicos ainda estava além da capacidade dos supercomputadores então disponíveis.

Apesar disso, era um fato há muito conhecido da literatura em biofísica que um poro preenchido por água ($\epsilon_w \sim 80$) confinado em uma região muito pequena por uma membrana fosfolipídica ($\epsilon_p \sim 2$) leva a grandes barreiras de energia potencial para a permeação iônica. Já em 1969, Parsegian mostrou que a barreira eletrostática em um canal cilíndrico infinito de raio de 3 Å é superior a $16k_B T$ [31], grande o bastante para suprimir qualquer fluxo iônico.

Eventualmente, trabalhos numéricos por Levitt (1978) [61], Jordan (1982) [62] e outros mostraram que, para poros finitos, a barreira eletrostática era dramaticamente reduzida. Por exemplo, a barreira de um canal de raio de 3 Å e comprimento de 25 Å é da ordem de $6k_B T$, o que é suficientemente baixo para permitir alguma condutividade [30]. Dessa forma, a dificuldade de incluir as interações eletrostáticas corretas na técnica de DB e o sucesso de modelos de PNP para reproduzir curvas experimentais de corrente contra tensão fez com que a técnica de DB levasse mais tempo para se tornar popular.

Claramente, uma forma de reduzir o custo computacional associado com a solução numérica da equação de Poisson a cada passo de tempo da simulação é trabalhar com modelos geométricos analiticamente solúveis. Embora a equação de Poisson seja separável em mais de uma dúzia de sistemas de coordenadas, somente dois deles são convenientes para descrever geometrias similares a de canais iônicos: coordenadas cilíndricas e coordenadas toroidais. Para coordenadas toroidais, Kuyucak *et al.* (1998) apresentaram soluções potencialmente úteis para o estudo de canais. No entanto, elas são tão incrivelmente complexas que estudos da época com supercomputadores não puderam calcular fluxo iônico no modelo [53]. Para coordenadas cilíndricas, a única solução analítica conhecida até 2006 era de um poro cilíndrico infinito, quando Levin [30] apresentou uma solução para um poro cilíndrico finito. Como neste trabalho utilizamos a solução de Levin, a sua obtenção e o assunto de eletrostática em nanoporos são discutidos em detalhe na seção 2.7.

Na falta de soluções analíticas práticas para a equação de Poisson, o campo de DB prosperou através do desenvolvimento de técnicas computacionais que tornaram a utilização de soluções numéricas muito mais eficiente. Dentre eles, o principal, publicado em 1998, é uma técnica que consiste em gravar valores pré-calculados em tabelas, realizando interpolação entre os valores tabelados para obter o potencial para cada nova configuração dentro do canal [63, 3]. Esta técnica permitiu o acesso de modelos de DB a escalas de tempo fisiologicamente relevantes, mas ainda requer o uso de um supercomputador [1].

Com esse desenvolvimento e com o número crescente de estruturas cristalinas de canais sendo publicadas, houve um grande crescimento da utilização de modelos de DB, a única técnica eficiente o bastante para calcular fluxos e modelar as interações físicas de forma razoavelmente adequada simultaneamente. Modelos de DB para canais como o receptor de acetilcolina [64], KscA de potássio [65, 66], canal de cálcio do tipo L [67] e gramicidina

A [29] seguiram imediatamente.

Além da interação eletrostática, a modelagem por DB requer a adição de um potencial de curto alcance para modelar a repulsão entre as nuvens eletrônicas dos íons [1]. Tal problema é abordado de algumas formas diferentes na literatura. Uma delas é modelar a alteração da interação coulombiana decorrente da sobreposição das nuvens eletrônicas com a adição de um potencial repulsivo de curto alcance que vai com r^{-9} :

$$U_{ca}(r) = \frac{F_0 (r_1 + r_2)^{10}}{9 r^9}, \quad (2.10)$$

onde r é a distância entre os íons, r_1 e r_2 são os raios de Pauling dos íons e F_0 é a magnitude da força de repulsão em contato. Moy *et al.* (2000) estimam $F_0 = 2 \times 10^{-10} N$, a partir do modelo ST2 para a água [2]. Este trabalho mostra que, normalmente, a equação 2.10 é adequada para o potencial de curto alcance. No entanto, para íons de cargas opostas, o potencial total apresenta um mínimo para a situação de contato, o que gerou anomalias em canais muito estreitos [2].

Como proposta para corrigir isto, Moy *et al.* utilizaram potenciais obtidos pelas simulações de dinâmica molecular de Guàrdia *et al.*, que mostram que, em *bulk*, as forças de hidratação adicionam estrutura ao potencial entre os íons, na forma de oscilações amortecidas. Para íons de Na^+ e Cl^- , o potencial pode ser aproximadamente representado por:

$$U_{ca}(r) = U_0 \left(\left(\frac{R_c}{r} \right)^9 - \exp \left(\frac{R - r}{a_e} \right) \cos \left(\frac{2\pi(R - r)}{a_w} \right) \right). \quad (2.11)$$

Nesta equação, o comprimento de oscilação $a_w = 2,76 \text{ \AA}$ é dado pelo diâmetro da água e os demais parâmetros são obtidos via ajuste numérico da equação 2.11 aos resultados das simulações de dinâmica molecular de Guàrdia *et al.* [76, 77, 78, 79]. Corry *et al.* defende o uso da equação 2.11 para o potencial de curto alcance, mostrando que a sua utilização em *bulk* reproduz bem os resultados de dinâmica molecular [67]. Além disso, estudos anteriores que utilizaram a equação 2.10 constataram que o seu uso permitia que íons ocasionalmente ultrapasassem uns aos outros em regiões demasiado estreitas [64, 65].

No entanto, tal comportamento anômalo, observado naqueles trabalhos com a utilização de um passo de tempo grande, de $100 fs$, provavelmente seria corrigido com a utilização de um passo de tempo mais adequado. Apesar disso, mesmo quando algoritmos multi-passo

e passos menores começaram a ser universalmente utilizados, a equação 2.11 seguiu muito popular na literatura.

Em trabalhos mais recentes, uma abordagem mais simples é adotada, modelando a interação de curto alcance com um potencial truncado Weeks-Chandler-Andersen de Lennard-Jones (WCA-LJ):

$$U_{ij}^{WCA}(r) = \begin{cases} U_{LJ}(r) - U_{LJ}(r_c) & \text{se } r \leq r_c \\ 0 & \text{se } r > r_c, \end{cases} \quad (2.12)$$

onde $U_{LJ}(r)$ é o potencial de Lennard-Jones usual, definido por:

$$U_{LJ}(r) = 4\epsilon \left[\left(\frac{\sigma}{r} \right)^{12} - \left(\frac{\sigma}{r} \right)^6 \right]. \quad (2.13)$$

Esta abordagem apresenta a vantagem de ser muito mais simples e eficiente computacionalmente. Além disso, no ambiente do canal, não há razão para acreditar que a equação 2.11 constitua um modelo realista da interação de curto alcance, dado que a mesma foi concebida para ajustar dados de simulações de dinâmica molecular em *bulk*. Neste trabalho, conforme discutido no capítulo 3, optamos pela simplicidade da equação 2.12 para modelar as interações de curto alcance.

As limitações da técnica de DB estão diretamente relacionadas às aproximações fundamentais da técnica. A primeira delas diz respeito ao fato de que a água é tratada como um meio dielétrico contínuo. Seu efeito no sistema é sentido somente em virtude de sua constante dielétrica ϵ_w , de suas colisões com os íons, modeladas pela força estocástica, e de sua viscosidade, relacionada com a constante de difusão de cada espécie iônica através da relação de Einstein:

$$D_i = \frac{k_B T}{m_i \gamma_i}. \quad (2.14)$$

Naturalmente, espera-se que a constante dielétrica da água e que o coeficiente de difusão dos íons seja reduzido no ambiente confinado dos canais, em relação a seu valor em *bulk*. Apesar disso, não existe um consenso a respeito de quais valores utilizar [1, 29, 3, 4]. De fato, para poros estreitos, como o de gA, é questionável se a eletrostática contínua é válida em primeiro lugar.

Edwards *et al.* (2002) utiliza uma estrutura de alta resolução para canais de gA obtida por ressonância magnética nuclear através dos conjuntos de cargas parciais resultantes dos

modelos CHARMM e AMBER [29]. Neste trabalho, mostra-se que enquanto o perfil de energia potencial para cátions obtido parece razoável à primeira vista, possuindo dois poços de potencial nas extremidades e uma barreira central, os poços são muito pouco profundos para explicar as observações experimentais. Tentando reduzir o valor de ϵ_w ou aumentar o valor de ϵ_p , os perfis de energia potencial obtidos foram claramente inaceitáveis.

Com o potencial aparentemente razoável obtido com $\epsilon_w = 80$ e $\epsilon_p = 2$, Edwards *et al.* mostram que é possível reproduzir a curva experimental de corrente contra tensão através de um ajuste do coeficiente de difusão dos cátions dentro do canal, reduzindo seu valor a 80% do de *bulk*. No entanto, é um fato bem conhecido que praticamente qualquer modelo de canal pode reproduzir curvas lineares de corrente contra tensão caso o coeficiente de difusão possa ser ajustado arbitrariamente. De fato, Edwards *et al.* confirmam a futilidade da redução do coeficiente de difusão interno quando constatam que esse modelo falha em apresentar saturação nas curvas de corrente contra concentração [29].

Seguindo com uma exploração do espaço de parâmetros, Edwards *et al.* constroem uma função para o perfil de energia potencial com as características esperadas: poços perto dos extremos e uma barreira central. Ajustando a profundidade dos poços e a altura da barreira, mostram que é possível reproduzir os dados experimentais de corrente contra tensão e contra concentração utilizando o valor de *bulk* para a constante de difusão dentro e fora do canal, obtendo um perfil de concentração ao longo do canal que é compatível com os sítios de ocupação conhecidos [29]. No entanto, o perfil de energia potencial de um único íon foi construído e ajustado buscando os resultados fisiológicos corretos, sem resultar diretamente da solução da equação de Poisson para a estrutura conhecida.

Tal trabalho sintetiza bem as dificuldades de DB. Por um lado, há a questão de como tratar o coeficiente de difusão dos íons dentro do canal. Por outro, há a questão de como tratar a constante dielétrica da água em um ambiente confinado (eventualmente, cogitando se a mesma deveria ser modelada por um tensor, ao invés de um escalar). Em ambos os casos, ainda não existem experimentos ou simulações de dinâmica molecular para darem apoio a novas ideias de como modelar sistemas de DB [88, 69].

Além disso, a proteína é modelada como uma estrutura fixa, o que também é uma aproximação cujas consequências e artefatos não são bem conhecidos. Sabe-se que proteínas não são entidades estáticas, apresentando flutuações térmicas na escala de *ps*, reorientações

e isomerizações de cadeias laterais na escala de centenas de ns , e alterações de conformação na escala de ms a s . Em [94], Allen *et al.* mostraram que os efeitos decorrentes da estrutura dinâmica da proteína podem apresentar efeitos importantes sobre a permeação, questionando quão arbitrária é a construção de modelos de PNP e DB utilizando esta aproximação. Posteriormente, estudos de DB que incluem explicitamente a mobilidade da proteína demonstraram pouca sensibilidade das grandezas fisiológicas aos parâmetros de mobilidade no caso do filtro de seletividade do canal KcsA [72].

Estas dificuldades levaram a uma redução dos estudos de canais iônicos por DB, com a maioria dos desenvolvimentos mais recentes constituindo de algoritmos adaptativos para a obtenção de potenciais de força média para canais diretamente através do fluxo previsto por DB [69, 70, 71] ou algoritmos que mesclam DB e dinâmica molecular clássica (DMC) [73, 74].

Apesar de todas as críticas, DB ainda é a única técnica eficiente o bastante para modelar as interações eletrostáticas de forma razoavelmente boa e ainda assim alcançar escalas de tempo fisiológicas. As dificuldades relacionadas às constantes dielétricas e coeficientes de difusão são as mais sérias, mas, como veremos na seção 2.5, as simulações de dinâmica molecular também sofrem de diversos males relacionados à falta de campos de força capazes de modelar a polarização adequadamente, para não mencionar a falta de calibração dos mesmos para ambientes confinados, que também será discutida adiante. Dessa forma, embora haja dificuldades na utilização de DB para canais, isso se aplica a todas as técnicas computacionais e decorre da complexidade e peculiaridade de canais iônicos.

2.5 Dinâmica Molecular Clássica

Enquanto a teoria de DB trata a água somente através de seu efeito estocástico nos íons e a membrana celular e a proteína que forma o poro somente como dielétricos rígidos, a técnica de dinâmica molecular clássica (DMC) consiste na abordagem mais simples que trata todos os átomos do sistema individualmente. Por ser uma técnica amplamente utilizada em simulações físicas, existem inúmeros livros com os detalhes da técnica, como Frenkel e Smit (1996) e Allen e Tildesley (1987) [86, 87]. Para uma revisão recente específica de sua aplicação a canais iônicos, citamos Khalili-Araghi (2009) [96].

Brevemente, em simulações de DMC, a trajetória de cada átomo do sistema é simulada explicitamente através da segunda lei de Newton, levando em conta sua interação com todos os demais átomos do sistema. A força de interação entre os átomos é derivada diretamente de potenciais de interação empiricamente determinados. Portanto:

$$m_i \frac{d^2 \mathbf{r}_i}{dt^2} = -\nabla_i U(\mathbf{r}_1, \dots, \mathbf{r}_N) \quad i = 1, \dots, N. \quad (2.15)$$

Em relação a DB, notamos que não há a presença dos termos estocástico e de fricção, dado que aqui todos os átomos são simulados individualmente. No entanto, a equação 2.15 precisa ser integrada para um sistema que possui centenas de milhares de átomos.

Enquanto a necessidade de integrar sobre um número tão grande de partículas corresponde a um grande gargalo, a técnica apresenta grandes vantagens em termos de precisão. Por exemplo, o caráter dinâmico da proteína e da membrana celulares são simulados explicitamente. Atualmente, simulações de canais iônicos via DMC já ultrapassam 100 ns [88].

Enquanto essa escala é insuficiente para estudar a condutância dos canais em condições fisiológicas, que requerem tempos de simulação de dezenas de μs , a técnica de DMC foi utilizada frequentemente para estudar outros fenômenos relevantes. Como exemplos, mencionamos desde estudos da alteração das propriedades da água e de íons quando em ambiente confinado [95, 97] até estudos de potencial de força média, seletividade e interação com moléculas pequenas e toxinas [92, 93, 94, 88, 100, 98].

A grande popularidade de aplicações de DMC a canais iônicos decorre, em parte, da disponibilidade de vários pacotes prontos, de fácil utilização, feitos especificamente para a simulação de sistemas biomoleculares, como CHARMM [85], AMBER [83] e GROMOS [84]. A utilização destes pacotes em estudos de canais iônicos apresenta um grande problema, no entanto. Se, por um lado, a modelagem do sistema átomo a átomo deve trazer maior precisão, por outro lado, isso somente é verdade caso os campos de forças sejam modelados adequadamente em primeiro lugar. As interações não ligantes dos campos de força existentes foram todas desenvolvidas e calibradas para situações de *bulk*, o que as torna imediatamente suspeitas para aplicação em sistemas mesoscópicos e confinados, como canais iônicos.

Além disso, as funções empíricas para a energia potencial não são explicitamente polari-

záveis [82, 1], com a polarização sendo incluída implicitamente, na forma de campo médio. Desde a década de 1970 já havia manifestações na literatura sobre os potenciais problemas de não se incluir a polarização explicitamente. Atualmente, o desenvolvimento de campos de força explicitamente polarizáveis tem recebido muito esforço [103], mas a falta de dados *in situ* como guia é uma séria barreira. Nesse sentido, simulações de dinâmica molecular *ab initio* podem ser de grande utilidade, como será discutido na seção 2.6.

Por enquanto, no entanto, resultados teóricos e experimentais sustentam que o comportamento da água é dramaticamente alterado em ambientes fortemente confinados. Estudos ópticos de água em nanoporos demonstram uma grande alteração das propriedades dinâmicas a nível molecular em relação ao que ocorre em *bulk* [46], ao passo que estudos de solvatação na proximidade de interfaces mostraram que modelos dielétricos adequadamente construídos apresentam melhor comparação com experimentos e simulações *ab initio* do que os modelos clássicos para a água [47, 49, 48].

Portanto, se a grande vantagem da abordagem atomística é a inclusão rigorosa de flutuações atômicas, considerando o caráter dinâmico da proteína e do solvente, os modelos atuais de campos de força disponíveis ainda não são capazes de fazer isto de forma adequada para todos os casos. Frequentemente, os estudos de DM em canais não apresentam precisão quantitativa. Por exemplo, estudos com campos de força cuidadosamente construídos para o canal de gramicidina A que apresentam acordo semi-quantitativo possuem grande sensibilidade ao campo de forças usado e à membrana na qual o canal é colocado [104, 105, 98].

Dessa forma, a grande dificuldade existente em realizar simulações longas o bastante para comparação direta com experimentos, associada ao grande número de fatores capazes de produzir artefatos torna difícil uma avaliação totalmente crítica de seus resultados [88, 82]. Com o aumento do desempenho dos computadores disponíveis e com o desenvolvimento de melhores campos de força, as perspectivas para DMC para o estudo de canais iônicos são boas.

2.6 Dinâmica Molecular *ab Initio*

Dinâmica molecular *ab initio* (DMAI) é a alternativa mais fundamental de tratamento de canais iônicos, correspondendo a um tratamento quântico de todas as entidades do sistema, inclusive nuvens eletrônicas. Uma forma de abordagem é resolver a equação de Schrödinger utilizando a teoria de Hartree-Fock e seus vários refinamentos [106]. Como a base para a função de onda eletrônica cresce exponencialmente com o número de átomos, no entanto, essa abordagem não é prática para estudar sistemas com mais de dezenas de átomos.

Para trabalhar com sistemas maiores, ainda dentro de uma abordagem quântica, a teoria do funcional de densidade (TFD) é normalmente utilizada [82]. Até o início da década de 1990, a TFD era considerada muito imprecisa para cálculos de química quântica, mas, a partir de então, as aproximações envolvidas foram refinadas para modelar adequadamente interações de troca e correlação [107]. Como a TFD trabalha diretamente com a distribuição de densidade eletrônica, ao invés da função de onda eletrônica, o crescimento do custo computacional com o tamanho do sistema passa a ser uma lei de potência, ao invés de uma exponencial. Com isso, TFD é atualmente a técnica quântica que apresenta o melhor custo-benefício entre tempo computacional e precisão, sendo o método mais aplicado para cálculos quânticos em sistemas biológicos [82].

Para aplicar estes métodos a biomoléculas, usualmente se modela o sistema de forma mista: uma parte de interesse do sistema é modelada utilizando DMAI, fornecendo a estrutura eletrônica dessa região, enquanto o restante do sistema é tratado a nível de DMC. Embora esta divisão traga imensos ganhos computacionais, a duração das simulações é o grande gargalo dessa abordagem. Atualmente, sistemas que tratam 500 átomos quanticamente e 100.000 átomos classicamente podem ser simulados por períodos de até 100 *ps*. Dessa forma, mesmo o cálculo do perfil de energia potencial iônico nos canais, que requer tempo de simulação da ordem de *ns*, é impraticável com essa técnica, atualmente.

Embora não haja expectativas de utilização da técnica de DMAI para estudos completos de canais iônicos na próxima década, há muito o que a mesma pode fazer pelo campo de canais iônicos de uma maneira geral. Conforme foi discutido na seção 2.5, a precisão dos modelos de canais iônicos baseados em DMC depende criticamente da disponibilidade de

campos de força adequados para a situação de nanoporos e a falta de dados experimentais diretos dificulta o desenvolvimento dos mesmos. Nesse sentido, estudos de DMAI podem atuar como uma ferramenta de auxílio no desenvolvimento de novos campos de forças para DMC [82], em particular para a inclusão da polarização [108, 102].

De fato, tudo indica que a resolução de um dos problemas mais estudados em canais iônicos, a capacidade dos canais de KcsA de discriminar entre íons de K^+ e Na^+ , passe por estudos de DMAI, dado que a natureza das interações que causam a seletividade ainda são debatidas. Inicialmente, o filtro de seleção do canal de KcsA tinha sua funcionalidade explicada pelo arranjo geométrico dos ligandos nele [115]. No entanto, simulações de DMC posteriores mostraram um filtro flexível, capaz de interagir favoravelmente também com íons de Na^+ . As hipóteses refinadas resultantes dessa situação passam pelo estudo dos números de coordenação iônicos, que não necessariamente são bem descritos por DMC, dado que esta foi calibrada para descrever valores médios de propriedades termodinâmicas.

Além disso, é razoável esperar que a grande proximidade de um íon positivamente carregado polarize significativamente os ligandos da região, algo descrito de forma pobre pela DMC. Bucher *et al.* (2010) realizaram um estudo do assunto utilizando DMAI, trazendo mais indícios de que o balanço correto entre interações água-íons e água-água são cruciais para discriminar entre as hipóteses refinadas alternativas [125].

Outro estudo de DMAI de grande implicação para o futuro da simulação de canais iônicos é o de Bucher e Kuyucak (2009) [102], no qual o impacto da polarização na condução iônica do canal gA foi estudado, motivado pelos resultados inconsistentes de estudos de DMC [105, 126]. De fato, foi constatado que a polarização da água depende fortemente do ambiente local, especialmente da presença de receptores e doadores de hidrogênio. Enquanto isso, Patel *et al.* (2009) [101] obtiveram bom acordo com experimentos para o perfil de energia livre do canal de gA utilizando a versão polarizável do campo de forças CHARMM.

Outros exemplos de estudos de DMAI aplicada diretamente a canais iônicos são Jensen *et al.* (2005), que estudaram a migração protônica em canais de aquaporina [123] e Bucher *et al.* (2007), que estudaram o acoplamento entre condução iônica e os estados de protonação de resíduos no canal KcsA [124].

Com isso, vemos que DMAI aplicada a canais iônicos trata-se de um campo muito

recente e com inúmeras limitações. Mesmo assim, estudos de DMAI podem contribuir significativamente para que os estudos de DMC atinjam todo o seu potencial.

2.7 Eletrostática em canais

Na técnica computacional de DB, as interações dos íons com o canal e entre os próprios íons são tradicionalmente modeladas utilizando eletrostática contínua, considerando a água e a proteína como dielétricos de constantes dielétricas ϵ_w e ϵ_p , respectivamente. Em virtude do confinamento da água em uma pequena região do espaço, pode-se imaginar que a constante dielétrica da água seja melhor descrita por um tensor cujas componentes são funções das coordenadas espaciais, mas não há evidências de que a inclusão de tal complexidade traga melhores resultados [1].

A abordagem contínua da eletrostática fornece uma descrição macroscópica adequada de meios dielétricos, mas impõe-se a questão de quão válida ela é para sistemas mesoscópicos. Trabalhos como [44, 45], que descrevem com sucesso propriedades de macromoléculas biológicas servem como prova que eletrostática contínua pode ser uma ferramenta importante para o estudo de sistemas mesoscópicos, desde que as interfaces sejam modeladas adequadamente. Canais iônicos encontram-se na fronteira entre sistemas mesoscópicos e microscópicos, no entanto, e sabe-se que as propriedades dinâmicas da água se alteram significativamente em ambientes confinados [46].

Além disso, os modelos computacionais tradicionais para a água não são confiáveis para ambientes fortemente confinados, conforme sugerido por estudos de solvatação iônica próxima a interfaces [47], nos quais a comparação com simulações *ab initio* completas demonstrou falhas nos modelos clássicos para a água. De fato, foi demonstrado que modelos dielétricos contínuos, quando a interface é modelada corretamente, apresentam melhor acordo com as simulações *ab initio* do que os modelos clássicos de tratamento da água [47, 48, 49]. Dessa forma, não existe no momento uma forma estabelecida de como tratar a água em simulações de nanoporos. Neste trabalho, adotamos uma postura pragmática e consideramos $\epsilon_w = 80$, tanto dentro do canal, como nos meios intra e extracelulares.

As simulações computacionais através da técnica de DB, embora muito mais rápidas do que as de DM, apresentam um grande gargalo em relação a desempenho computacional.

Este gargalo é a necessidade de resolver a equação de Poisson a cada passo de tempo, para levar em conta corretamente a interação eletrostática entre os íons e o canal. Tal problema pode ser amenizado utilizando tabelas de referência e técnicas de interpolação [63, 3] ou métodos variacionais [93], mas ainda requerem o uso de um supercomputador.

Uma possibilidade de se contornar essa dificuldade é através de soluções analíticas da equação de Poisson, que é separável em dois de sistemas de coordenadas que favorecem a descrição de geometrias similares a dos poros biológicos: sistemas de coordenadas cilíndricas e toroidais. Conforme já mencionado na seção 2.4, as soluções para o potencial eletrostático para um modelo de poro de geometria toroidal são de tamanha complexidade que, mesmo em um supercomputador, não foi possível determinar a condutância do canal utilizando dinâmica browniana [53, 52].

Já para geometria cilíndrica, até recentemente, somente uma solução da equação de Poisson era conhecida: para um cilindro infinitamente longo [51, 31, 32]. A obtenção por Levin [30] de uma nova solução analítica para a equação de Poisson em cilindros finitos abriu novas portas para o estudo de canais iônicos com DB e o simulador desenvolvido neste trabalho é baseado nela. A seguir, revisamos a obtenção da solução.

Modelamos a membrana celular como uma placa dielétrica uniforme de espessura L localizada entre $z = 0$ e $z = L$, e o canal iônico como sendo um poro cilíndrico de raio a , também de comprimento L , e preenchido por água. Modelamos o eletrólito presente em ambos os lados da membrana por íons pontuais caracterizados pelo comprimento inverso de Debye κ . As constantes dielétricas da água e da membrana são $\epsilon_w = 80$ e $\epsilon_p = 2$, respectivamente. Conforme o usual, não é feita distinção entre a constante dielétrica da água dentro e fora do poro [29]. A geometria do problema está esquematizada na figura 2.1.

Por conveniência, escolhemos a origem do nosso sistema de coordenadas cilíndricas no eixo de simetria do poro, em um de seus extremos. Para calcular a função de Green do problema, consideramos a existência de um íon pontual localizado em uma posição arbitrária \mathbf{x}' dentro do canal. O potencial eletrostático $\varphi(z, \rho, \phi; \mathbf{x}')$, então, obedece a equação:

$$\nabla^2 \varphi = -\frac{4\pi q}{\epsilon_w} \delta(\mathbf{x} - \mathbf{x}'), \quad (2.16)$$

na região interna ao canal. Nas regiões $z < 0$ e $z > L$, $\varphi(\mathbf{x}; \mathbf{x}')$ satisfaz a equação de

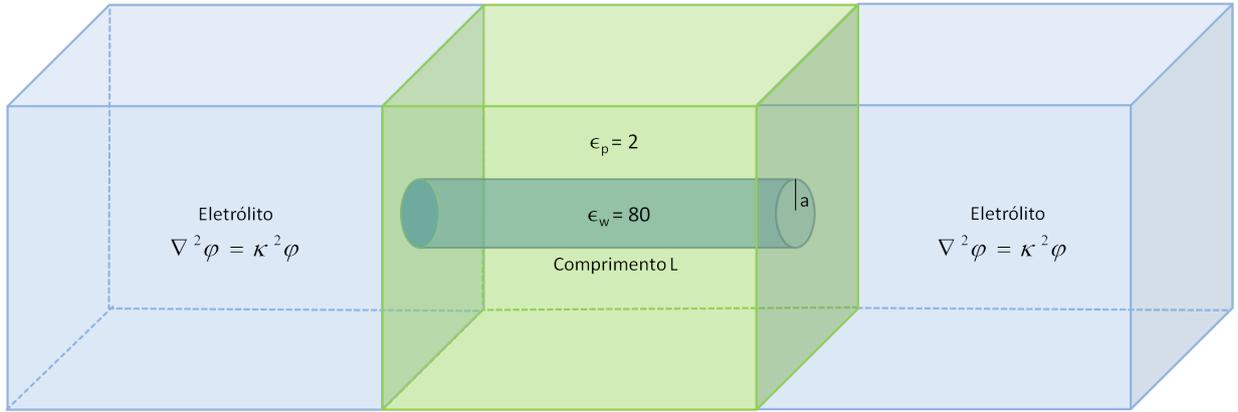


Fig. 2.1: Geometria do modelo de canal iônico proposto neste trabalho. O canal é um poro cilíndrico de raio a , comprimento L e constante dielétrica $\epsilon_w = 80$ envolto por uma membrana de constante dielétrica $\epsilon_p = 2$. Os eletrólitos em cada reservatório são pensados como constituídos por íons pontuais, com o potencial sendo dado pela equação de Debye-Hückel.

Poisson-Boltzmann linearizada, também conhecida como equação de Debye-Hückel [34]:

$$\nabla^2 \varphi = \kappa^2 \varphi \quad (2.17)$$

Notamos que o comprimento inverso de Debye está relacionado com a força iônica do eletrólito através de $\kappa = \sqrt{8\pi\lambda_B I}$, onde $\lambda_B = q^2/\epsilon k_B T$ é o comprimento de Bjerrum e $I = (\alpha^2 c_\alpha + \alpha c_\alpha + 2c)/2$. Por c_α referimo-nos a concentração de eletrólito de valência $\alpha : 1$ e, por c , à concentração de eletrólito $1 : 1$.

As condições de contorno do problema são as tradicionais: o potencial vai a zero no infinito e é contínuo ao longo de todas as interfaces; a componente tangencial do campo elétrico e a componente normal do deslocamento elétrico são contínuas ao longo de todas as interfaces. Nestas condições, temos garantidas a existência e a unicidade da solução do problema. No entanto, não é possível resolver o problema exatamente, mesmo nessa geometria simples. A estratégia de Levin [30] para obter uma solução analítica foi a de resolver uma versão mais simples do problema e, depois, estender a solução.

O primeiro passo é perceber que, no limite no qual $\kappa \rightarrow \infty$, é possível obter uma solução exata. Notamos que esse limite corresponde ao comprimento de Debye ser nulo, o que significa que o eletrólito blinda perfeitamente qualquer campo elétrico. Como uma condição de contorno exige que o potencial seja zero no infinito, nesse limite o potencial

tem de ser zero em todo eletrólito, inclusive nas extremidades do canal. Ou seja, temos que:

$$\varphi(0, \rho, \phi; \mathbf{x}') = \varphi(L, \rho, \phi; \mathbf{x}'), \quad (2.18)$$

para qualquer posição \mathbf{x}' do íon dentro do poro. Com isso, o problema é imensamente simplificado, pois não é mais necessário resolver a equação de Debye-Hückel, mas somente a equação de Poisson com as condições de contorno de um condutor perfeito em $z = 0$ e $z = L$. Nesse caso, a equação de Poisson é separável e podemos utilizar os métodos tradicionais para atacar o problema [50], utilizando coordenadas cilíndricas (ρ, ϕ, z) .

Primeiramente, analisamos a equação para a coordenada z :

$$\frac{d^2\psi_n}{dz^2} + k_n^2\psi_n = 0, \quad (2.19)$$

sujeita às condições de contorno. As autofunções normalizadas são:

$$\psi_n(z) = \sqrt{\frac{2}{L}} \text{sen}(k_n z), \quad (2.20)$$

onde $k_n = n\pi/L$. Como o lado esquerdo da equação 2.19 é um operador de Sturm-Liouville, sabemos que:

$$\delta(z - z') = \frac{2}{L} \sum_{n=1}^{\infty} \text{sen}(k_n z) \text{sen}(k_n z') \quad (2.21)$$

Do operador de Sturm-Liouville resultante da equação em ϕ , temos que:

$$\delta(\phi - \phi') = \frac{1}{2\pi} \sum_{m=-\infty}^{\infty} e^{im(\phi - \phi')}. \quad (2.22)$$

Portanto, podemos escrever:

$$\varphi(\mathbf{x}; \mathbf{x}') = \frac{q}{\pi\epsilon_w L} \sum_{n=1}^{\infty} \sum_{m=-\infty}^{\infty} e^{im(\phi - \phi')} \text{sen}(k_n z) \text{sen}(k_n z') g_{nm}(\rho, \rho'), \quad (2.23)$$

onde $g_{nm}(\rho, \rho')$ é a função de Green do problema. Substituindo a última equação na equação 2.16, vemos que $g_{nm}(\rho, \rho')$ obedece a equação de Bessel modificada:

$$\frac{1}{\rho} \frac{d}{d\rho} \left(\rho \frac{dg_{nm}}{d\rho} \right) - \left(k_n^2 + \frac{m^2}{\rho^2} \right) g_{nm} = -\frac{4\pi}{\rho} \delta(\rho - \rho'), \quad (2.24)$$

as soluções da qual são bem conhecidas [50]. Sejam I_m , K_m , I'_m e K'_m as funções modificadas de Bessel da primeira e da segunda espécie, respectivamente. Sejam também:

$$\gamma_{mn} = \frac{K_m(k_n a) K'_m(k_n a) (\epsilon_p - \epsilon_w)}{\epsilon_w I'_m(k_n a) K_m(k_n a) - \epsilon_p I_m(k_n a) K'_m(k_n a)}, \quad (2.25)$$

e $\rho_>$ e $\rho_<$ o maior e o menor do conjunto (ρ, ρ') . Temos, então, para $\rho_> \leq a$:

$$g_{mn}(\rho, \rho') = 4\pi I_m(k_n \rho_<)[K_m(k_n \rho_>) + \gamma_{mn} I_m(k_n \rho_>)], \quad (2.26)$$

enquanto para $\rho > a$ temos que:

$$g_{nm}(\rho, \rho') = \frac{4\pi\epsilon_w}{k_n a} \frac{K_m(k_n \rho) I_m(k_n \rho')}{\epsilon_w I'_m(k_n a) - \epsilon_p I_m(k_n a) K'_m(k_n a)}. \quad (2.27)$$

Com isso, temos a solução para o problema simplificado no qual o comprimento de Debye é nulo. As equações 2.23, 2.26 e 2.27 são exatas para um íon dentro do poro. Como nosso interesse é em canais iônicos, onde frequentemente a geometria do problema impede que os íons se afastem muito do centro do poro, notamos que há uma grande simplificação caso o íon esteja sobre o eixo de simetria do canal, ou seja, $\rho' = 0$. Nesse caso, somente o termo $m = 0$ da equação 2.23 sobrevive e podemos escrever o potencial eletrostático na região interna ao poro como $\varphi_{in}(z, \rho; z_0) = \varphi_1(z, \rho; z_0) + \varphi_2(z, \rho; z_0)$, onde:

$$\varphi_1(z, \rho; z_0) = \frac{4q}{\epsilon_w L} \sum_{n=1}^{\infty} \text{sen}(k_n z) \text{sen}(k_n z_0) K_0(k_n \rho), \quad (2.28)$$

$$\varphi_2(z, \rho; z_0) = \frac{4q(\epsilon_w - \epsilon_p)}{\epsilon_w L} \sum_{n=1}^{\infty} \frac{K_0(k_n a) K_1(k_n a) I_0(k_n \rho) \text{sen}(k_n z) \text{sen}(k_n z_0)}{\epsilon_w I_1(k_n a) K_0(k_n a) + \epsilon_p I_0(k_n a) K_1(k_n a)}, \quad (2.29)$$

e z_0 é a posição do íon no canal.

De posse das equações 2.28 e 2.29, vamos agora extendê-las para valores não nulos do comprimento de Debye. Para tal, consideremos o significado físico de cada uma delas.

Reconhecemos que a equação 2.28 contém a contribuição do íon localizado em z_0 e das cargas induzidas nas interfaces água-eletrólito e membrana-eletrólito. De fato, notamos que ela é exatamente igual ao potencial produzido por uma carga q em uma placa dielétrica infinita de espessura L , limitada por dois planos de condutores perfeitos [50]. Isso nos permite somar explicitamente a série. No entanto, é possível ir além e construir o potencial $\varphi_1(z, \rho; z_0)$ que satisfaz exatamente a condição de contorno original, no caso, satisfazer a equação de Debye-Hückel 2.17 para $z < 0$ e para $z > L$. Utilizando o método de Levin e Flores-Mena [80] e observando as condições de simetria necessárias entre pontos de fonte e observação [50], representamos a delta de Dirac através da função de Bessel J e obtemos:

$$\varphi_1(z, \rho; z_0) = \frac{q}{\epsilon_w} \int_0^{\infty} dk \frac{J_0(k\rho) \{ \alpha^2(k) e^{k|z-z_0|-2kL} + \alpha(k)\beta(k) [e^{-k(z+z_0)} + e^{k(z+z_0)-2kL}] + \beta^2(k) e^{-k|z-z_0|} \}}{\beta^2(k) - \alpha^2(k) e^{-2kL}}, \quad (2.30)$$

onde:

$$\alpha(k) = \frac{k - \sqrt{k^2 + \kappa^2}}{2k}, \quad (2.31)$$

$$\beta(k) = \frac{k + \sqrt{k^2 + \kappa^2}}{2k}, \quad (2.32)$$

e $J_0(x)$ é a função de Bessel da primeira espécie de ordem zero. A equação 2.30 é uma continuação analítica da equação 2.28 para valores finitos de κ , sendo exatamente igual a esta no limite no qual $\kappa \rightarrow \infty$.

A equação para $\varphi_2(z, \rho; z_0)$ 2.29, por sua vez, contém principalmente contribuições das cargas induzidas na interface água-membrana, interna ao canal. Portanto, o valor exato do comprimento de Debye dos eletrólitos externos não deve alterar significativamente o valor de $\varphi_2(z, \rho; z_0)$. De fato, Levin [30] compara os resultados das equações 2.30 e 2.29 com soluções numéricas reportadas na literatura e constata ótimo acordo entre elas. Por fim, na região $\rho > a$ o potencial é:

$$\varphi_{out}(z, \rho; z_0) = \frac{4q}{L} \sum_{n=1}^{\infty} \frac{1}{k_n a} \frac{K_0(k_n \rho) \text{sen}(k_n z) \text{sen}(k_n z_0)}{\epsilon_w I_1(k_n a) K_0(k_n a) + \epsilon_p I_0(k_n a) K_1(k_n a)}, \quad (2.33)$$

que também é exata somente no limite de comprimento de Debye nulo. Para canais iônicos, no entanto, o grande salto de constante dielétrica do interior da membrana para o eletrólito implica que $\varphi_{out}(z, \rho; z_0)$ será pouco diferente para valores finitos de κ .

As interações entre íons e canal nas simulações realizadas neste trabalho tem como base a solução analítica acima apresentada. Para sua implementação prática, notamos que a força sentida pelo íon i devida à sua interação com os demais íons é igual ao negativo do gradiente da energia de interação, que é dada por:

$$V = \frac{1}{2} \sum_{i,j}^n q_i \varphi^j, \quad (2.34)$$

com $\varphi^j = \varphi_1^j + \varphi_2^j$ sendo o potencial eletrostático produzido pelo íon j na posição do íon ou resíduo i . Para calcular a força sentida pelo íon i , notamos que somente dois termos da equação 2.34 são função das coordenadas i , em relação às quais tomamos o gradiente, e que eles são iguais, cancelando assim o fator de 1/2. Notamos também que para o nosso modelo unidimensional, sempre temos que $\rho = 0$ e que $I_0(0) = J_0(0) = 1$. Tomando o gradiente, temos que a força sentida pelo íon i em virtude de sua interação com o íon j é:

$$F_i^{int} = F_i^{\varphi_1} + F_i^{\varphi_2}, \quad (2.35)$$

com:

$$F_i^{\varphi 1} = -\frac{q_i q_j \lambda_B}{|q_i q_j|} \int_0^\infty k \frac{\frac{z_i - z_j}{|z_i - z_j|} \left(\alpha^2 e^{k|z_i - z_j| - 2kL} - \beta^2 e^{-k|z_i - z_j|} \right) + \alpha\beta \left(e^{k(z_i + z_j) - 2kL} - e^{-k(z_i + z_j)} \right)}{\beta^2 - \alpha^2 e^{-2kL}} dk \quad (2.36)$$

e:

$$F_i^{\varphi 2} = -\frac{q_i q_j}{|q_i q_j|} \frac{4\lambda_B(\epsilon_w - \epsilon_p)}{L} \sum_{n=1}^\infty \frac{k_n K_0(k_n a) K_1(k_n a) \cos(k_n z_i) \text{sen}(k_n z_j)}{\epsilon_w I_1(k_n a) K_0(k_n a) + \epsilon_p I_0(k_n a) K_1(k_n a)}, \quad (2.37)$$

lembrando que α e β são funções de k , definidas nas equações 2.31 e 2.32. Com as equações 2.36 e 2.37 podemos calcular a força sentida por um íon decorrente de sua interação com os demais íons presentes no canal. Um íon sozinho no canal, no entanto, também está sujeito a forças eletrostáticas de outras duas origens: a sua interação com resíduos de carga presentes na membrana celular e a sua interação com as cargas de polarização induzidas por ele na interface água-membrana.

Para calcular a força sentida pelo íon por sua interação com um resíduo, podemos utilizar a equação 2.33, que dá o potencial eletrostático na região interna da membrana. Com ela, podemos calcular a força que o resíduo sente pela interação com o íon e, utilizando a terceira lei de Newton, obter a força sentida pelo íon. Chegamos a expressão:

$$F_i^{res} = -\frac{q_r}{|q_r|} \frac{4\epsilon_w \lambda_B}{aL} \sum_{n=1}^\infty \frac{K_0(k_n \rho_r) \text{sen}(k_n z_r) \cos(k_n z)}{\epsilon_w I_1(k_n a) K_0(k_n a) + \epsilon_p I_0(k_n a) K_1(k_n a)}, \quad (2.38)$$

onde q_r , z_r e ρ_r são a carga e as coordenadas do resíduo, respectivamente.

Para calcular a força sentida pelo íon decorrente das cargas de polarização induzidas por ele conforme ele se move pelo canal, percebemos que a energia potencial eletrostática do íon pode ser escrita como [34]:

$$U(z) = \frac{q}{2} \lim_{\rho \rightarrow 0} \left(\varphi(z, \rho; z) - \frac{q}{\epsilon_w \rho} \right) + \frac{q^2 \kappa}{2\epsilon_w}, \quad (2.39)$$

que basicamente consiste em calcular o potencial na posição onde o íon se encontra, subtraindo a divergência decorrente da presença do mesmo nesse ponto. O último termo na equação 2.39 é a energia de “solvatação” eletrostática que um íon pontual perde ao passar do eletrólito para o interior de um poro. Essa energia pode ser calculada pela teoria de Debye-Hückel e corresponde ao excesso de potencial químico resultante da blindagem do campo elétrico iônico pelo eletrólito [34]. Para resolver o limite na equação 2.39, notamos que:

$$\frac{1}{\rho} = \int_0^\infty J_0(k\rho) dk \quad (2.40)$$

e substituímos 2.40 na equação 2.39. Chegamos então na seguinte expressão para a auto-barreira:

$$\begin{aligned}
 U(z) &= \frac{q^2}{2\epsilon_w} \int_0^\infty dk \frac{2\alpha^2(k)e^{-2kL} + \alpha(k)\beta(k)(e^{-2kz} + e^{2k(z-L)})}{\beta^2(k) - \alpha^2(k)e^{-2kL}} \\
 &+ \frac{2q^2(\epsilon_w - \epsilon_p)}{\epsilon_w L} \sum_{n=1}^\infty \frac{\text{sen}^2(k_n z) K_0(k_n a) K_1(k_n a)}{\epsilon_w I_1(k_n a) K_0(k_n a) + \epsilon_p I_0(k_n a) K_1(k_n a)} + \frac{q^2 \kappa}{2\epsilon_w}. \quad (2.41)
 \end{aligned}$$

A força sentida pelo íon devida a ela, então, é:

$$\begin{aligned}
 F_i^{autob} &= \frac{q^2}{\epsilon_w} \int_0^\infty dk \frac{k\alpha(k)\beta(k)(e^{2k(z-L)} - e^{-2kz})}{\beta^2(k) - \alpha^2(k)e^{-2kL}} \\
 &+ \frac{4q^2(\epsilon_w - \epsilon_p)}{\epsilon_w L} \sum_{n=1}^\infty \frac{k_n K_0(k_n a) K_1(k_n a) \text{sen}(k_n z) \cos(k_n z)}{\epsilon_w I_1(k_n a) K_0(k_n a) + \epsilon_p I_0(k_n a) K_1(k_n a)}. \quad (2.42)
 \end{aligned}$$

No próximo capítulo, serão apresentados e discutidos os resultados de um modelo unidimensional de canal iônico desenvolvido utilizando a técnica de DB e com as interações calculadas segundo a teoria apresentada nesta seção. Embora as equações eletrostáticas utilizadas sejam exatas somente no limite de grandes concentrações iônicas, Levin [30] mostra que elas são válidas mesmo para concentrações intermediárias e baixas.

Apesar de sua aparente complexidade, as equações são imensamente mais simples do que as soluções analíticas disponíveis para geometrias toroidais [33, 52] e certamente trazem ganho computacional frente a resolver numericamente a equação de Poisson a cada passo do programa.

Capítulo 3

Simulações

3.1 Introdução

Neste capítulo, são apresentados e discutidos o modelo de canal a ser estudado e os resultados obtidos. Resumidamente, o canal iônico é modelado através da técnica de dinâmica browniana, sendo pensado como um poro transmembranar cilíndrico. A água e a membrana celular são tratados como meios dielétricos lineares, isotrópicos e homogêneos, de constantes dielétricas $\epsilon_w = 80$ e $\epsilon_p = 2$, respectivamente. Para esta situação, o potencial elétrico foi obtido analiticamente no capítulo anterior e será utilizado nas simulações. Os íons são tratados como partículas pontuais, caracterizados por sua carga, massa e coeficiente de fricção na água.

O movimento dos íons no poro é considerado unidimensional, restrito ao eixo do cilindro e a equação de Langevin é resolvida computacionalmente através do algoritmo de terceira ordem de van Gunsteren e Berendsen [6]. Na seção 3.2, deduzimos um mecanismo de entrada para os íons no poro que não requer a simulação de reservatórios eletrolíticos. Na sequência, testamos o simulador e, então, discutimos os resultados de alguns estudos de caso sob diferentes condições, comparando os resultados com a literatura.

3.2 Tempo de Injeção

A escolha de trabalhar com um modelo unidimensional de canal implica que a entrada dos íons no mesmo não pode ser simulada explicitamente; é preciso estabelecer um critério para o acesso dos íons ao poro. Nossa abordagem para tal problema é estabelecer um “tempo

de injeção” dos íons em solução no canal, o qual utilizaremos para estipular a frequência com a qual íons entram dos reservatórios para o canal. Com essa simplificação, evitamos a necessidade de simular explicitamente a dinâmica do reservatório, o que representa um grande ganho computacional.

A fim de obter o tempo de injeção, tomaremos como base estudos sobre o tempo de efusão, que é, basicamente, o tempo de esvaziamento de uma vesícula a partir do momento que um poro é aberto em sua parede. Uma vez analisado o tempo de efusão de uma vesícula cilíndrica com um poro circular em uma das tampas, podemos tomar o limite de um cilindro infinito e chegar ao tempo de injeção. Vamos considerar a aproximação de partículas não interagentes dentro da vesícula, caso para o qual o problema já foi muito bem estudado na literatura [26, 27]. Sabe-se que, com a abertura da vesícula, o número de partículas dentro dela decai exponencialmente:

$$N(t) = N_0 e^{-t/\tau}, \quad (3.1)$$

onde N_0 é o número total de partículas na vesícula quando o poro na parede da mesma é aberto. Caso o raio do poro seja muito pequeno em relação às dimensões da vesícula, o tempo característico do decaimento é [26]:

$$\tau = \left(\frac{\pi^2}{32AP} \right)^{1/3} \frac{V}{D}, \quad (3.2)$$

onde A e P são a área e o perímetro do poro, respectivamente, V é o volume da vesícula e D é o coeficiente de difusão das partículas. Para o modelo de entrada dos íons no canal iônico, imaginamos uma vesícula muito grande com um poro circular e gostaríamos de calcular o tempo de injeção das partículas da vesícula no poro. Por definição, o tempo de injeção é o tempo para o qual uma partícula deixa a vesícula pelo poro. Utilizando essa condição e a função $N(t)$, temos que $N(0) - N(\tau_b) = 1$. Portanto:

$$N_0(1 - e^{\tau_i/\tau}) = 1, \quad (3.3)$$

de modo que:

$$\tau_i = -\tau \ln(1 - N_0^{-1}). \quad (3.4)$$

Tomamos agora o limite termodinâmico, no qual a vesícula passa a ser um reservatório e expandimos o logaritmo natural da equação anterior em série de Taylor:

$$\ln(1 - x) = -x - \frac{x^2}{2} - \frac{x^3}{3} - \dots, -1 \leq x < 1. \quad (3.5)$$

No nosso caso, $x = 1/N_0$ e, portanto, está sempre dentro do limite de convergência da série. Como estamos no limite termodinâmico, $N_0 \gg 1$, de modo que podemos desprezar todos os termos de ordem maior que um na série de Taylor. Ficamos então, com:

$$\tau_i = \tau/N_0. \quad (3.6)$$

Finalmente, utilizamos a expressão para τ na geometria cilíndrica com um poro circular de raio a , de forma que $A = \pi a^2$ e $P = 2\pi a$, obtendo:

$$\tau_i = \frac{1}{4Da} \frac{V}{N_0} = \frac{1}{4Dac}, \quad (3.7)$$

onde $c = N_0/V$ é a concentração das partículas no reservatório. Ressaltamos que não estamos levando em conta aqui a dependência da constante de difusão dos íons com a concentração, sendo D o valor de *bulk* para cada íon.

Para a simulação da dinâmica dos íons, a expressão acima foi utilizada da seguinte forma. Sempre que um tempo equivalente a τ_i se passa na simulação, um novo íon é colocado na extremidade correspondente do canal. A velocidade inicial dos mesmos sempre aponta para dentro do canal, sendo tomada como o módulo de um número sorteado de uma distribuição gaussiana de média zero e largura $\sqrt{k_B T/m}$. Para cada cenário simulado, há no mínimo dois tempos de injeção, em princípio distintos, correspondendo aos íons de cada espécie nos reservatórios à esquerda e à direita do canal. O simulador inicia com um íon sendo colocado no canal no primeiro passo, enquanto os íons das demais espécies começam a ser colocados no canal a partir de uma fração do seu tempo de injeção.

3.3 Testes da simulação

Sabe-se que o processo de ultrapassagem de barreiras de energia é caracterizado pelo tempo de passagem crescendo exponencialmente com a altura da barreira a ser superada, fato conhecido como lei de Arrhenius. A fim de testar a validade do algoritmo de dinâmica browniana implementado, foi estudada a seguinte variação do simulador.

Ao invés de simular um canal com reservatórios em ambos os lados, modelando a entrada com um tempo de injeção, foi considerado um canal de comprimento 20\AA com uma extremidade refletora fechada e com a outra permitindo somente a saída de íons. No

início da simulação, um íon em repouso é colocado na extremidade fechada, sem quaisquer outras cargas no sistema. Com isso, o potencial sentido por este íon ao longo do canal é uma barreira, decorrente das cargas de polarização induzidas na interface entre a água e a proteína. Como o movimento do íon é restrito ao eixo do canal, podemos utilizar o artifício de alterar o raio do canal, obtendo como única diferença no simulador a variação da altura da barreira de potencial.

Assim, foi simulada a dinâmica do íon para barreiras de diferentes alturas, calculando, para cada uma, o tempo médio de saída do íon pela extremidade oposta. Os resultados obtidos são apresentados na figura 3.1, que contém o tempo médio de primeira passagem para várias alturas de barreira e um ajuste exponencial do tipo $y = y_0 + Ae^{Rx}$. A concordância entre a exponencial ajustada e os dados do simulador indicam que o algoritmo de dinâmica browniana foi corretamente implementado.

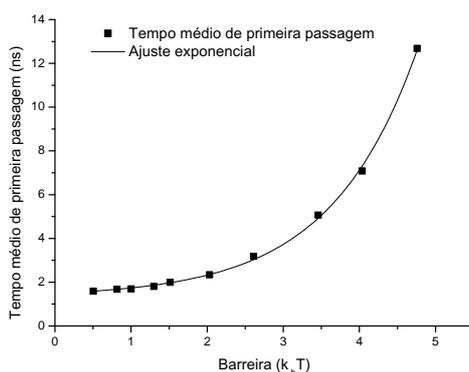


Fig. 3.1: Tempo médio de primeira passagem em um canal de comprimento 20 \AA com a extremidade na qual o íon inicia o seu movimento fechada. A barreira de potencial é variada através da alteração do raio do canal, o que não altera a dinâmica de outras formas pois o movimento é restrito ao eixo do canal. O ótimo ajuste de uma exponencial aos dados obtidos comprova a obediência à lei de Arrhenius.

3.4 Canal permeável a íons de K^+

O primeiro estudo que apresentamos é para um canal permeável somente a cátions, baseado no poro formado pelo antibiótico gramicidina A (gA) em membranas celulares. O

canal gA, conforme já mencionado na seção 1.1, possui um papel importante na história da pesquisa de canais iônicos, sendo o poro modelo melhor estudado. Logo após o desenvolvimento de formas práticas de fabricar membranas lipídicas planares em laboratório, se descobriu que várias substâncias antibióticas e outras moléculas tornavam as membranas permeáveis a íons [5]. Gradualmente, se mostrou que algumas dessas substâncias se comportavam como carreadoras e, outras, como poros (gA, por exemplo), eventualmente confirmando a hipótese da existência de poros moleculares em membranas biológicas. Desse processo, resultou que o canal gA foi o melhor caracterizado e estudado.

O canal de gA é um pentadecapeptídeo com uma sequência alternada de aminoácidos L e D que forma um poro aquoso aproximadamente cilíndrico, com os detalhes da sua estrutura sendo bem conhecidos. Os poros de gA conduzem cátions monovalentes, ligam cátions bivalentes e rejeitam todos os ânions. Em virtude de seu formato aproximadamente cilíndrico e da grande disponibilidade de dados experimentais e de simulações, trata-se de um poro adequado para testarmos o modelo simples que apresentamos aqui.

Na nossa simulação, consideramos um poro de comprimento $L = 35 \text{ \AA}$ e raio $a = 3 \text{ \AA}$. A entrada de íons no poro é governada pela equação 3.7, de acordo com a concentração dos íons em cada lado do poro. As forças de interação dos íons com o canal e entre si são calculadas pelas equações 2.36, 2.37, 2.38 e 2.42. Além disso, um potencial truncado Weeks-Chandler-Andersen de Lennard-Jones (WCA-LJ) foi utilizado para interações de curto alcance entre os íons:

$$U_{ij}^{WCA}(r) = \begin{cases} U_{LJ}(r) - U_{LJ}(r_c) & \text{se } r \leq r_c \\ 0 & \text{se } r > r_c, \end{cases} \quad (3.8)$$

onde $U_{LJ}(r)$ é o potencial de Lennard-Jones usual, definido por:

$$U_{LJ}(r) = 4\epsilon \left[\left(\frac{\sigma}{r} \right)^{12} - \left(\frac{\sigma}{r} \right)^6 \right]. \quad (3.9)$$

Utilizamos os valores $\epsilon = 1k_B T$, $\sigma = 2 \text{ \AA}$ e $r_c = 2^{1/6}\sigma$, também utilizados no trabalho [4], com o qual compararemos os resultados do modelo. Naquele trabalho, é estudado um modelo de canal cilíndrico tridimensional utilizando dinâmica molecular grande canônica com dois volumes de controle e somas de Ewald. Quando dentro do canal, a dinâmica dos íons é simulada resolvendo a equação de Langevin através do algoritmo *velocity Verlet*,

ao passo que o modelo aqui apresentado restringe o movimento iônico ao eixo do poro e utiliza um algoritmo de terceira ordem [6] para resolver a equação de Langevin.

Assim como em [4], utilizamos valores diferentes para o coeficiente de fricção dos íons dentro e fora do canal, sendo eles, respectivamente, $\gamma_{fora}^{-1} = 53fs$ e $\gamma_{poro}^{-1} = 53/3fs$, que correspondem a constantes de difusão de $3,37 \times 10^{-9}m^2/s$ e $1,12 \times 10^{-9}m^2/s$. Com isso, os valores de fora do canal foram utilizados para calcular o tempo de injeção, enquanto o valor interno ao canal foi utilizado na simulação do movimento.

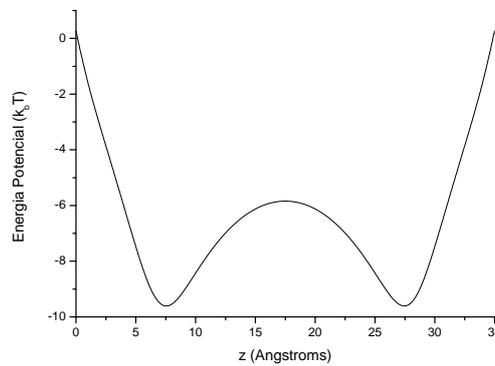


Fig. 3.2: Perfil de energia potencial de um cátion monovalente cruzando o canal modelado nesta seção, considerando concentração externa simétrica de 500 mM.

Para modelar o potencial correspondente ao poro gA utilizando esse modelo [29], é preciso acrescentar dois anéis negativamente carregados na interface água-membrana interna, posicionados em $z = 7\text{Å}$ e $z = 28\text{Å}$ cada um com carga elementar [4, 29]. O perfil de energia potencial de um cátion nesse canal é mostrado na figura 3.2. A presença de resíduos de carga negativa próximos aos extremos do canal justifica a simplificação de simularmos o mesmo como somente acessível a cátions.

Como primeiro estudo, apresentamos a curva de corrente contra tensão aplicada resultante do nosso modelo para dois valores do passo de tempo da simulação. Na figura 3.3, pode-se ver indícios de que, para valores mais altos da tensão aplicada, o passo de tempo maior (50 fs) tende a desviar do resultado obtido pelo trabalho [4], que utiliza passo de tempo de 8 fs. O resultado para passo de tempo de 5 fs, no entanto, apresenta boa concordância com [4].

O resultado obtido da referência [4], por sua vez, apresenta boa concordância com re-

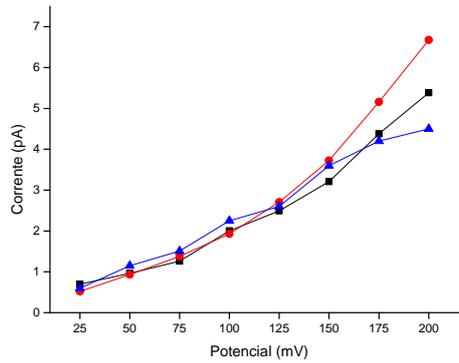


Fig. 3.3: Corrente contra tensão aplicada. Em vermelho, o passo de tempo utilizado foi de 50 fs; em preto, o passo de tempo utilizado foi de 5 fs; o gráfico azul foi extraído da referência [4], que utiliza um passo de 8 fs. Em todos os casos, a concentração de ambos os reservatórios é de 500mM. Cada ponto corresponde a média de 10 simulações independentes, exceto pelas 4 menores tensões com passo de 5 fs, que correspondem a média de 3 simulações independentes.

sultados experimentais e de simulação da referência [29]. No entanto, a própria referência [29] alerta para o fato de que inúmeros modelos de poros são capazes de reproduzir curvas I-V caso o coeficiente de difusão dos íons no canal seja tratado como um parâmetro livre e ajustado adequadamente, mesmo que os modelos tratem as interações íon-canal de forma completamente errada. Na verdade, o sucesso de modelos baseados em PNP para reproduzir curvas I-V experimentais foi utilizado por anos como argumento da validade dos mesmos [1] e somente no início dos anos 2000 foram estabelecidas claramente as limitações e méritos dessa abordagem [2, 3].

O valor do coeficiente de difusão utilizado por [4] não é justificado *a priori*, de modo que para apoiar o seu uso temos somente a constatação de que ele reproduz resultados experimentais. Apesar disso, é muito razoável esperar que a mobilidade dos íons em um ambiente confinado seja significativamente reduzida, e não há um consenso sobre quais valores devam ser utilizados para os diferentes íons. Mesmo assim, não fica claro porque a referência [4] optou pela utilização de uma constante de difusão de $3,37 \times 10^{-9} m^2/s$ para o potássio em *bulk*, quando o valor conhecido [5] é de $1,96 \times 10^{-9} m^2/s$, 42% menor.

Ao contrário das curvas I-V, há um consenso de que as curvas de corrente contra concen-

tração não podem ser trivialmente reproduzidas somente através do ajuste do coeficiente de difusão [1]. Nas figuras 3.4 e 3.5, comparamos os resultados obtidos com o nosso modelo com os resultados apresentados pela referência [4]. Ressaltamos que ambos os reservatórios são mantidos com a concentração listada, de modo que a corrente decorre somente do potencial elétrico aplicado.

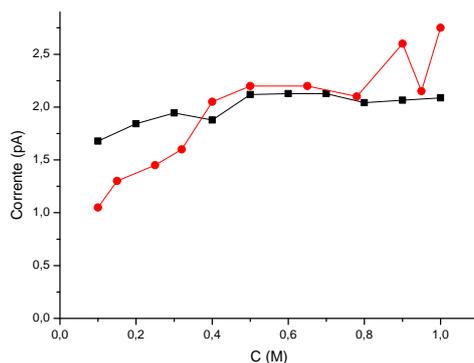


Fig. 3.4: Corrente contra concentração para uma tensão aplicada de 100 mV. Em preto, os resultados obtidos com o nosso modelo, utilizando passo de tempo de 50 fs e, em vermelho, o gráfico da referência [4], que utiliza um passo de 8fs. Embora haja boa concordância na corrente de saturação, nosso modelo falha em prever o decaimento esperado para concentrações menores.

Cada ponto de ambas as figuras foi obtido como a média de 10 simulações independentes, cada uma com duração de $3,6\mu s$. Com essa duração, 30 a 50 íons cruzam o canal em cada simulação com tensão de 100 mV, tipicamente.

Para tensão aplicada de 100 mV, as relações obtidas com um passo de tempo de 50 fs apresentam a saturação esperada, demonstrando acordo inclusive quantitativo para altas concentrações. No entanto, a relação não decresce conforme o esperado para valores pequenos da concentração.

Já para a tensão aplicada de 200 mV, também observamos o comportamento de saturação, mas nossos resultados não estão em acordo quantitativo com os da referência [4], ficando sistematicamente maiores do que o esperado. Esse desacordo pode ser resultado do uso de um passo de tempo maior, que, conforme veremos na seção 3.6, tende a favorecer maiores correntes no nosso modelo.

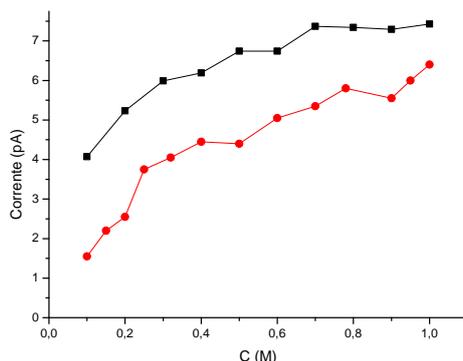


Fig. 3.5: Corrente contra concentração para uma tensão aplicada de 200 mV. Em preto, os resultados obtidos com o nosso modelo, utilizando passo de tempo de 50 fs e, em vermelho, o gráfico da referência [4], que utiliza um passo de 8fs. Notamos que a nossa corrente é sistematicamente maior, apresentando valor de saturação com excesso de aproximadamente 25%.

Ressaltamos que a essência da dinâmica diferente para diferentes concentrações decorre essencialmente do maior número de íons tendo acesso ao poro. Como pode ser visto nas figuras 3.6, 3.7 e 3.8, a variação no potencial sentido por um íon no canal para diferentes concentrações é pequena. A principal diferença está no fato de que, para concentrações menores, a diferença de energia entre as extremidades do canal e o fundo dos poços de potencial é $0,5k_B T$ maior.

3.5 Canal neutro permeável a íons de Na^+ e Cl^-

Nesta seção estudaremos um modelo de canal sem resíduos de carga, o qual pode ser acessado tanto por cátions como por ânions, ao contrário da seção 3.4, na qual foi assumido *a priori* que o canal era inacessível a ânions, em decorrência de seus resíduos de carga negativa. Na ausência de resíduos, o potencial de um único íon no canal independe do sinal de sua carga, visto que é resultado somente da autobarreira gerada pelas cargas de polarização na interface água-membrana. Isso pode ser visto na figura 3.10.

Nosso interesse nesse modelo decorre de sua semelhança com o modelo estudado na referência [3], na qual a condução através de um poro quase cilíndrico é estudada através

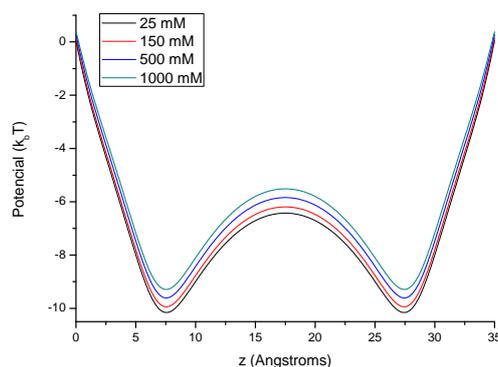


Fig. 3.6: Potencial observado por um íon no modelo de poro da seção 3.4 para diferentes valores da concentração externa ao canal.

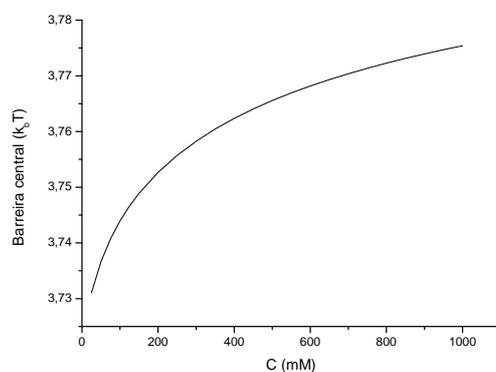


Fig. 3.7: Altura da barreira de potencial do centro do canal em relação ao poço de potencial em $7,5\text{\AA}$ para diferentes concentrações. Nota-se que a variação é muito pequena.

de dinâmica browniana e PNP. Como não dispunham de uma solução analítica para o potencial elétrico dentro do canal, os autores de [3] calculavam as interações através da solução numérica da equação de Poisson, que os levou a arredondar as bordas do cilindro por questões de convergência da solução numérica. A geometria usada por eles é a de um canal de comprimento de 35\AA , cilíndrico nos 25\AA centrais, e arredondado nos 5\AA de cada extremidade. A geometria, ilustrada na figura 3.9, mostra que o raio no início do canal possui 5\AA a mais que o valor na parte cilíndrica, sendo reduzido gradualmente.

Outra diferença importante é o fato de que, em [3], a simulação é tridimensional, com reservatórios cilíndricos cujo raio da base é de 30\AA e cuja altura é variada para manter a concentração do sistema a 300 mM (possuindo o valor de 25\AA para um canal de raio 3\AA).

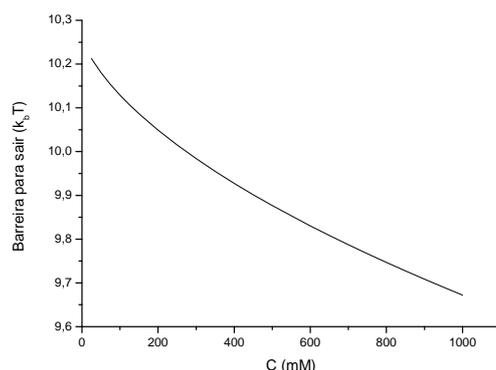


Fig. 3.8: *Altura da barreira de potencial para saída do canal em relação ao poço de potencial em $7,5\text{Å}$ para diferentes concentrações. Nota-se que os íons tem de superar uma barreira levemente maior ao sair do poro para concentrações externas menores.*

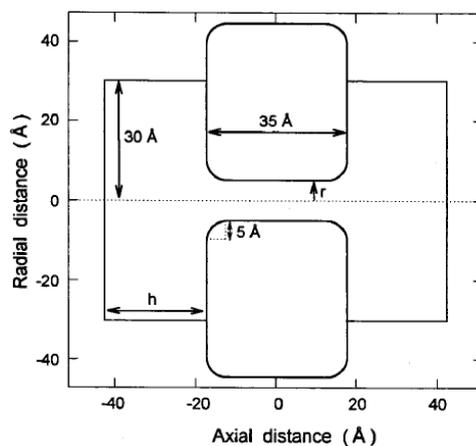


Fig. 3.9: *Geometria do poro estudado nas referências [2] e [3], a partir de [3].*

Para modelar a interação de curto alcance dos íons com a membrana foi utilizado o critério de espalhar elasticamente os íons a partir de uma proximidade de 1Å com a membrana. Decorre disso que, quando nos referirmos ao volume acessível aos íons no canal, devemos lembrar de descontar a região de espalhamento. No entanto, normalmente nos referiremos ao raio do canal incluindo essa região, dado que este é o valor que determinará o potencial eletrostático, que independe de um outro potencial adicionado espalhar os íons quando próximos da interface.

Por fim, a tensão externa é aplicada ao longo de todo o sistema, ou seja, canal mais reservatórios, ao passo que em nosso modelo unidimensional, temos como aplicar a tensão somente ao longo do canal. Enquanto isso favorece a entrada de íons de cargas diferentes

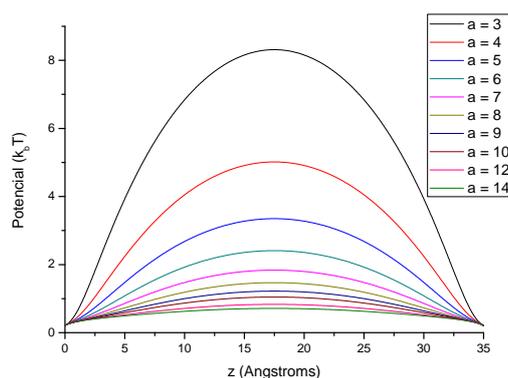


Fig. 3.10: Potencial de um íon ao longo de um canal cilíndrico para raios de 3 Å a 14 Å. O potencial é exatamente igual à autobarreira causada pelas cargas de polarização induzidas na interface água-membrana, sendo independente do sinal da carga do íon.

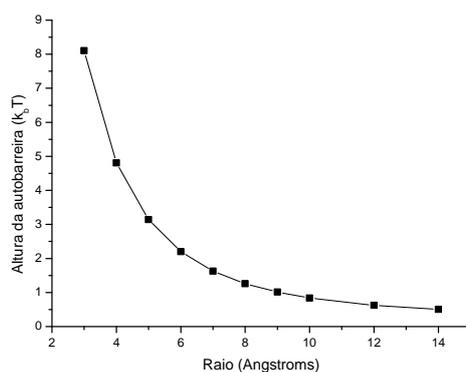


Fig. 3.11: Altura da autobarreira em relação ao extremo do poro cilíndrico em função do raio.

em lados diferentes do canal, o fato da solução ser um eletrólito faz com que os reservatórios se comportem aproximadamente como equipotenciais, fazendo com que a maior parte da queda de potencial ocorra ao longo do canal também no caso dos trabalhos [2] e [3].

O sistema utiliza condições de contorno periódicas, no sentido de que quando um íon atravessa o canal e chega no reservatório ao lado, o íon posicionado mais próximo ao extremo deste reservatório é colocado na extremidade do outro reservatório. O artigo [3] não utiliza somas de Ewald para considerar o aspecto infinito dos reservatórios. No entanto, conforme demonstrado em Bastug *et al.* (2006) [127], isso não deveria causar problemas nesse tipo de simulação.

Os íons colocados no sistema são de sódio e cloreto, sempre a concentração de 300 mM

cada, salvo quando explicitamente mencionado em contrário. Para os parâmetros dos íons, os valores tradicionais de *bulk* foram utilizados (ver tabela 2.1), considerando a mesma constante de difusão tanto dentro como fora do canal.

Como primeiro estudo, realizamos a simulação da corrente em função do raio do canal, permitindo que tanto íons de sódio como de cloreto tenham acesso. Quando sozinhos no canal, os íons encontram as barreiras de potencial da figura 3.10. Como estamos trabalhando com um modelo unidimensional, há dois mecanismos que alteram a condutância ao variarmos o raio. Um deles é a redução da altura da barreira de potencial para raios maiores, ilustrada na figura 3.11. O outro mecanismo é a redução do tempo de injeção com o aumento do raio, conforme pode ser visto na figura 3.12. Em decorrência do modelo ser unidimensional, no entanto, perdemos o aumento da condutância decorrente da maior área da seção transversal para raios maiores.

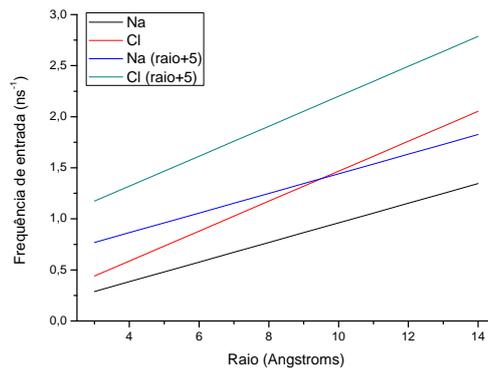


Fig. 3.12: *Frequência de injeção dos íons sódio e cloreto em função do raio do canal, para temperatura de 298 K e concentração de 300 mM. As linhas preta e vermelha consideram o raio nominal, ao passo que as linhas verde e azul consideram o raio da abertura na extremidade.*

Como os raios de Pauling dos íons de sódio e cloreto são, respectivamente, 0,95 Å e 1,81 Å esperamos que nossos resultados sejam comparáveis com os de [3] para raios do canal menores que 5Å (lembrando que a área acessível aos íons naquele trabalho é determinada pelo raio menos 1 Å). De fato, conforme pode ser observado nas figuras 3.14 e 3.13, o nosso modelo gerou resultados similares aos de [3] para poros estreitos. A discrepância para raios grandes cresce mais rapidamente para íons de sódio do que de cloreto, o que era esperado,

dados que o raio deste é praticamente o dobro do daquele.

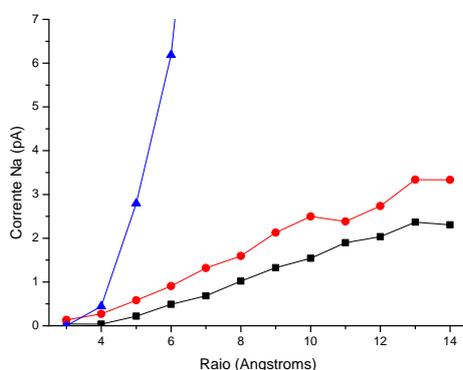


Fig. 3.13: Corrente dos íons de sódio em função do raio do canal. Em preto, o gráfico obtido com o tempo de injeção calculado normalmente; em vermelho, com o tempo de injeção calculado somando 5 \AA ao valor nominal do raio; e, azul, resultados extraídos da figura 7 de [3]. Para raios maiores que 5 \AA notamos que o resultado de [3] diverge rapidamente dos nossos. Todas as simulações utilizaram passo de tempo de 100 fs e cada ponto é a média de 15 simulações independentes.

Além desses fatores, inúmeras outras diferenças entre as simulações contribuem para que o modelo de [3] apresente maiores correntes do que o nosso. Um deles é o fato da diferença de potencial externa ser aplicada ao longo de todo o sistema, não somente ao longo do canal. Isso faz com que o acesso dos íons ao poro seja facilitado em um dos lados e dificultado no outro, favorecendo maiores correntes.

Os outros fatores relevantes decorrem das bordas arredondadas. Um deles é a redução da barreira de potencial encontrada pelos íons. Isso ocorre pois o aumento do raio do poro nas extremidades reduz o confinamento do meio de alta constante dielétrica (no caso, a água) pelo meio de baixa constante dielétrica (a membrana), fato responsável pela barreira [30]. Além disso, os autores de [3] constataram que, com as bordas arredondadas, os íons tendem a passar mais tempo que o esperado nos 5 \AA iniciais do canal a favor da corrente e menos tempo que o esperado nos últimos 5 \AA do canal. Essa acessibilidade preferencial no sentido da corrente para ambos os tipos de íons ajuda a explicar as maiores correntes reportadas por [3].

Aproveitamos esta configuração de canal sem cargas para testar a convergência dos

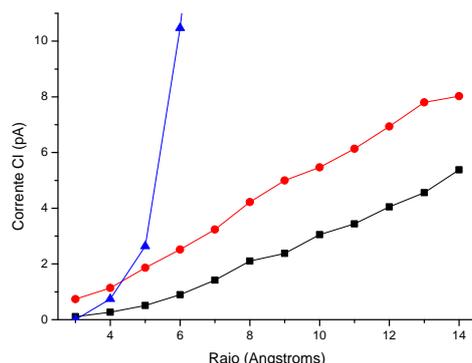


Fig. 3.14: Corrente dos íons de cloreto em função do raio do canal. Em preto, o gráfico obtido com o tempo de injeção calculado normalmente; em vermelho, com o tempo de injeção calculado somando 5 \AA ao valor nominal do raio; e, azul, resultados extraídos da figura 7 de [3]. Para raios maiores que 5 \AA notamos que o resultado de [3] diverge rapidamente dos nossos. Todas as simulações utilizaram passo de tempo de 100 fs e cada ponto é a média de 15 simulações independentes.

resultados para diferentes passos de tempo do simulador. As figuras 3.15, 3.16 e 3.17 resumem os resultados obtidos. Como estamos trabalhando com a concentração relativamente pequena de 300 mM e o potencial elétrico para um íon tem a forma de uma barreira (ver figura 3.10), espera-se que o canal encontre-se normalmente vazio e que os eventos de condução ocorram quando um íon consegue atravessar a barreira de potencial.

Portanto, embora os longos tempos de simulação, de $3,6 \mu\text{s}$ repetidos em 20 simulações independentes, ainda é esperado um ruído estatístico alto. As correntes para o sódio são menores que para o cloreto, dada a constante de difusão aproximadamente 50% maior deste. De acordo com esse fato, encontramos correntes maiores para o cloreto.

Investigamos também a ocupação do poro em função do raio, para os diferentes valores do passo de tempo. Por ocupação, referimo-nos a soma do número de íons no canal em cada passo, efetuada sobre todos os passos de tempo, dividida pelo número total de passos. Isso significa que se em cada passo da simulação houver dois íons dentro do poro, então a ocupação será 2; e se em metade dos passos o canal estiver vazio e, na outra metade, estiver ocupado por um íon, a ocupação será 0,5.

Com isso, obtivemos a figura 3.17. O comportamento semelhante dela para diferentes

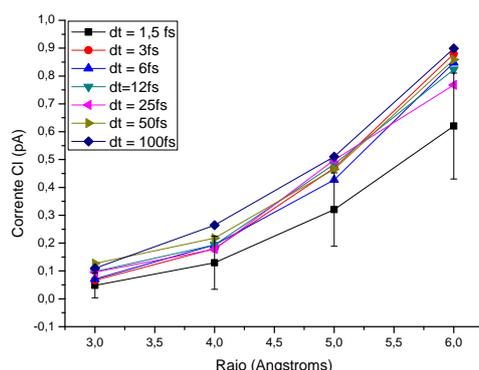


Fig. 3.15: Corrente dos íons de cloreto em função do raio para diferentes valores do passo de tempo. Cada ponto corresponde a média de 20 simulações independentes, a barra de erro possui comprimento de um desvio padrão para cima, e um para baixo. Notamos que há boa convergência desde os passos maiores.

raios era esperado, visto que somente a altura da barreira de potencial e o número de íons com acesso ao canal mudam com o raio. Da mesma forma, também era esperado que para os diferentes passos de tempo, a ocupação fosse similar, indicando que a dinâmica não é alterada com a variação do passo.

3.6 Canal carregado permeável a íons de Na^+ e Cl^-

Nesta seção, realizamos mais estudos para um canal *a priori* permeável a dois tipos de íons, sódio e cloreto. O poro aqui modelado é idêntico ao da seção 3.5, exceto por possuir dois resíduos de carga negativa de módulo $0,72e$ localizados na interface entre a água e a membrana, em $z = 5 \text{ \AA}$ e em $z = 30 \text{ \AA}$. Assim como ocorreu na seção 3.4, a existência de dois resíduos de carga negativa posicionados próximos às extremidades do poro fez com que o perfil de energia potencial para cátions deixasse de ser uma barreira, passando a ser formado por dois poços separados por uma barreira, como pode ser visto na figura 3.18. Por outro lado, para ânions monovalentes, a colocação de mais cargas negativas dentro do canal tem como efeito ampliar a barreira de potencial, tornando o poro ainda menos permeável a ânions, conforme mostra a figura 3.19.

O primeiro estudo que realizamos é relativo à corrente elétrica das espécies iônicas em

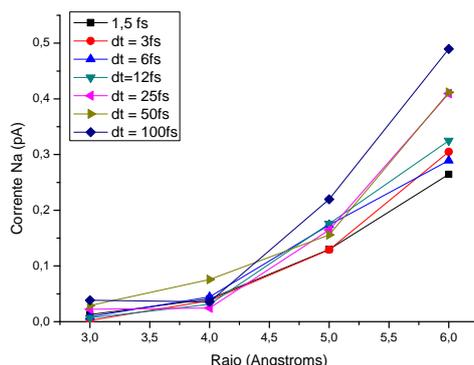


Fig. 3.16: Corrente dos íons de sódio em função do raio para diferentes valores do passo de tempo. Cada ponto corresponde a média de 20 simulações independentes. Como os íons de sódio possuem menor constante de difusão em relação aos de cloreto, os eventos de condução através de uma barreira são mais raros, gerando maior ruído estatístico. Percebe-se uma tendência de menores correntes para menores passos de tempo, especialmente quando as barreiras de potencial são menores (ou seja, os raios são maiores).

função do raio do canal, para uma tensão externa aplicada de 105 mV. Os perfis de energia potencial das figuras 3.18 e 3.19 indicam que, para valores pequenos do raio, somente cátions apresentem condutância significativa. No entanto, conforme o raio do canal cresce, devemos observar condução de ânions também.

De fato, a figura 3.20 mostra o cenário esperado. O fato de que a corrente de cloreto eventualmente supera a de sódio decorre da sua maior constante de difusão. Com isso, íons de cloreto não só tem maior acesso ao canal, em virtude de sua maior frequência de injeção, como também tem maior facilidade de cruzá-lo.

Na figura 3.21, vemos que a ocupação do canal segue uma lógica similar. Para raio de 3 Å, os dois poços de potencial para cátions possuem profundidade de, aproximadamente, $4k_B T$, ao passo que a barreira de potencial para ânions é da ordem de $15k_B T$. Portanto, o canal deve ser ocupado basicamente por cátions. Para raio de 4 Å, a profundidade dos poços de potencial já cai para $2,5k_B T$, enquanto a altura da barreira de potencial para ânions cai para $10k_B T$. A barreira é ainda proibitivamente grande para que ânions ocupem o canal, e os poços mais rasos favorecem uma menor ocupação por cátions, fazendo com

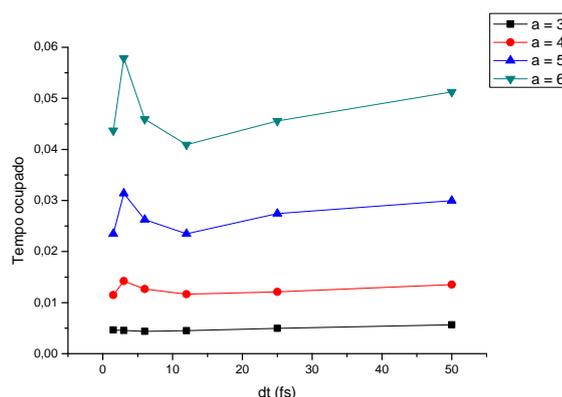


Fig. 3.17: *Fração do tempo total na qual o canal esteve ocupado por um ou mais íons, para os diferentes passos de tempo e quatro valores do raio do canal. Cada ponto é a média de 20 simulações independentes. A ocupação não apresenta grande variação com o passo de tempo, conforme o esperado.*

que a ocupação total caia.

Conforme o raio é aumentado, as barreiras e poços de potencial vão tornando-se cada vez menores, enquanto a frequência de injeção dos íons de ambas as espécies no canal cresce linearmente. O resultado disso é que a ocupação como um todo passa a crescer cada vez mais. Como os valores de ocupação encontram-se entre 5% e 21%, ainda estamos distantes da região de saturação.

Por fim, comparamos as correntes que obtivemos com os resultados de [3]. Assim como ocorreu na seção 3.5, encontramos bom acordo para os menores valores do raio, mas isso é rapidamente perdido conforme o raio é aumentado, pelos mesmos motivos já discutidos. Ao contrário da seção 3.5, as simulações que realizamos para este caso utilizaram o valor nominal do raio para calcular o tempo de injeção, sem somar os 5 \AA presentes na geometria de [3], o que tende a amplificar as diferenças entre as correntes observadas por nós e [3].

Além disso, ressaltamos novamente que os íons de sódio apresentam maior discrepância em virtude de seu raio de Pauling significativamente menor. Isso implica que na simulação tridimensional de [3] os íons tenham acesso a muito mais espaço para trafegar pelo canal quando o raio é maior. De fato, a partir da figura 8 de [3], podemos estimar a ocupação por eles observada como sendo 0,537 para o canal com raio de 4 \AA , valor quase uma ordem de grandeza maior do que a ocupação de 0,063 observada por nós para o canal equivalente.

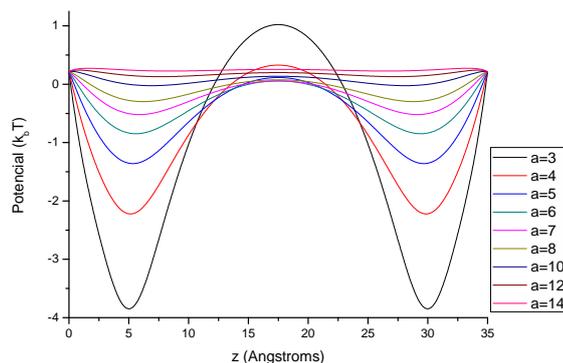


Fig. 3.18: *Potencial de um cátion monovalente no poro modelado na seção 3.6, para diferentes raios do canal. Assim como na seção 3.4, a existência de resíduos negativos de carga criou dois poços de potencial.*

Por fim, realizamos uma simulação para um poro de raio de 4 Å e com os mesmos resíduos, mas adicionando um gradiente de concentração. No reservatório de $z = 0$ Å, a concentração é de 500 mM e, no outro reservatório, é de 100 mM. O potencial de um único cátion ou ânion no canal difere muito pouco das figuras 3.18 e 3.19, respectivamente. Como a solução da equação de Poisson que estamos utilizando pressupõe concentração igual em ambos os lados do poro, utilizamos a concentração média entre os reservatórios, 300 mM, para realizar os cálculos. Foram realizadas simulações desde tensão negativa de 150 mV até tensão positiva de 150 mV, a cada 5 mV. Para cada tensão aplicada, foram realizadas 10 simulações independentes.

Conforme pode ser visto nas figuras 3.24 e 3.25, uma vez levadas em conta às diferenças entre a nossa simulação e a do artigo [3], há um bom acordo qualitativo entre os resultados. Curiosamente, conforme reduzimos o passo de tempo da nossa simulação, constatamos uma redução da magnitude da corrente, bem como uma variação da tensão de corrente nula para valores mais negativos.

A tensão de corrente nula encontrada em [3] tanto para DB como para PNP é o potencial de Nernst, que vale -41 mV nessas condições. No nosso caso, constatamos os valores apresentados na tabela 3.1, sempre mais negativos que o correto, tanto mais quanto menor o passo de tempo. Até o momento, não sabemos a causa disso.

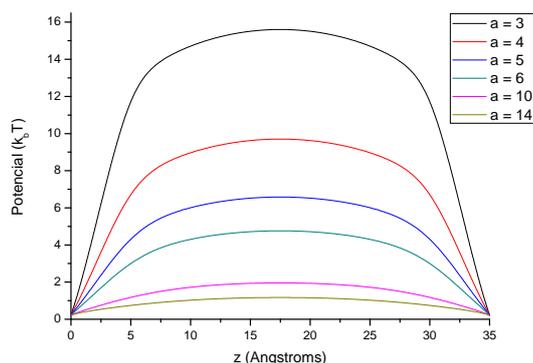


Fig. 3.19: Potencial de um ânion monovalente no poro modelado na seção 3.6, em função do raio do canal. Ao contrário da situação para cátions, a existência de resíduos negativos de carga ampliou a barreira de potencial, tornando os canais mais estreitos completamente impermeáveis a ânions, na prática.

Passo de tempo (fs)	100	50	25	5
Potencial de Nernst (mV)	-60	-65	-70	-104

Tab. 3.1: Potencial de Nernst observado nas simulações para diferentes passos de tempo. O valor esperado para as condições utilizadas era de -41 mV.

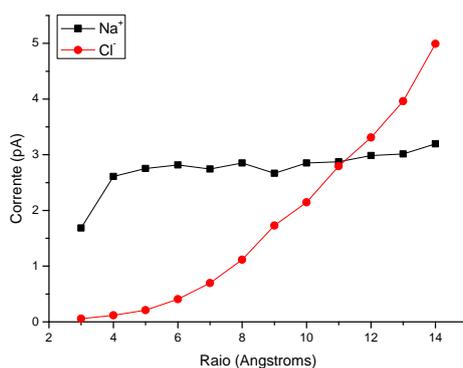


Fig. 3.20: Corrente em função do raio para íons de sódio e de cloreto. Conforme o esperado, o canal é permeável somente a cátions para raios pequenos, com a corrente de ânions aumentando gradualmente. Para raios muito grandes, a corrente de cloreto supera a corrente de sódio em decorrência da maior constante de difusão do cloreto. O passo de tempo utilizado foi de 100 fs.

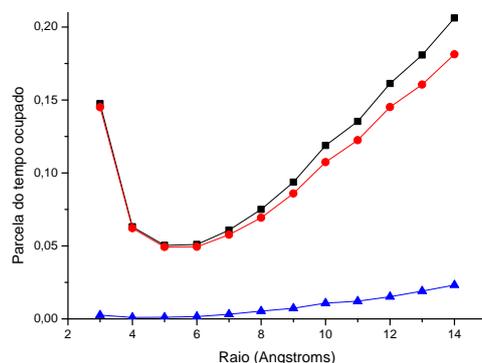


Fig. 3.21: *Em preto, a ocupação do canal. Em vermelho, a fração do tempo na qual o canal esteve ocupado por somente um íon. Em azul, a fração do tempo na qual o canal esteve ocupado por exatamente dois íons. Conforme pode ser visto, a fração de tempo na qual o canal esteve ocupado por três ou mais íons é muito pequena para todos os valores do raio - seu maior valor, que ocorre para raio de 14 Å é de 0,00172. O passo de tempo utilizado foi de 100 fs.*

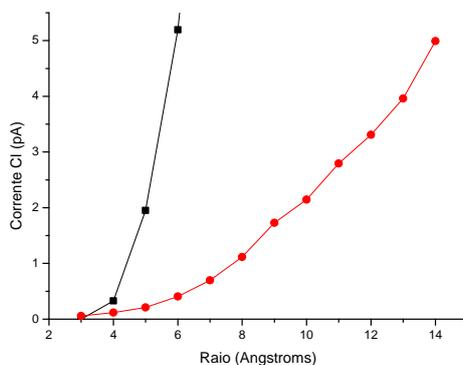


Fig. 3.22: *Corrente de cloreto contra o raio. Em vermelho, os resultados obtidos com o nosso modelo. Em preto, resultados calculados a partir da figura 10 de [3]. Conforme observamos na seção 3.5, há acordo para os menores valores de raio, e ele é perdido rapidamente em virtude das diversas diferenças entre as simulações, discutidas na seção 3.5, todas favorecendo menores correntes para o nosso modelo. O tempo de injeção usado foi calculado utilizando o raio nominal.*

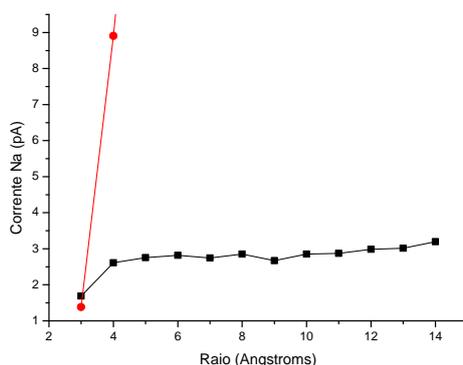


Fig. 3.23: Corrente de sódio contra o raio. Em preto, os resultados obtidos com o nosso modelo. Em vermelho, resultados calculados a partir da figura 10 de [3]. Conforme observamos na seção 3.5, há acordo para o menor valor de raio, e ele é perdido rapidamente em virtude das diversas diferenças entre as simulações, discutidas na seção 3.5, todas favorecendo menores correntes para o nosso modelo. O tempo de injeção usado foi calculado utilizando o raio nominal.

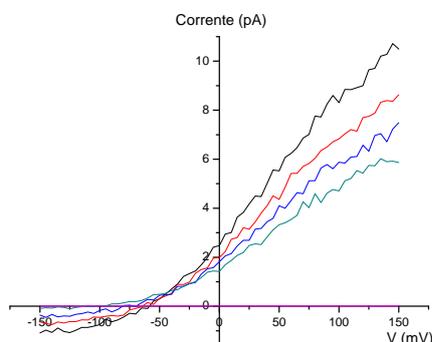


Fig. 3.24: Corrente em função da tensão aplicada para um canal de raio 4 \AA com os resíduos de carga descritos na seção 3.6. O reservatório de $z = 0$ possui concentração de 500 mM , enquanto o outro reservatório possui concentração de 100 mM . Foram realizadas 10 simulações independentes a cada 5 mV de tensão aplicada. As diferentes curvas correspondem a corrente dos íons de sódio para diferentes passos de tempo utilizados. Em preto, 100 fs ; em vermelho, 50 fs ; em azul, 25 fs ; em verde, 5 fs . A curva rosa é a corrente dos íons de cloreto para passo de 5 fs , que é igual a obtida para os demais passos.

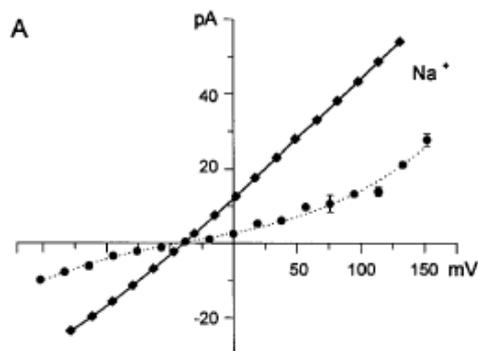


Fig. 3.25: *Figura 11 A do artigo [3], nas mesmas condições da figura 3.24. Os círculos ligados pela linha pontilhada são resultados de DB (com passo de tempo de 100 fs), enquanto os diamantes ligados pela linha cheia são resultados de PNP. Notamos que o resultado de DB está em ótimo acordo qualitativo com a figura 3.24.*

Capítulo 4

Conclusão

Neste trabalho, realizamos uma breve apresentação do assunto de canais iônicos, discutimos criticamente as técnicas computacionais utilizadas atualmente para estudar os mesmos, bem como suas limitações e perspectivas e, por fim, apresentamos um simulador que desenvolvemos utilizando um modelo simples de canal e a técnica de DB.

O simulador desenvolvido é baseado em eletrostática contínua e simula um poro cilíndrico finito banhado por eletrólito, modelado pela equação de Debye-Hückel 2.17, em ambos os lados. Como é conhecida uma solução analítica para o potencial elétrico dentro do canal nessa configuração, as simulações apresentam um grande ganho computacional frente a necessidade de solucionar a equação de Poisson a cada passo de DB. Apesar da limitação geométrica, informações estruturais do canal na forma de resíduos de carga elétrica podem ser incluídas explicitamente de forma simples. Para aumentar ainda mais o ganho computacional, foi desenvolvido também um modelo de “tempo de injeção” para servir como critério para a entrada de íons no canal, o que evita a necessidade de simular dois reservatório com vários íons além do canal.

O simulador adota ainda a hipótese simplificadora de que o movimento iônico é restrito ao eixo do cilindro. Essa hipótese é razoável para canais estreitos, mas nesse caso a hipótese de eletrostática contínua para a água dentro do canal deixa de ser válida. A comparação com resultados da literatura demonstrou bom acordo na sua região esperada de validade, mas divergindo rapidamente caso o raio do canal seja aumentado. Portanto, para estudar canais de raio maior, é necessário adaptar o simulador para o movimento tridimensional. Para canais com raios menores, o simulador apresentou algumas anomalias na presença de gradientes de concentração, sinal de que o modelo de tempo de injeção precisa ser refinado

para estes casos.

Dadas as dificuldades existentes em todas as técnicas computacionais atualmente existentes para o estudo de canais iônicos, no entanto, a disponibilidade de um simulador eficiente para um modelo simples é importante. Por exemplo, ele pode ser utilizado para realizar simulações muito rápidas de dinâmica molecular considerando a água explicitamente, utilizando a constante dielétrica do vácuo na região interna do poro, uma vez que se possua um modelo de água explicitamente polarizável e válido para regiões espacialmente confinadas.

Embora as ambições maiores da modelagem computacional de canais iônicos, como o desenvolvimento racional de medicamentos, possam ser atingidas somente através de modelos sofisticados, o estágio atual de desenvolvimento de todas as técnicas computacionais ainda é inadequado para isso, e a disponibilidade de modelos conceitualmente simples e eficientes computacionalmente pode auxiliar o desenvolvimento e interpretação dos métodos mais sofisticados.

Apêndice A

Algoritmo de terceira ordem para a equação de Langevin

Durante a permeação, as forças atuando sobre os íons variam rapidamente, tanto no espaço como no tempo. Portanto, um simulador de canais iônicos deve ser preciso tanto para calcular as forças como para integrar numericamente a equação de Langevin. O modelo mais bem estabelecido na literatura para a integração da equação de Langevin [1] é um algoritmo de terceira ordem, que não é limitado pela condição $\Delta t \ll \gamma^{-1}$, publicado por van Gunsteren e Berendsen em 1982 [6]. Este é o algoritmo utilizado no simulador que desenvolvemos neste trabalho e seus detalhes são apresentados a seguir.

Consideramos a componente z da equação de Langevin 2.3 para um dos íons do sistema (as demais componentes são análogas): $\ddot{z} + \gamma\dot{z} = (R + F)/m$, onde estamos omitindo os índices das componentes z de R e F por simplicidade. Usando que:

$$\ddot{z} + \gamma\dot{z} = e^{-\gamma t} \frac{d}{dt} (\dot{z} e^{\gamma t}), \quad (\text{A.1})$$

podemos integrar a componente z da equação de Langevin de um tempo inicial t_n a t , resultando em:

$$\dot{z}(t)e^{\gamma t} - \dot{z}(t_n)e^{\gamma t_n} = \frac{1}{m} \int_{t_n}^t [R(t') + F(t')] e^{\gamma t'} dt'. \quad (\text{A.2})$$

A integral sobre a força estocástica decorre das propriedades estocásticas desta, e será discutida mais adiante. Para a integral sobre a força sistemática, uma alternativa possível seria considerá-la constante ao longo do intervalo de tempo Δt de integração. Isso simplificaria a solução, mas o algoritmo de segunda ordem resultante seria válido somente para $\Delta t \ll \gamma^{-1}$. Para levantar essa restrição, é possível construir um algoritmo de terceira

ordem, considerando também o segundo termo da expansão em série de Taylor da força sistemática:

$$F(t) \approx F(t_n) + \dot{F}(t_n)(t - t_n). \quad (\text{A.3})$$

Utilizando essa equação, podemos realizar a integração em A.2, obtendo:

$$\begin{aligned} \dot{z}(t) &= \dot{z}(t_n)e^{-\gamma(t-t_n)} + \frac{F(t_n)}{m\gamma} (1 - e^{-\gamma(t-t_n)}) \\ &+ \frac{\dot{F}(t_n)}{m\gamma^2} (\gamma(t - t_n) - 1 + e^{-\gamma(t-t_n)}) + \frac{e^{-\gamma t}}{m} \int_{t_n}^t R(t')e^{\gamma t'} dt'. \end{aligned} \quad (\text{A.4})$$

Para obter a posição após um intervalo Δt de tempo, basta integrar a equação A.4. Todas as integrais são diretas, exceto pela última, que pode ser feita por partes, com $du = e^{-\gamma t} dt$ e:

$$v = \int_{t_n}^t R(t')e^{\gamma t'} dt, \quad (\text{A.5})$$

resultando em:

$$\frac{1}{m} \int_{t_n}^{t_{n+1}} e^{-\gamma t} dt \int_{t_n}^t R(t')e^{\gamma t'} dt' = \frac{1}{m\gamma} \int_{t_n}^{t_{n+1}} R(t) (1 - e^{\gamma(t-t_{n+1})}) dt \equiv X_n(\Delta t), \quad (\text{A.6})$$

onde $X_n(\Delta t)$ possui as mesmas propriedades estocásticas de $R(t)$ [81] (no caso, é um processo estocástico estacionário, markoviano e gaussiano de média zero). A posição no tempo t_{n+1} então, fica:

$$\begin{aligned} z(t_{n+1}) &= z(t_n) - \frac{\dot{z}(t_n)}{\gamma} (1 + e^{-\tau}) + \frac{F(t_n)}{m\gamma^2} (\tau - 1 + e^{-\tau}) \\ &+ \frac{\dot{F}(t_n)}{m\gamma^3} \left(1 - \tau + \frac{\tau^2}{2} - e^{-\tau} \right), \end{aligned} \quad (\text{A.7})$$

onde introduzimos a notação $\tau = \gamma\Delta t$. Para implementação do algoritmo, convém somar o termo $e^{-\tau}z(t_{n-1})$ a ambos os lados da equação A.7 e eliminar o termo das velocidades:

$$\begin{aligned} z(t_{n+1}) &= z(t_n) (1 + e^{-\tau}) - z(t_{n-1})e^{-\tau} + \frac{F(t_n)}{m\gamma^2} \tau (1 - e^{-\tau}) \\ &+ \frac{\dot{F}(t_n)}{m\gamma^3} \tau \left(\frac{\tau(1 + e^{-\tau})}{2} - 1 + e^{-\tau} \right) + X_n(\Delta t) + e^{-\tau} X_n(-\Delta t). \end{aligned} \quad (\text{A.8})$$

Analogamente, subtraindo $z(t_{n-1})$ da equação A.7 podemos obter uma expressão somente para as velocidades:

$$\dot{z}(t_n) = \frac{2\gamma}{\sinh(\tau)} \left(z(t_{n+1}) - z(t_{n-1}) + 2 \left(\frac{F(t_n)}{m\gamma^2} - \frac{\dot{F}(t_n)}{m\gamma^3} \right) (\sinh(\tau) - \tau) - X_n(\Delta t) + X_n(-\Delta t) \right) \quad (\text{A.9})$$

Para implementar as equações A.8 e A.9 corretamente, é importante notar que os processos estocásticos $X_n(-\Delta t)$ e $X_{n-1}(\Delta t)$ são correlacionados, pois são integrais diferentes de $R(t)$ sobre o mesmo intervalo (t_{n-1}, t_n) :

$$X_{n-1}(\Delta t) = \frac{1}{m\gamma} \int_{t_{n-1}}^{t_n} (1 - e^{-\gamma(t_{n-1} + \Delta t - t)}) R(t) dt \quad (\text{A.10})$$

$$X_n(-\Delta t) = \frac{1}{m\gamma} \int_{t_{n-1}}^{t_n} (e^{-\gamma(t_{n-1} - t)} - 1) R(t) dt. \quad (\text{A.11})$$

Portanto, eles obedecem uma distribuição gaussiana bivariante [81]:

$$W(X_{n-1}(\Delta t), X_n(-\Delta t)) = \frac{1}{\sqrt{4\pi^2 \sigma_1^2 \sigma_2^2 (1 - r^2)}} \times \exp\left(\frac{-\left(\sigma_2^2 X_{n-1}^2(\Delta t) - 2\sigma_1 \sigma_2 r X_{n-1}(\Delta t) X_n(-\Delta t) + \sigma_1^2 X_n^2(-\Delta t)\right)}{2\sigma_1^2 \sigma_2^2 (1 - r^2)}\right). \quad (\text{A.12})$$

Os parâmetros σ_1 , σ_2 e r podem ser obtidos calculando as quantidades $\langle X_{n-1}^2(\Delta t) \rangle$, $\langle X_n^2(-\Delta t) \rangle$ e $\langle X_{n-1}(\Delta t) X_n(-\Delta t) \rangle$ utilizando as equações A.10, A.11 e o teorema da flutuação-dissipação 2.4. Com isso, obtém-se:

$$\sigma_1^2 = \langle X_{n-1}^2 \rangle = \frac{k_B T}{m\gamma^2} C(\tau) \quad (\text{A.13})$$

$$\sigma_2^2 = \langle X_n^2(-\Delta t) \rangle = -\frac{k_B T}{m\gamma^2} C(-\tau) \quad (\text{A.14})$$

$$r\sigma_1\sigma_2 = \langle X_{n-1}(\Delta t) X_n(-\Delta t) \rangle = \frac{k_B T}{m\gamma^2} G(\tau) \quad (\text{A.15})$$

$$\sigma_2^2(1 - r^2) = \frac{k_B T}{m\gamma^2} \frac{E(\tau)}{C(\tau)} \quad (\text{A.16})$$

$$r \frac{\sigma_2}{\sigma_1} = \frac{G(\tau)}{C(\tau)}, \quad (\text{A.17})$$

onde usamos a notação:

$$C(\tau) = 2\tau - 3 + 4e^{-\tau} - e^{-2\tau} \quad (\text{A.18})$$

$$G(\tau) = 2\sinh(\tau) - 2\tau \quad (\text{A.19})$$

$$E(\tau) = 32 \cosh(\tau) - 8 \cosh(\tau) - 24 - 8\tau \sinh(\tau) + 4\tau \sinh(2\tau) \quad (\text{A.20})$$

O procedimento usual para sortear números aleatórios com uma distribuição como a A.12 é sortear primeiramente uma das variáveis a partir de sua distribuição, para então sortear

a segunda variável a partir de sua distribuição condicional, dado o valor sorteado para a primeira variável [81]. A distribuição de $X_{n-1}(\Delta t)$, independentemente do valor de $X_n(-\Delta t)$ é:

$$W(X_{n-1}(\Delta t)) = \frac{1}{\sqrt{2\pi\sigma_1^2}} \exp\left(-\frac{X_{n-1}^2(\Delta t)}{2\sigma_1^2}\right) \quad (\text{A.21})$$

e a distribuição condicional para $X_n(-\Delta t)$, dado um valor específico de $X_{n-1}(\Delta t)$ é [81]:

$$W(X_n(-\Delta t)|X_{n-1}(\Delta t)) = \frac{1}{\sqrt{2\pi\sigma_2^2(1-r^2)}} \exp\left(-\frac{(X_n(-\Delta t) - \frac{r\sigma_2}{\sigma_1}X_{n-1}(\Delta t))^2}{2\sigma_2^2(1-r^2)}\right). \quad (\text{A.22})$$

Finalmente, os passos do algoritmo são:

- 1 - Assume-se que os valores de $z(t_n)$, $z(t_{n-1})$, $X_{n-1}(\Delta t)$ e $F(t_{n-1})$ são conhecidos;
- 2 - Calcula-se $F(t_n)$;
- 3 - Calcula-se a derivada temporal da força sistemática no instante t_n :

$$\dot{F}(t_n) = \frac{F(t_n) - F(t_{n-1})}{\Delta t}; \quad (\text{A.23})$$

- 4 - Sorteia-se um número Y de uma gaussiana de média zero e largura A.16;
- 5 - Calcula-se $X_n(-\Delta t)$ através de:

$$X_n(-\Delta t) = X_{n-1}(\Delta t) \frac{G(\tau)}{C(\tau)} + Y; \quad (\text{A.24})$$

- 6- Sorteia-se $X_n(\Delta t)$ de uma gaussiana de média zero e largura A.13;
- 7 - Obtém-se as novas posições a partir da equação A.8;
- 8 - Obtém-se as novas velocidades a partir da equação A.9.

No primeiro passo, $z(t_{-1})$, $X_{-1}(\Delta t)$ e $F(t_{-1})$ são desconhecidos. Nesse caso, sorteia-se $X_0(\Delta t)$ de uma gaussiana de média zero e largura A.13 e calcula-se as novas posições com:

$$z(t_1) = z(t_0) + \frac{v(t_0)}{\gamma} (1 - e^{-\tau}) + \frac{F(t_0)}{m\gamma^2} (\tau - (1 - e^{-\tau})) + X_0(\Delta t), \quad (\text{A.25})$$

onde $v(t_0)$ é sorteado de uma distribuição gaussiana de largura:

$$\sigma_{v_z} = \left(\frac{k_B T}{m}\right). \quad (\text{A.26})$$

Referências Bibliográficas

- [1] KUYUCAK, S., ANDERSEN, O. S., CHUNG, S. H. Models of permeation in ion channels. *REPORTS ON PROGRESS IN PHYSICS*, v.64, p.1427-1472 (2001).
- [2] MOY, G., CORRY, B., *et al* Tests of Continuum Theories as Models of Ion Channels. I. Poisson-Boltzmann Theory versus Brownian Dynamics. *BIOPHYSICAL JOURNAL*, v.78, p.2349-2363 (2000).
- [3] CORRY, B., KUYUCAK, S., CHUNG, S.H. Tests of Continuum Theories as Models of Ion Channels. II. Poisson-Nerst-Planck Theory versus Brownian Dynamics. *BIOPHYSICAL JOURNAL*, v.78, p.2364-2381 (2000).
- [4] BORDIN, J. R., DIEHL, A., BARBOSA, M. C., LEVIN, Y. Ion fluxes through nanopores and transmembrane channels. *PHYSICAL REVIEW E*, v.85, p.039141-039147 (2012).
- [5] HILLE, B. Ion Channels of Excitable Membranes. *SINAUER ASSOCIATES*, 3^a ed., (2001).
- [6] van GUNSTEREN, W. F., BERENDSEN, H. J. C. Algorithms for brownian dynamics. *MOLECULAR PHYSICS*, v.45, p.637-647 (1982).
- [7] BERNECHE, S.; ROUX, B. Energetics of ion conduction through the K⁺ channel. *NATURE*, v.414, p.73-77 (2001).
- [8] NEHER, E.; SAKMANN, B. Single-channel currents recorded from membrane of denervated frog muscle-fibers. *NATURE*, v.260, p.799-802 (1976).
- [9] HAMILL, O. P.; MARTY. A. Improved patch-clamp techniques for high-resolution

- current recording from cells and cell-free membrane patches. *et al. PFLUGERS ARCHIV-EUROPEAN JOURNAL OF PHYSIOLOGY*, v.391, p.85-100 (1981).
- [10] ARISPE, N.; DIAZ, J. C.; FLORA, M. Efficiency of Histidine-Associating Compounds for Blocking the Alzheimer's A β Channel Activity and Cytotoxicity. *BIOPHYSICAL JOURNAL*, v.95, p.4879-4889 (2008).
- [11] NARAYANANA, K. L.; IRMADY, K. *et al.* Evidence that TRPC1 is involved in hippocampal glutamate-induced cell death. *NEUROSCIENCE LETTERS*, v.446, p.117-122 (2008).
- [12] IMLACH, W. L.; FINCH, S. C. *et al.* Finch The Molecular Mechanism of "Ryegrass Staggers", a Neurological Disorder of K⁺ Channels. *JOURNAL OF PHARMACOLOGY AND EXPERIMENTAL THERAPEUTICS*, v.327, p.657-664 (2008).
- [13] LANG, F.; HUBER, S. M. *et al.* Plasma membrane ion channels in suicidal cell death. *ARCHIVES OF BIOCHEMISTRY AND BIOPHYSICS*, v.462, p.189-194 (2007).
- [14] KUNZELMANN, K. Ion channels and cancer. *JOURNAL OF MEMBRANE BIOLOGY*, v.205, p.159-173 (2005).
- [15] WU, K.; NIE, Y. *et al.* Molecular basis of therapeutic approaches to gastric cancer. *JOURNAL OF GASTROENTEROLOGY AND HEPATOLOGY*, v.24, p.37-41 (2009).
- [16] PREVARSKAYA, N.; SKYRMA, R. *et al.* Ion channels in death and differentiation of prostate cancer cells. *CELL DEATH AND DIFFERENTIATION*, v.14, p.1295-1304 (2007).
- [17] FISKE, J. L.; FOMIN, V. P. *et al.* Voltage-sensitive ion channels and cancer. *CANCER METASTASIS REVIEWS*, v.25, p.493-500 (2006).
- [18] SCHÖNHERR, R. Clinical Relevance of Ion Channels for Diagnosis and Therapy of Cancer. *JOURNAL OF MEMBRANE BIOLOGY*, v.205, p.175-184 (2005).
- [19] FRIEDERICH, P. Basic concepts of ion channel physiology and anaesthetic drug effects. *EUROPEAN JOURNAL OF ANAESTHESIOLOGY*, v.20, p.343-353 (2003).

- [20] NILIUS, B.; DROOGMANS, G. Ion Channels and Their Functional Role in Vascular Endothelium. *PHYSIOLOGICAL REVIEWS*, v.81, p.1415-1459 (2001).
- [21] JACKSON, W. F. Ion Channels and Vascular Tone. *HYPERTENSION*, v.35; p.173-178 (2000).
- [22] FRANKS, N. P.; LIEB, W. R. Molecular and cellular mechanisms of general anesthesia. *NATURE*, v.367, p.607-614 (1994).
- [23] KOLLARIK, M.; UNDEM, B. J. Sensory transduction in cough-associated nerves. *RESPIRATORY PHYSIOLOGY & NEUROBIOLOGY*, v.152, p.243-254 (2006).
- [24] LI, S.; GOSLING, M. *et al.* Therapeutic scope of modulation of non-voltage-gated cation channels. *DRUG DISCOVERY TODAY*, v.10, p.129-137 (2005).
- [25] ANDERSEN, O. S. Perspectives on How to Drug an Ion Channel. *JOURNAL OF GENERAL PHYSIOLOGY*, v.131 p.395-397 (2008).
- [26] LEVIN Y.; IDIART, M. A.; ARENZON, J. J. Random walk to freedom: The time of effusion. *PHYSICA A*, v.354, p.95-100 (2005).
- [27] LEVIN Y.; IDIART, M. A.; ARENZON, J. J. Solute diffusion out of a vesicle. *PHYSICA A*, v.344, p.543-546 (2004).
- [28] CATTERALL, W. A.; GUTMAN, G.; CHANDY, K. G. IUPHAR Compendium of voltage-gated ion channels 2005. *IUPHAR MEDIA, LEEDS* (2005).
- [29] EDWARDS, S., CORRY, B., KUYUCAK, S., CHUNG, S. H. Continuum electrostatics fails to describe ion permeation in the Gramicidin channel. *BIOPHYSICAL JOURNAL*, v.83, p.1348-1360 (2002).
- [30] LEVIN, Y. Electrostatics of ions inside the nanopores and trans-membrane channels. *EUROPHYSICS LETTERS*, v.76, p.163-169, (2006).
- [31] PARSEGHIAN, A. Energy of an Ion crossing a Low Dielectric Membrane: Solutions to Four Relevant Electrostatic Problems. *NATURE*, v.221, p.844-846 (1969).

- [32] TEBER, S. Translocation energy of ions in nano-channels of cell membranes. *JOURNAL OF STATISTICAL MECHANICS-THEORY AND EXPERIMENT*, P07001 (2005).
- [33] HACKMANN, C. L. Modelos matemáticos para o transporte de íons por canais em membranas de axônios. *DISSERTAÇÃO (MESTRADO) - UFRGS* (2006).
- [34] LEVIN, Y. Electrostatic correlations: from plasma to biology. *REPORTS ON PROGRESS IN PHYSICS*, v.65, p.1577-1632 (2002).
- [35] SYGANOW, A. e VON KITZING, E. (In)validity of the constant field and constant currents assumptions in theories of ion transport. *BIOPHYSICAL JOURNAL*, v.76, p.768-781 (1999).
- [36] SYGANOW, A. e VON KITZING, E. The drift approximation solves the Poisson, Nernst-Planck, and continuum equations in the limit of large external voltages. *EUROPEAN BIOPHYSICS JOURNAL WITH BIOPHYSICS LETTERS*, v.28, p.393-414 (1999).
- [37] SCHUSS, Z., NADLER, B., EISENBERG, R. S. Derivation of Poisson and Nernst-Planck equations in a bath and channel from a molecular model. *PHYSICAL REVIEW E*, v.64, p.036116(1-14) (2001).
- [38] COALSON, R. D., KURNIKOVA, M. G., GRAF, P., NITZAN, A. Brownian dynamics studies of ion permeation through biological channels. *BIOPHYSICAL JOURNAL*, v.82, p.340A (2002).
- [39] CORRY, B., KUYUCAK, S., CHUNG, S. H. Dielectric self-energy in Poisson-Boltzmann and Poisson-Nernst-Planck models of ion channels. *BIOPHYSICAL JOURNAL*, v.84, p.3594-3606 (2003).
- [40] NADLER, B., HOLLERBACH, U., EISENBERG, R. S. Dielectric boundary force and its crucial role in gramicidin. *PHYSICAL REVIEW E*, v.68, p.021905(1-9) (2003).
- [41] KUBO, R. Fluctuation-Dissipation Theorem. *REPORTS ON PROGRESS IN PHYSICS*, v.29, p.255-84 (1966).

- [42] BASTUG, T.; KUYUCAK, S. Memory effects in Brownian dynamics simulations of ion transport. *CHEMICAL PHYSICS LETTERS*, v.401, p.175-179 (2005).
- [43] REY, R., GUARDIA, E.; PADRO, J. A. Generalized Langevin dynamics simulation of activated processes in solution: Ion pair interconversion in water. *JOURNAL OF CHEMICAL PHYSICS*, v.97, p.8276-8285 (1992).
- [44] WARSHEL, A., AQVIST, J. Electrostatic energy and macromolecular function. *ANNUAL REVIEW OF BIOPHYSICS AND BIOPHYSICAL CHEMISTRY*, v.20, p.267-298 (1991).
- [45] HONIG, B., NICHOLLS, A. Classical electrostatics in biology and chemistry. *SCIENCE*, v.268, p.1144-1149 (1995).
- [46] SCODINU, A., FOURKAS, J. T. Comparison of the orientational dynamics of water confined in hydrophobic and hydrophilic nanopores. *JOURNAL OF PHYSICAL CHEMISTRY B*, v.106, p.10292-10295 (2002).
- [47] BAER, M. D.; MUNDY, C. J. Toward an Understanding of the Specific Ion Effect Using Density Functional Theory. *JOURNAL OF PHYSICAL CHEMISTRY LETTERS*, v.2, p.1088-1093 (2011).
- [48] DOS SANTOS, A. P.; DIEHL, A.; LEVIN, Y. Surface Tensions, Surface Potentials, and the Hofmeister Series of Electrolyte Solutions. *LANGMUIR*, v.26, p.10778-10783 (2010).
- [49] LEVIN, Y.; DOS SANTOS, A. P.; DIEHL, A. Ions at the Air-Water Interface: An End to a Hundred-Year-Old Mystery?. *PHYSICAL REVIEW LETTERS*, v.103, p.257802(1-4) (2009).
- [50] JACKSON, J. D. Classical Electrodynamics. *WILEY, NEW YORK*, (1999).
- [51] SMYTHE, W. R. Static and dynamic electricity. *McCRAW-HILL, NEW YORK*, (1950).

- [52] KUYUCAK, S.; HOYLES, M.; CHUNG, S. H. Analytical solutions of Poisson's equation for realistic geometrical shapes of membrane ion channels. *BIOPHYSICAL JOURNAL* v.74 p.22-36 (1998).
- [53] LI, S. C.; HOYLES, M. H.; KUYUCAK, S.; CHUNG, S. H. Brownian Dynamics Study of Ion Transport in the Vestibule of Membrane Channels. *BIOPHYSICAL JOURNAL* v.74 p.37-47 (1998).
- [54] COOPER, K.; JAKOBSSON, E.; WOLYNES, P. Brownian dynamic analysis of ion movement in membranes. *BIOPHYSICAL JOURNAL*, v.41, p.A14-A14 (1983).
- [55] COOPER, K.; JAKOBSSON, E.; WOLYNES, P. Brownian dynamic analysis of ion movement in membranes. *BIOPHYSICAL JOURNAL*, v.41, p.A47-A47 (1983).
- [56] COOPER, K.; JAKOBSSON, E.; WOLYNES, P. The theory of ion transport through membrane channels. *PROGRESS IN BIOPHYSICS & MOLECULAR BIOLOGY*, v.46, p.51-96 (1985).
- [57] COOPER, K. E.; GATES, P. Y.; EISENBERG, R. S. Diffusion theory and discrete rate constants in ion permeation. *JOURNAL OF MEMBRANE BIOLOGY*, v.106, p.95-105 (1988).
- [58] JAKOBSSON, E.; CHIU, S. W. Stochastic theory of ion movement in channels with single-ion occupancy. *BIOPHYSICAL JOURNAL*, v.52, p.33-45 (1987).
- [59] CHIU, S. W.; JAKOBSSON, E. Stochastic theory of singly occupied ion channels II. Effects of access resistance and potential gradients extending into the bath. *BIOPHYSICAL JOURNAL*, v.55, p.147-157 (1989).
- [60] BEK, S.; JAKOBSSON, E. Brownian dynamics study of a multiply-occupied cation channel: application to understanding permeation in potassium channels. *BIOPHYSICAL JOURNAL*, v.66, p.1028-1038 (1994).
- [61] LEVITT, D. G. Electrostatic calculations for an ion channel .1. Energy and potential profiles and interactions between ions. *BIOPHYSICAL JOURNAL*, v.22, p.209-219 (1978).

- [62] JORDAN, P. C. Electrostatic modeling of ion pores - energy barriers and electric-field profiles. *BIOPHYSICAL JOURNAL*, v.39, p.157-164 (1982).
- [63] HOYLES, M.; KUYUCAK, S.; CHUNG, S. H. Solutions of Poisson's equation in channel-like geometries. *COMPUTER PHYSICS COMMUNICATIONS*, v.115, p.45-68 (1998).
- [64] CHUNG, S. H.; HOYLES, M. *et al.* Study of ionic currents across a model membrane channel using Brownian dynamics. *BIOPHYSICAL JOURNAL*, v.75, p.793-809 (1998).
- [65] CHUNG, S. H.; HOYLES, M. *et al.* Permeation of ions across the potassium channel: Brownian dynamics studies. *BIOPHYSICAL JOURNAL*, v.77, p.2517-2533 (1999).
- [66] CHUNG, S. H.; ALLEN, T. W.; KUYUCAK, S. Modeling diverse range of potassium channels with brownian dynamics. *BIOPHYSICAL JOURNAL*, v.83, p.263-277 (2002).
- [67] CORRY, B.; ALLEN, T. W. *et al.* Mechanisms of permeation and selectivity in calcium channels. *BIOPHYSICAL JOURNAL*, v.80, p.195-214 (2001).
- [68] MAMONOV, A. B.; COALSON, R. D. *et al.* The Role of the Dielectric Barrier in Narrow Biological Channels: A Novel Composite Approach to Modeling Single-Channel Currents. *BIOPHYSICAL JOURNAL*, v.84, p.3646-3661 (2003).
- [69] KRISHNAMURTHY, V.; CHUNG, S. H. Brownian dynamics simulation for modeling ion permeation across bionanotubes. *IEEE TRANSACTIONS ON NANOBIO-SCIENCE*, v.4, p.102-111 (2005).
- [70] KRISHNAMURTHY, V.; CHUNG, S. H. Adaptative brownian dynamics simulation for estimating potential mean force in ion channel permeation. *IEEE TRANSACTIONS ON NANOBIO-SCIENCE*, v.5, p.126-138 (2006).
- [71] KRISHNAMURTHY, V.; HOYLES, M. *et al.* Permeation in Gramicidin Ion Channels by Directly Estimating the Potential of Mean Force Using Brownian Dynamics Simula-

- tions. *JOURNAL OF COMPUTATIONAL AND THEORETICAL NANOSCIENCE*, v.3, p.702-711 (2006).
- [72] CHUNG, S. H.; CORRY, B. Conduction Properties of KcsA Measured Using Brownian Dynamics with Flexible Carbonyl Groups in the Selectivity Filter. *BIOPHYSICAL JOURNAL*, v.93, p.44-53 (2007).
- [73] BISSET, D.; CHUNG, S. H. Efficacy of external tetraethylammonium block of the KcsA potassium channel: Molecular and Brownian dynamics studies. *BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA ACTA*, v.1778, p.2273-2282 (2008).
- [74] GORDON, D.; KRISHNAMURTHY, V.; CHUNG, S. H. *et al.* Generalized Langevin models of molecular dynamics simulations with applications to ion channels. *THE JOURNAL OF CHEMICAL PHYSICS*, v.131, p.134102(1-11) (2009).
- [75] PAULING, L. The nature of the chemical bond. *CORNEL UNIVERSITY PRESS, NEW YORK* (1942).
- [76] GUARDIA, E.; REY, R.; PADRO, J. A. Potential of mean force by constrained molecular dynamics: A sodium chloride ion-pair in water. *CHEMICAL PHYSICS*, v.155, p.187-195 (1991).
- [77] GUARDIA, E.; REY, R.; PADRO, J. A. Na^+Na^+ and Cl^-Cl^- ion pairs in water: Mean force potentials by constrained molecular dynamics. *JOURNAL OF CHEMICAL PHYSICS*, v.95, p.2823-2831 (1991).
- [78] GUARDIA, E.; ROBINSON, A.; PADRO, J. A. Mean force potential for the calcium-chloride ion pair in water. *JOURNAL OF CHEMICAL PHYSICS*, v.99, p.4229-4230 (1993).
- [79] GUARDIA, E.; PADRO, J. A. On the influence of the ionic charge on the mean force potential of ion-pairs in water. *JOURNAL OF CHEMICAL PHYSICS*, v.104, p.7219-7222 (1996).
- [80] LEVIN, Y.; FLORES-MENA, J. E. Surface tension of strong electrolytes. *EUROPHYSICS LETTERS*, v.56, p.187-192 (2001).

- [81] PAPOULIS, A. Probability, Random Variables and Stochastic Processes. *LIVRO*, (1965).
- [82] BUCHER, D.; ROTHLSBERGER, U. Molecular simulations of ion channels: a quantum chemist's perspective. *JOURNAL OF GENERAL PHYSIOLOGY*, v.135, p.549-554 (2010).
- [83] WEINER, S. J.; KOLLMAN, P. A. *et al.* A New Force Field for Molecular Mechanical Simulation of Nucleic Acids and Proteins. *JOURNAL OF AMERICAN CHEMICAL SOCIETY*, v.106, p.765-784 (1984).
- [84] HERMANS, J.; BERENDSEN, H. J. C. *et al.* A consistent empirical potential for water-protein interactions. *BIOPOLYMERS*, v.23, p.1513-1518 (1984).
- [85] BROOKS, B. R.; BRUCCOLERI, R. E. *et al.* CHARMM: A program for macromolecular energy, minimization, and dynamics calculations. *JOURNAL OF COMPUTATIONAL CHEMISTRY*, v.4, p.187-217 (1983).
- [86] FRENKEL, D.; SMIT, B. Understanding molecular simulation: from algorithms to applications. *ACADEMIC PRESS, SAN DIEGO*, (1996).
- [87] ALLEN, M. P.; TILDESLEY, D. J. Computer simulation of liquids. *OXFORD UNIVERSITY PRESS, LONDON*, (1987).
- [88] CHUNG, S. H.; CORRY, B. Three computational methods for studying permeation, selectivity and dynamics in biological channels. *SOFT MATTER*, v.1, p.417-427 (2005).
- [89] ROUX, B. Theoretical and computational models of ion channels. *CURRENT OPINION IN STRUCTURAL BIOLOGY*, v.12, p.182-189 (2002).
- [90] KUYUCAK, S.; BASTUG, T. Physics of ion channels. *JOURNAL OF BIOLOGICAL PHYSICS*, v.29, p.429-446 (2003).
- [91] LEVITT, D. G. Modeling of ion channels. *JOURNAL OF GENERAL PHYSIOLOGY*, v.113, p.789-794 (1999).

- [92] ROUX, B.; ALLEN, T. *et al.* Theoretical and computational models of biological ion channels. *QUARTERLY REVIEWS OF BIOPHYSICS*, v.37, p.15-103 (2004).
- [93] TIELEMAN, D. P.; BIGGIN, P. C. *et al.* Simulation approaches to ion channel structure-function relationships. *QUARTERLY REVIEWS OF BIOPHYSICS*, v.34, p.473-561 (2001).
- [94] ALLEN, T. W.; ANDERSEN, O. S.; ROUX, B. On the importance of atomic fluctuations, protein flexibility, and solvent in ion permeation. *JOURNAL OF GENERAL PHYSIOLOGY*, v.124, p.769-790 (2004).
- [95] TIELEMAN, D. P.; BERENDSEN H. J. C. A molecular dynamics study of the pores formed by Escherichia coli OmpF porin in a fully hydrated palmitoylcholine bilayer. *BIOPHYSICAL JOURNAL*, v.74, p.2786-2801 (1998).
- [96] KHALILI-ARAGHI, F.; GUMBART, J. *et al.* Molecular dynamics simulations of membrane channels and transporters. *CURRENT OPINION IN STRUCTURAL BIOLOGY*, v.19, p.128-137 (2009).
- [97] MAMONOV, A. B.; KURNIKOVA, M. G.; COALSON, R. D. Diffusion constant of K^+ inside Gramicidin A: a comparative study of four computational methods. *BIOPHYSICAL CHEMISTRY*, v.124, p.268-278 (2006).
- [98] INGOLFSSON, H. I.; LI, Y. *et al.* Gramicidin A Backbone and Side Chain Dynamics Evaluated by Molecular Dynamics Simulations and Nuclear Magnetic Resonance Experiments. I: Molecular Dynamics Simulations. *JOURNAL OF PHYSICAL CHEMISTRY B*, v.115, p.7417-7426 (2011).
- [99] VOSTRIKOV, V. V.; GU, H. *et al.* Gramicidin A Backbone and Side Chain Dynamics Evaluated by Molecular Dynamics Simulations and Nuclear Magnetic Resonance Experiments. II: Nuclear Magnetic Resonance Experiments. *JOURNAL OF PHYSICAL CHEMISTRY B*, v.115, p.7427-7432 (2011).
- [100] ANDERSEN, O. S.; KOEPPE, R. E., II; ROUX, B. Gramicidin Channels. *IEEE TRANSACTIONS ON NANOBIOSCIENCE*, v.4, p.10-20 (2005).

- [101] PATEL, S.; DAVIS, J. E.; BAUER, B. A. Exploring Ion Permeation Energetics in Gramicidin A Using Polarizable Charge Equilibration Force Fields. *JOURNAL OF THE AMERICAN CHEMICAL SOCIETY*, v.131 p.13890 (2009).
- [102] BUCHER, D.; KUYUCAK, S. Importance of water polarization for ion permeation in narrow pores. *CHEMICAL PHYSICS LETTERS*, v.477, p.207-210 (2009).
- [103] ILLINGWORTH, C. J.; DOMENE, C. Many-body effects and simulations of potassium channels. *PROCEEDINGS OF THE ROYAL SOCIETY A*, v.465, p.1701-1706 (2009).
- [104] ALLEN, T. W.; ANDERSEN, O. S.; ROUX, B. Molecular dynamics - potential of mean force calculations as a tool for understanding ion permeation and selectivity in narrow channels. *BIOPHYSICAL CHEMISTRY*, v.124, p.251-267 (2006).
- [105] ALLEN, T. W.; ANDERSEN, O. S.; ROUX, B. Ion Permeation through a Narrow Channel: Using Gramicidin to Ascertain All-Atom Molecular Dynamics Potential of Mean Force Methodology and Biomolecular Force Fields. *BIOPHYSICAL JOURNAL*, v.90, p.3447-3468 (2006).
- [106] POPLE, J. A. Nobel Lecture: Quantum chemical models. *REVIEWS OF MODERN PHYSICS*, v.71, p.1267-1274 (1999).
- [107] KOHN, W. Nobel Lecture: Electronic structure of matter-wave functions and density functionals. *REVIEWS OF MODERN PHYSICS*, v.71, p.1253-1266 (1999).
- [108] BUCHER, D.; RAUGEI, S. *et al.* Polarization effects and charge transfer in the KcsA potassium channel. *BIOPHYSICAL CHEMISTRY*, v.124, p.292-301 (2006).
- [109] AREY, J. S.; AEBERHARD, P. C. *et al.* Hydrogen Bonding Described Using Dispersion-Corrected Density Functional Theory. *JOURNAL OF PHYSICAL CHEMISTRY B* v.113 p.4726-4732 (2009).
- [110] URRY, D. W.; GOODALL, M. C. *et al.* The Gramicidin A Transmembrane Channel: Characteristics of Head-to-Head Dimerized π (L,D) Helices. *PROCEEDINGS OF THE*

- NATIONAL ACADEMY OF SCIENCE OF THE UNITED STATES OF AMERICA*, v.68, p.1907-1911 (1971).
- [111] ARSENIIEV, A. S.; BARSUKOV, I. L. *et al.* Spatial structure of gramicidin-A transmembrane ion channel - NMR analysis in micelles. *BIOLOGICHESKIE MEMBRANY*, v.3, p.437-462 (1986).
- [112] KETCHEM, R. R.; ROUX, B.; CROSS, T. A. High-resolution polypeptide structure in a lamellar phase lipid environment from solid state NMR derived orientational constraints. *STRUCTURE*, v.5, p.1655-1669 (1997).
- [113] TOWNSLEY, L. E.; TUCKER, W. A. *et al.* Structures of gramicidins A, B, and C incorporated into sodium dodecyl sulfate micelles. *BIOCHEMISTRY*, v.40, p.11676-11686 (2001).
- [114] UNWIN, P. N. T.; ENNIS, P. D. Two configurations of a channel-forming membrane protein. *NATURE*, v.307, p.609-613 (1984).
- [115] DOYLE, D. A.; CABRAL, J. M. *et al.* The structure of the potassium channel: Molecular basis of K^+ conduction and selectivity. *SCIENCE*, v.280, p.69-77 (1998).
- [116] BASS, R. B.; STROP, P. *et al.* Crystal structure of Escherichia coli MscS, a voltage-modulated and mechanosensitive channel. *SCIENCE*, v.298, p.1582-1587 (2002).
- [117] CHANG, G.; SPENCER, R. H. *et al.* Structure of the MscL homolog from Mycobacterium tuberculosis: A gated mechanosensitive ion channel. *SCIENCE*, v.282, p.2220-2226 (1998).
- [118] DUTZLER, R.; CAMPBELL, E. B. *et al.* X-ray structure of a ClC chloride channel at 3.0 angstrom reveals the molecular basis of anion selectivity. *NATURE*, v.415, p.287-294 (2002).
- [119] DUTZLER, R.; CAMPBELL, E. B.; MACKINNON, R. Gating the selectivity filter in ClC chloride channels. *SCIENCE*, v.300, p.,108-112 (2003).

- [120] LONG, S. B.; CAMPBELL, E. B.; MACKINNON, R. Crystal structure of a mammalian voltage-dependent Shaker family K^+ channel. *SCIENCE*, v.309, p.,897-903 (2005).
- [121] LONG, S. B.; CAMPBELL, E. B.; MACKINNON, R. Voltage sensor of kv1.2: Structural basis of electromechanical coupling. *SCIENCE*, v.309, p.,903-908 (2005).
- [122] UNWIN, N. Refined structure of the nicotinic acetylcholine receptor at 4 angstrom resolution. *JOURNAL OF MOLECULAR BIOLOGY*, v.346, p.967-989 (2005).
- [123] JENSEN, M. O.; ROTH LISBERGER, U.; ROVIRA, C. Hydroxide and proton migration in aquaporins. *BIOPHYSICAL JOURNAL*, v.89, p.1744-1759 (2005).
- [124] BUCHER, D.; GUIDONI, L.; ROTH LISBERGER, U. The protonation state of the Glu-71/Asp-80 residues in the KcsA potassium channel: A first-principles QM/MM molecular dynamics study. *BIOPHYSICAL JOURNAL*, v.93, p.2315-2324 (2007).
- [125] BUCHER, D.; GUIDONI, L. *et al.* Coordination Numbers of K^+ and Na^+ Ions Inside the Selectivity Filter of the KcsA Potassium Channel: Insights from First Principles Molecular Dynamics. *BIOPHYSICAL JOURNAL*, v.98, p.L47-L49 (2010).
- [126] BASTUG T.; KUYUCAK, S. Energetics of ion permeation, rejection, binding, and block in gramicidin A from free energy simulations. *BIOPHYSICAL JOURNAL*, v.90, p.3941-3950 (2006).
- [127] BASTUG T.; PATRA, S. M.; KUYUCAK, S. Finite system and periodicity effects in free energy simulations of membrane proteins. *CHEMICAL PHYSICS LETTERS*, v.425, p.320-323 (2006).