

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
BIOLÓGICAS: BIOQUÍMICA

Análise da ligação dos Antipsicóticos Eticloprida,
Haloperidol e Risperidona no Receptor Dopaminérgico
D3: Uma Abordagem por Ancoramento Molecular,
Bioquímica Quântica e Dinâmica Molecular.

TESE DE DOUTORADO

Geancarlo Zanatta

Porto Alegre, RS, Brasil

2014

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
BIOLÓGICAS: BIOQUÍMICA**

Análise da ligação dos Antipsicóticos Eticloprida, Haloperidol e Risperidona em Receptores Dopaminérgicos: Uma Abordagem por Ancoramento Molecular, Bioquímica Quântica e Dinâmica Molecular.

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Bioquímica

Geancarlo Zanatta

Orientadora: Profa. Dra. Carmem Gottfried

Co-Orientador: Prof. Dr. Valder Nogueira Freire

Porto Alegre, RS, Brasil

2014

CIP - Catalogação na Publicação

Zanatta, Geancarlo

Análise da ligação dos Antipsicóticos Eticloprida, Haloperidol e Risperidona no Receptor Dopaminérgico D3: Uma Abordagem por Ancoramento Molecular, Bioquímica Quântica e Dinâmica Molecular. / Geancarlo Zanatta. -- 2014.
205 f.

Orientadora: Carmem J. S. Gottfried.
Coorientador: Valder N. Freire.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica, Porto Alegre, BR-RS, 2014.

1. Antipsicóticos. 2. Bioquímica Quântica. 3. Receptor de Dopamina. 4. Ancoramento Molecular. 5. Dinâmica Molecular. I. Gottfried, Carmem J. S., orient. II. Freire, Valder N., coorient. III. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a todos aqueles que, ao lutarem por seus ideais, reúnem forças para plantar a semente da mudança no coração do próximo. Àqueles que se dedicam à ciência com o objetivo de inovar e melhorar a vida da humanidade em um ato altruista, quer seja no ensino ou na pesquisa. Também àqueles que souberam divergir, agir de forma não alinhada às ideologias destrutivas massificantes, para mudar o rumo da história e mostrar que as mudanças são possíveis e que as ideias são as mais poderosas armas que temos. Portanto, esta tese é dedicada àquele que entende o que faz e por quem o faz.

AGRADECIMENTOS

Agradeço muito à professora Carmem, que soube me impulsionar em um momento que pensava em desistir da vida acadêmica. Ela soube me perseguir com propostas e convites, insistindo a cada momento para que eu seguisse em frente. Quando aceitei fazer parte de seus sonhos, fui recebido em seu grupo com todo o suporte e calor humano possíveis, de forma que logo me senti revigorado por completo. Não posso ainda deixar de agradecer pelas palavras amigas, horas de lazer que tivemos juntos e momentos de serenidade e reflexão.

Agradeço ao professor Valder por ter aberto as portas de seu laboratório e de sua casa para me receber. Sua supervisão foi muito instrutiva e prazerosa, pois logo percebi que havia encontrado não somente um co-orientador, mas também um amigo. Através dele pude aprender não somente as técnicas e os princípios diretamente utilizados nesta tese, mas também um conjunto de métodos que certamente serão úteis em minha carreira (jamais esquecerei os 20 dias de treinamento intensivo, onde fui introduzido no mundo da matéria condensada).

À Jaqueline, minha esposa, pelo apoio e consolo que sempre encontrei em suas palavras amigas. E, que quando me vendo cansado e em dúvidas, soube auxiliar a reencontrar o caminho com toda a sua ternura. Sua companhia tornou os dias mais alegres e trouxe um sentido novo para minha vida.

Aos meus pais, Nelson e Analite, que sempre me apoiaram. Souberam compreender os meus anseios, minha ausência e sempre estiveram prontos para estender uma mão amiga e dar um conselho acolhedor. Principalmente, por me ajudarem a ver o equilíbrio necessário à fluidez da vida.

Aos meus irmãos e irmã, que sempre deram suporte emocional a meus sonhos.

A Nena, ao Osmar e ao David (Mano) por me receberem como parte da família e apoiarem meus esforços.

À Ruth, que apareceu em minha vida e mudou muita coisa. Soube reacender uma chama que sobrevivia às minguas, havia um tempo. Alimentou meus ideais e ofereceu o que somente aqueles privilegiados pela companhia de grandes amigos podem obter: palavras de sabedoria. Cada banquete, cada brinde, ficará em minha memória, bem como cada lembrança confidenciada, que mesmo sendo alheias passaram a fazer parte do que sou.

Ao Julian, anjo que cruzou o meu caminho. Como foi bom aprender com gestos e demonstrações de carinho o que é ser parte de um grupo fraternal. Contigo aprendi muito, e continuo aprendendo. A vida é uma roda gigante, me dissestes uma vez – jamais esquecerei! A ti, que considero tão próximo a ponto de não termos segredos, agradeço por todo o apoio que sempre destes para a minha formação e para o meu sucesso. Pelas tuas mãos conheci o Gilmar, o Philip e o Egon, os quais se tornaram parte de minha família e muitas alegrias temos compartilhado.

Ao Gonzalo, que me conduz sempre a um caminho de reflexão, tolerando muitas vezes as minhas limitações. Não são poucos os teus esforços para me mostrar um pedaço diferente do mundo a cada conversa, a cada viagem. Obrigado por sempre estender a mão amiga.

Ao Dinler, grande amigo, que sempre esteve disponível para ajudar-me e ensinar-me. Sem o teu apoio o caminho teria sido mais árduo.

Aos meus colegas do laboratório PNG que sempre me deram apoio e incentivo, estendendo a mão quando necessário.

Aos meus colegas de trabalho, Norma, Fernanda e Luis Paulo, que sempre apoiaram meus estudos.

Agradeço, por fim, a todos aqueles que participaram de minha vida nestes anos e que contribuíram de alguma forma para que eu me tornasse a pessoa que sou.

“ ...

Cambia el rumbo el caminante
Aunque esto le cause daño
Y así como todo cambia
Que yo cambie no es extraño

...

Pero no cambia mi amor
Por más lejo que me encuentre
Ni el recuerdo ni el dolor
De mi pueblo y de mi gente”

Julio Numhauser

SUMÁRIO**PARTE I**

1. Introdução	5
1.1. Caracterização do Problema	5
1.2. Referencial Teórico	7
1.2.1. Neurotransmissão Dopaminérgica	7
1.2.1.1. Dopamina e seus Receptores	7
1.2.1.2. Receptor humano de dopamina tipo D3	11
1.2.1.3. Hipótese Dopaminérgica da Esquizofrenia	16
1.2.1.4. Antipsicóticos	19
1.2.1.4.1. Antipsicóticos Atípicos: Hipóteses de Mecanismo de Ação	25
2. Objetivos	28
2.1. Objetivo Geral	28
2.2. Objetivos Específicos	28

PARTE II

3. Publicações	30
-----------------------------	----

PARTE III

4. Discussão	108
5. Conclusões	136
6. Perspectivas	139
7. Referências Bibliográficas	140

ANEXOS

8. Bioquímica Computacional	155
8.1. Introdução	155
8.1.1. Métodos Clássicos (Mecânica Molecular)	157
8.1.2. Métodos Semi-empíricos	158
8.1.3. Métodos de Mecânica Quântica	159
8.1.3.1. Teoria do Funcional da Densidade (DFT)	160
8.1.4. Fracionamento Molecular com Caps Conjugados (MFCC)	162
8.1.5. Ancoramento Molecular (<i>Docking</i>)	166
8.1.6. Dinâmica Molecular	166
8.1.7. ONIOM	167
8.1.8. Banco de Dados de Estrutura de Proteínas	168
9. Artigo em Outro Tema Desenvolvido durante a Tese	169
10. Lista de Figuras	195

PARTE I



RESUMO

A introdução dos antipsicóticos na clínica psiquiátrica promoveu intensas mudanças no tratamento dos transtornos mentais. Apesar do sucesso terapêutico, a administração dos primeiros antipsicóticos, conhecidos como agentes típicos, foi associada a sérios efeitos adversos, principalmente sintomas extrapiramidais (SEP), comprometendo a adesão ao tratamento. Os SEP incluem distonias, acatisia, pseudoparkinsonismo e discinesia tardia. Após o surgimento da clozapina, uma nova geração de compostos, conhecida como agentes atípicos, de alto valor terapêutico e reduzida incidência de SEP foi desenvolvida. Investigações conduziram a hipótese dopaminérgica da esquizofrenia e demonstraram que o efeito terapêutico destes agentes está associado ao bloqueio de receptores de dopamina da subfamília D2. Acredita-se que os agentes atípicos ocupem somente cerca de 65-80% dos receptores na região nigroestriatal e por isso atinjam o efeito terapêutico sem desencadear o surgimento de SEP, enquanto que agentes típicos ocupam níveis acima de 80%. Para explicar as diferenças entre agentes típicos e atípicos, foi proposto que, enquanto os primeiros se ligam com alta afinidade e bloqueiam os receptores por um longo período, os atípicos se ligam com baixa afinidade e se dissociam do receptor rapidamente, restabelecendo a sinalização dopaminérgica. Estudos recentes também demonstram o bloqueio de receptores D3 como importante alvo terapêutico para o tratamento da esquizofrenia e da dependência química, entre outros transtornos. Neste trabalho foi utilizada a estrutura tridimensional do receptor humano de dopamina D3 co-cristalizado com a eticloprida para investigar o perfil de ligação dos antipsicóticos eticloprida, haloperidol e risperidona neste receptor, através de métodos computacionais clássicos e quânticos. A eticloprida é um potente agente com alta seletividade para receptores D2/D3 e de grande utilidade na pesquisa farmacológica. Este agente consiste no único antipsicótico co-cristalizado com um receptor de dopamina existente no momento. Nossos resultados destacam o papel central do resíduo Asp110 no ancoramento da eticloprida, além dos resíduos Val82, Val107, Cys114, Ser182, Ile183, Val189, Trp342, Phe345, Phe346 e Tyr373. Dentre estes, Val107, Ser182, Phe188, Val82 e Asn185 foram pela primeira vez relacionados diretamente com o mecanismo de ligação da eticloprida no receptor D3. O haloperidol é um agente típico com alta afinidade por receptores da subfamília D2. Apesar de estar associado ao surgimento de SEP, o haloperidol é muito utilizado na clínica por suas propriedades terapêuticas e baixo custo. A compreensão do bloqueio de receptores de dopamina pelo haloperidol é de fundamental importância para o desenvolvimento de derivados/novos compostos com reduzido índice de SEP. Nossos resultados descrevem a orientação do haloperidol durante a interação com o receptor D3 e demonstraram a relevância dos resíduos Asp110, Cys114, Ile183, Phe345, Phe346, Tyr365 e Tyr373. A risperidona é um importante antipsicótico atípico utilizado no tratamento de esquizofrenia e sintomas de irritabilidade associado com autismo em crianças. Em nosso estudo, observamos que a risperidona pode ligar-se no receptor D3 em duas orientações distintas, RO1 e RO2. A análise da contribuição individual de cada resíduo juntamente com simulações de dinâmica molecular indicam que RO2 é mais propensa a desligar-se do receptor do que RO1, sugerindo um perfil de ligação misto, com rápida dissociação de uma fração dos antipsicóticos ligados. Os resultados apresentados neste estudo auxiliam na elucidação do mecanismo de ligação da eticloprida, haloperidol e risperidona no receptor de dopamina D3 e consolidam o uso de ferramentas clássicas e quânticas para a obtenção de estruturas tridimensionais e a análise do perfil de contribuição energética individual dos resíduos de aminoácido que compõem o sítio de ligação do receptor de dopamina D3.

ABSTRACT

The introduction of antipsychotics in the clinic significantly improved the treatment of mental diseases. Nevertheless, besides the therapeutic success of the first antipsychotics (known as typical agents), their administration was associated with serious side-effects known as extrapyramidal symptoms (EPS), that compromised the treatment. The EPS include dystonic reactions, akathisia, pseudoparkinsonism and tardive dyskinesia. Following the synthesis of clozapine, a new generation of antipsychotics (known as atypical agents) with reduced EPS incidence began to appear. A set of evidences lead to the dopaminergic hypothesis of schizophrenia and many studies associated the mechanism of action of antipsychotics with the blockade of D2-like receptors. It was demonstrated that while atypical antipsychotics elicit clinical effects through 65-80% of dopamine receptor occupancy, typical agents show occupancy levels above 80%, triggering EPS. To explain the differences between typical and atypical agents, it was proposed that the former have higher affinity for the receptors, blocking them for a longer period, while atypical agents show lower affinity and are easily dissociated from the receptor, allowing the reestablishment of the dopamine signaling in the nigrostriatal pathway. Recently, the blockade of D3 receptors has been discovered as an important strategy for the treatment of schizophrenia and other neurological diseases. In this study, we took advantage from the published crystallographic data of D3R complexed with eticlopride, to investigate the binding profile of the antipsychotics eticlopride, haloperidol and risperidone, through classical and quantum computational methods. Eticlopride is a potent and selective D2/D3 antagonist agent and is widely used in pharmacological research. Moreover, up to date, it is the only antipsychotic co-crystallized with a dopamine receptor. Our results highlight the central role of the residue Asp110, followed by Val82, Val107, Cys114, Ser182, Ile183, Val189, Trp342, Phe345, Phe346 and Tyr373, among others, and demonstrated for the first time the participation of Val107, Ser182, Phe188, Val82 e Asn185 in this binding. Haloperidol is a typical agent with high affinity for D2-like receptors. Although associated with the onset of EPS, haloperidol is still widely used in clinic due to its clinical properties and lower cost. In this way, the understanding of the mechanism involving dopamine receptor blockade by haloperidol is of great importance for the development of derivatives/novel agents with reduced EPS incidence. Our results unveil the conformation of haloperidol during its interaction with the D3 receptor and highlight the role of residues Asp110, Cys114, Ile183, Phe345, Phe346, Tyr365 and Tyr373. Risperidone is an atypical antipsychotics used in the treatment of schizophrenia and symptoms of irritability associated with autism spectrum disorder (ASD) in children. Our results show that risperidone binds to D3 receptor in two possible orientations, RO1 and RO2. The analyses of the individual amino acid contribution and the molecular dynamics simulations indicated that RO2 exhibits a trend to dissociate faster from the receptor than RO1, suggesting the existence of a mixing binding profile, with a fast-off behavior observed in only a fraction of ligands corresponding to orientation RO2. Our results give support to the understanding of the binding mechanisms of the important antipsychotics eticlopride, haloperidol and risperidone in the human dopamine receptor D3. Also, our results highlight the relevance of the use of classical and quantum approaches in the modeling and analysis of the individual energy contribution of every amino acid residue in the binding site of the D3 dopamine receptor.

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

AMP	- Adenosina Monofosfato
Asn	- Asparagina
Asp	- Ácido Aspártico
ATV	- Área Tegmental Ventral
cAMP	- AMP cíclica
Cys	- Cisteína
DFT	- Teoria do Funcional da Densidade (do inglês, <i>Density Functional Theory</i>)
ECL	- Alça Extracelular (do inglês, Extracellular Loop)
SEP	- Sintomas Extrapiramidais (do inglês, Extrapiramidal Symptoms)
FDA	- <i>Food and Drug Administration</i>
GGA	- Aproximação de Gradiente Generalizado (do inglês, Generalized Gradient Approximation)
Gi	- Proteína G inibitória
Glu	- Ácido Glutâmico
Gly	- Glicina
GPCR	- Receptor acoplado a proteína G (do inglês, G protein-coupled receptor)
Gs	- Proteína G estimulatória
His	- Histidina
IC₅₀	- Concentração Inibitória Média (50%)
ICL	- Alça intracelular (do inglês, Intracellular Loop)
Ile	- Isoleucina
LDA	- Aproximação de Densidade Local (do inglês, Local Density Approximation)
Leu	- Leucina
Met	- Metionina
MFCC	- Fragmentação molecular com <i>caps</i> conjugados (do inglês, Molecular Fragmentation with Conjugated Caps)
OMS	- Organização Mundial da Saúde
ONIOM	- <i>Own N-layered Integrated Molecular Orbital and Molecular Mechanics</i>
PET	- Tomografia de Emissão de Fóton
Phe	- Fenilalanina
QM/MM	- Mecânica Quântica/Mecânica Molecular
RMN	- Ressonância Magnética Nuclear
Ser	- Serina
SNC	- Sistema Nervoso Central
SPECT	- Tomografia Computadorizada de Emissão de Fóton Único (do inglês, Single Photon Emission Computerized Tomography)
Thr	- Treonina
TM	- Transmembrana
Trp	- Triptofano
Tyr	- Tirosina
Val	- Valina

1. Introdução

1.1. Caracterização do Problema

A introdução dos antipsicóticos na clínica psiquiátrica promoveu intensas mudanças no tratamento dos transtornos mentais. Neste sentido, a síntese da clozapina significou um grande avanço em relação aos primeiros agentes (também conhecidos como antipsicóticos de primeira geração, ou típicos), reduzindo os desconfortos provocados pela administração daqueles - principalmente os efeitos extrapiramidais (SEP, do inglês “extrapyramidal symptoms”), tais como distonias (espasmos musculares involuntários), acatisia (síndrome psicomotora que se manifesta pela impossibilidade de estar parado, sentado) pseudoparkinsonismo e discinesia tardia (movimentos repetitivos involuntários que se manifesta como um efeito colateral do uso a longo prazo ou uso de altas doses de antipsicóticos). Contudo, nem a clozapina, nem os novos agentes (antipsicóticos de segunda geração ou atípicos) desenvolvidos desde então, foram capazes de apresentar um perfil de ação terapêutica totalmente livre de efeitos adversos significantes. Dentre os efeitos adversos provocados pela utilização dos antipsicóticos (em maior ou menor grau, dependendo do agente) estão os efeitos extrapiramidais, ganho de peso, prolactinemia e agranulocitose, entre outros. O aparecimento destes sintomas, ou a combinação deles, além de trazerem transtornos à vida do paciente, muitas vezes acarretam a descontinuação do tratamento. Dentre os novos agentes atípicos, a risperidona e o aripiprazol são utilizados no tratamento de crianças com irritabilidade associada ao autismo (YAN, 2007; CHRISTIAN *et al.*, 2012; SHARMA e SHAW, 2012). Contudo, apesar da segurança e eficácia destes agentes, alguns efeitos adversos significativos têm sido observados, tais como ganho de peso, sonolência, cansaço e anormalidades metabólicas (SAFER, 2004; SHEA *et al.*, 2004; CANITANO

e SCANDURRA, 2008; BYRNE *et al.*, 2010), fazendo da busca pelo entendimento dos mecanismos de ação dos antipsicóticos um tema atual e relevante para guiar o desenvolvimento de novos compostos com elevada eficácia clínica e reduzidos efeitos adversos.

Sabe-se que o efeito terapêutico da maioria dos antipsicóticos ocorre através do bloqueio de receptores de dopamina da subfamília D2, e que o diferente perfil de ligação de cada composto é responsável pela resposta clínica característica de cada antipsicótico, bem como pelo desencadeamento de alguns dos importantes efeitos adversos observados. Devido a sua distribuição no SNC (SEEMAN *et al.*, 2006), o receptor D3 tem sido apontado como um importante alvo para o tratamento antipsicótico (SOKOLOFF *et al.*, 1990) e o bloqueio de receptores D3 tem sido associado com o efeito terapêutico de alguns agentes antipsicóticos (PILLA *et al.*, 1999; SILVANO *et al.*, 2010; TSCHAMMER, NUSKA *et al.*, 2011). Logo, a compreensão a nível molecular do mecanismo de interação entre os distintos antipsicóticos e o receptor de dopamina D3 será de grande valia para o desenvolvimento racional de novos compostos, além de permitir maior entendimento sobre a ação dos agentes hoje no mercado.

Em 2010, graças aos avanços nas técnicas de caracterização estrutural de proteínas, foi possível a elucidação do receptor dopaminérgico humano do tipo D3 complexado com o antagonista Eticloprida, via difração de raios-X (CHIEN, E. Y. T. *et al.*, 2010). Até o momento, este é o único receptor de dopamina cuja estrutura tridimensional foi elucidada, o que motivou a comunidade científica a utilizá-lo para melhor compreender os mecanismos envolvidos na ativação e bloqueio desta classe de receptores (OBIOL-PARDO *et al.*, 2011; SORIANO-URSÚA *et al.*, 2011; FENG *et al.*, 2012; PLATANIA *et al.*, 2012).

Na presente tese, foram utilizados métodos de bioquímica computacional¹ para avaliar o perfil energético e mecanismo de ligação dos antipsicóticos eticloprida, haloperidol e risperidona no receptor de dopamina humano D3. Durante os experimentos, foram utilizados cálculos quânticos para obter-se a contribuição energética individual de cada resíduo de aminoácidos que compõem o sítio ativo do receptor D3 para a ligação dos antipsicóticos citados, bem como o perfil de variação da energia de ligação em função do raio protéico analisado. Os resultados obtidos permitiram a maior compreensão do mecanismo de interação dos agentes estudados e o receptor D3, o qual poderá ser útil na busca/desenvolvimento de novos compostos atípicos com alto potencial terapêutico e reduzidos efeitos colaterais.

1.2. Referencial Teórico

1.2.1. Neurotransmissão Dopaminérgica

1.2.1.1. Dopamina e seus Receptores

A dopamina é um importante neurotransmissor do tipo catecolaminérgico encontrado no Sistema Nervoso Central (SNC) e que regula importantes vias de sinalização através da ativação coordenada de cinco tipos de receptores: D1, D2, D3, D4 e D5 (KEBABIAN e CALNE, 1979; JABER *et al.*, 1997). Esses receptores pertencem a classe de receptores associados a proteínas G (GPCRs, do inglês: *G protein-coupled receptors*) (DE LEAN *et al.*, 1980; AYERS *et al.*, 2002; RASMUSSEN *et al.*, 2007) e possuem segmentos conservados formados por sete hélices transmembranares conectadas por alças extra e intracelulares (OSTROWSKI *et al.*, 1992; SIBLEY e MONSMA, 1992). Na porção citoplasmática, estes receptores estão associados a uma

¹ A bioquímica computacional vale-se de ferramentas de cálculo e simulação computacional para a resolução de problemas bioquímicos. Uma descrição mais abrangente pode ser encontrada nos anexos, seção: 8. Bioquímica Computacional.

proteína de ligação a nucleotídeos de guanosina (proteína G) capaz de interagir com enzimas efetoras, promovendo a regulação dos níveis de um segundo mensageiro intracelular. Os receptores de dopamina são subdivididos em duas subfamílias, D1 e D2, sendo que os integrantes da subfamília D1 (D1 e D5) estão acoplados a subunidade alfa da proteína G estimulatória, ativando a adenilato ciclase e aumentando os níveis de AMP cíclico (cAMP). Já os receptores integrantes da subfamília D2 (D2, D3 e D4) estão acoplados à subunidade alfa inibitória da proteína G, exercendo efeito inibitório sobre a adenilato ciclase e reduzindo os níveis de cAMP intracelular (MISSALE *et al.*, 1998). A subdivisão dos receptores de dopamina e seu efeito sobre a adenilato ciclase estão representados na figura 1.

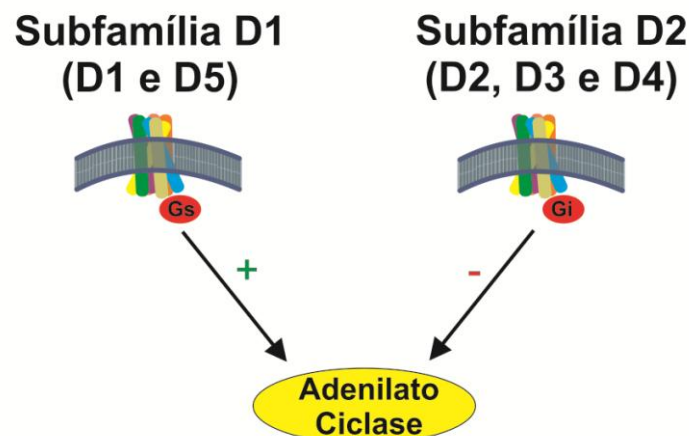


Figura 1: Regulação da enzima adenilato ciclase pelos receptores de dopamina. Receptores da subfamília D1 estão associados a subunidades estimulatórias (Gs), modulando positivamente a atividade da enzima adenilato ciclase. Os membros da subfamília D2 estão associados a proteína G inibitória (Gi), promovendo a inibição da adenilato ciclase.

Devido a organização e distribuição dos grupos celulares dopaminérgicos no SNC, são quatro as vias dopaminérgicas conhecidas (Figura 2):

- 1) **Via mesolímbica:** projeções da área tegmental ventral (ATV) à componentes do sistema límbico (núcleo acumbens, hipocampo e

amígdala). Está relacionada com a emoção, recompensa, memória, e ao desenvolvimento de sintomas positivos da esquizofrenia quando super estimulada.

- 2) **Via mesocortical:** projeções da ATV ao neocórtex. Disfunções nessa via estão relacionadas a sintomas negativos e prejuízos cognitivos observados em pacientes com esquizofrenia.
- 3) **Via nigroestriatal:** projeta-se da substância nigra ao estriado. Relaciona-se à coordenação motora e movimento. Deficiências nessa via estão relacionados à sintomas parkinsonianos. O bloqueio de receptores dopaminérgicos desta via pode resultar no surgimento de SEP.
- 4) **Via tuberoinfundibular:** projeções do núcleo arqueado do hipotálamo à glândula pituitária. A inibição desta via está relacionada ao aumento de prolactina.

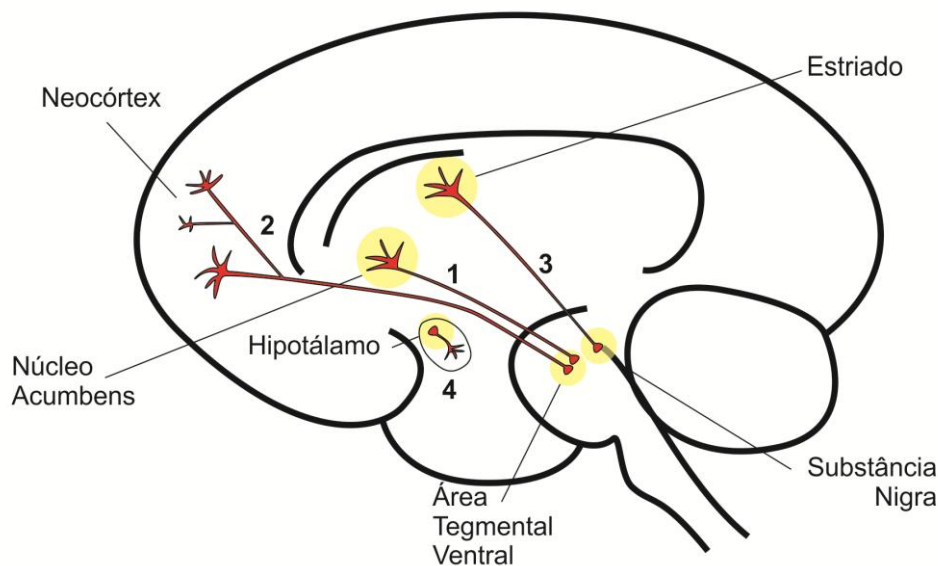


Figura 2: Vias dopaminérgicas no SNC: 1) Via mesolímbica; 2) via mesocortical; 3) via nigroestriatal; e, 4) via tuberoinfundibular. Adaptada de Stahl, 2003 (STAHL, 2003).

Os receptores de dopamina humanos D1, D2, D3, D4 e D5 são codificados pelos genes DRD1 (cromossomo 5), DRD2 (cromossomo 11), DRD3 (cromossomo 3), DRD4

(cromossomo 11) e DRD5 (cromossomo 4), respectivamente (MISSALE *et al.*, 1998). Os receptores de dopamina D2, devido ao *splicing* alternativo, podem ser encontrados nas formas longa (D2L, do inglês “long”) e curta (D2S; do inglês “short”), sendo que a primeira contém 29 aminoácidos a mais que a segunda (GIROS *et al.*, 1989). Por sua vez, o receptor D3 também sofre *splicing* alternativo e por isso podem ser encontradas inúmeras variantes com formas curtas e longas, sendo que, muitas parecem não ser funcionais. Também, o receptor D4 (VAN TOL *et al.*, 1991; VAN TOL *et al.*, 1992) possui inúmeras variantes, cada uma com um número diferente de unidades repetidas na terceira alça citoplasmática deste receptor. Já o receptor D5, possui mais dois pseudogenes para o receptor D5 nos cromossomos 1 e 2, assim chamados por codificar formas incompletas contendo apenas 154 aminoácidos (SEEMAN e VAN TOL, 1994).

Estruturalmente, os receptores D2 e D3 apresentam 46% de homologia, havendo similaridade de 78% entre as sequências das hélices transmembrana (SOKOLOFF *et al.*, 1990; CHIEN, E. Y. T. *et al.*, 2010). Mais ainda, dentre os 18 resíduos de contato com a eticloprida, observados nos dados de cristalografia da Eticloprida-D3 (PDBID:3PBL), 17 são idênticos no receptor D2 (CHIEN, E. Y. T. *et al.*, 2010). Uma explicação racional para esta similaridade é a alta taxa de conservação entre os receptores dopaminérgicos devido ao fato de que estes compartilham a mesma origem evolucionária, como demonstrado na figura 3. Devido a distribuição destes receptores em regiões do SNC relacionadas a fisiopatologia da esquizofrenia e aos efeitos adversos resultantes do uso de antipsicóticos e a similaridade encontrada no sítio de ligação dos receptores D2 e D3, a busca por agentes terapêuticos seletivos transformou-se em um desafio para a comunidade científica.

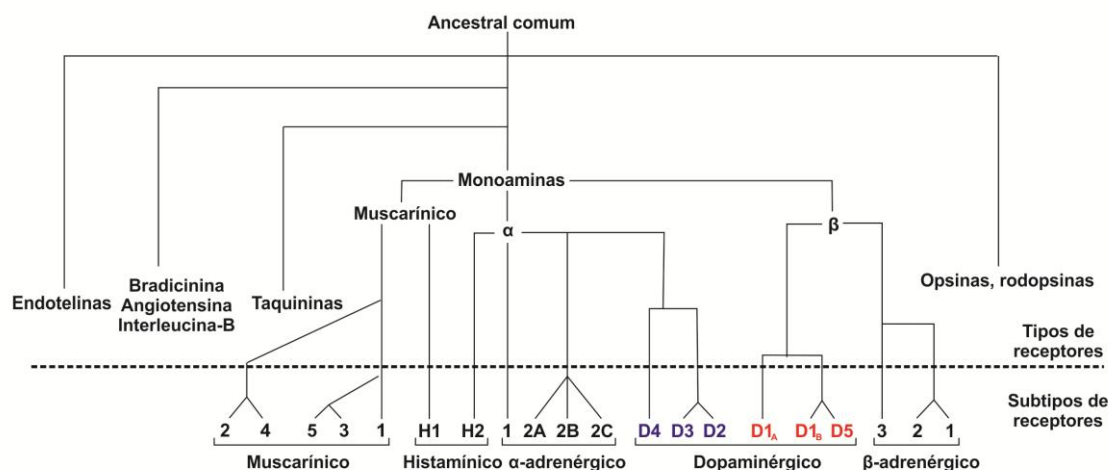


Figura 3: Árvore evolutiva dos receptores acoplados a proteína G. Os receptores de dopamina da subfamília 1 e 2 estão destacados em vermelho e azul, respectivamente. Adaptado de Graham (2009), p. 52 (GRAHAM, 2009).

1.2.1.2. Receptor humano de dopamina tipo D3

Em novembro de 2010, a estrutura do receptor humano de dopamina D3 contendo o antagonista eticloprida ligado a ela foi publicada (PDB: 3PBL) (CHIEN, E. Y. *et al.*, 2010). O alto grau de homologia entre os receptores D3 e D2, especialmente no sítio de ligação, faz desta estrutura uma ferramenta chave no estudo, a nível molecular, dos mecanismos envolvendo a interação entre agonistas e antagonistas com os receptores de dopamina.

Durante o processo de cristalização, a termoestabilidade do receptor D3 foi obtida através da co-cristalização com o antagonista eticloprida (enquanto outros antagonistas falharam nesta tarefa). A eticloprida é uma benzamida substituída e foi desenvolvida, levando em conta estudos prévios de relação estrutura atividade, como um potente agente bloqueador com alta seletividade para receptores da subfamília D2. Devido às suas características farmacológicas, a eticloprida tem sido muito utilizada em pesquisas com esquizofrenia e outras enfermidades (MARTELLE e NADER, 2008).

Os dados cristalográficos apresentados por Chien e colaboradores (2010) foram obtidos com 3,15 Å de resolução e apresentam dois receptores em orientação antiparalela, sendo que ambas as cópias do receptor são muito similares (RMSD de 0,6 Å em relação as sete hélices transmembranas). Semelhante a dados publicados anteriormente de outros GPCR, este receptor é formado por sete alfa hélices com domínios transmembrana. Entretanto, a porção extracelular difere muito dos demais receptores (como esperado, devido a diversidade na sequência primária), conferindo características únicas às estruturas secundárias e aos resíduos de aminoácidos formadores do sítio de ligação. Nas extremidades das hélices o receptor D3 possui três alças extracelulares (ECL1, ECL2 e ECL3; siglas em inglês para *extracellular loop*) e três intracelulares (ICL1, ICL2 e ICL3; siglas em inglês para *intracellular loop*). Na porção extracelular, ECL2 difere do receptor β-adrenérgico por não apresentar a estrutura secundária em forma de hélice e por ser mais curta, no entanto, há grande similaridade entre os resíduos, a apresentação das cadeias laterais e a posição dos ligantes. Nestas porções, duas pontes dissulfeto são observadas, uma em ECL3 entre Cys355 e Cys358, e a outra entre ECL2 (Cys181) e a hélice 3 (Cys103). Quando comparadas as hélices transmembranares, observa-se pequenas diferenças na posição relativa da porção extracelular entre as hélices VI e VII, e 3,5 Å de aproximação entre as hélices III e V devido ao encurtamento da ECL2 (que liga as hélices III e V por uma ponte dissulfeto entre Cys181 e Cys103) em um aminoácido em relação ao receptor β-adrenérgico. A visualização esquemática deste receptor é representada na figura 4 (A), enquanto que o sítio ativo contendo a eticloprida ligada está representado na figura 4 (B) e (C).

Conforme vasta descrição na literatura, o resíduo Asp110 possui relevante papel na ligação de agonistas e antagonistas nos receptores de dopamina. Neste sentido, os dados cristalográficos exibem o resíduo Asp110 localizado no interior da cavidade de

ligação, com sua cadeia lateral orientada em direção da amina terciária da molécula de eticloprida. Além do mais, a importância da presença de um ligante carregado para a formação adequada da ponte salina, aumentando a eficiência da ligação em receptores de dopamina já havia sido indicada por Chang e colaboradores (1987) em um estudo comparativo com agonistas carregados e neutros (CHANG *et al.*, 1987).

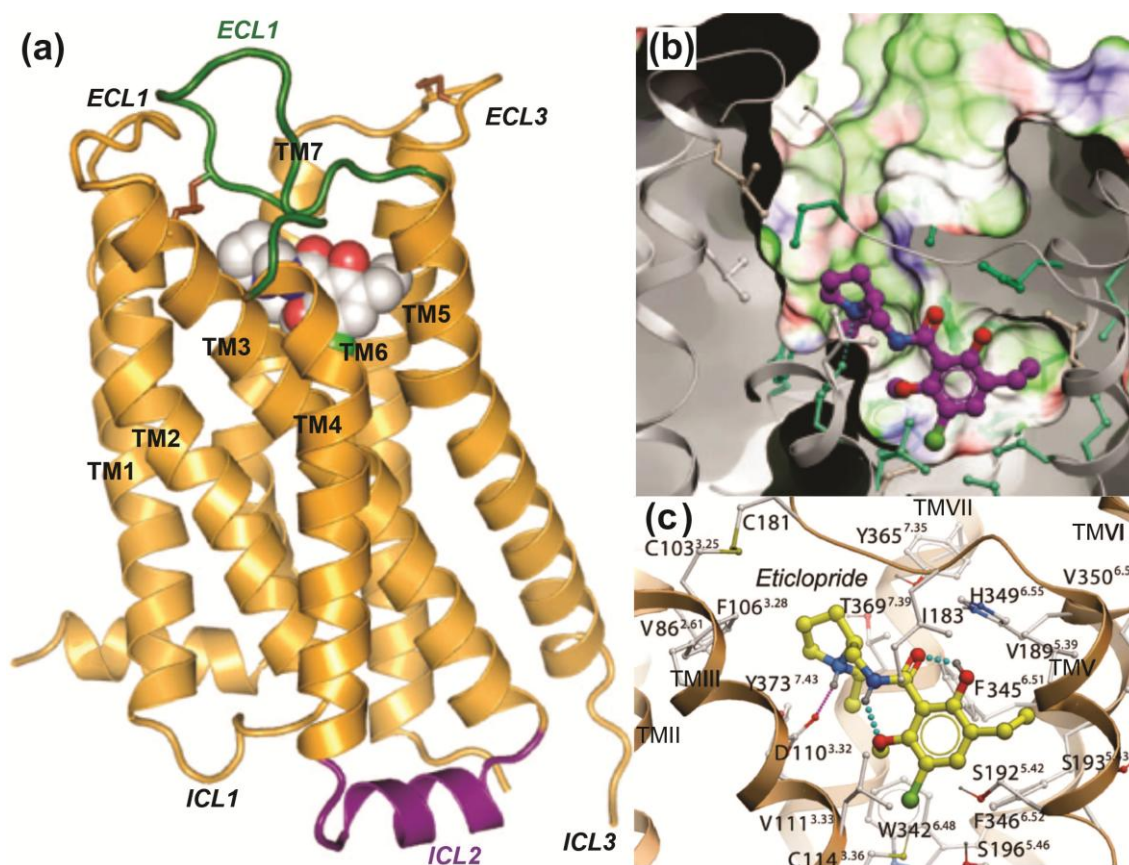


Figura 4: Dados cristalográficos do receptor humano de dopamina co-cristalizado com o antagonista eticloprida. (a) Modelo de representação espacial do antagonista eticloprida ligado ao receptor D3. (b) Sítio de ligação da eticloprida. (c) Resíduos de contato elucidados na análise dos dados cristalográficos PDBID: 3PBL. ECL1, ECL2 e ECL3: Alça extracelular 1, 2 e 3, respectivamente. ICL1, ICL2 e ICL3: Alça intracelular 1, 2 e 3, respectivamente. TM1, TM2, TM3, TM4, TM5, TM6 e TM7: Hélice transmembrana 1, 2, 3, 4, 5, 6 e 7, respectivamente. Figura adaptada de Chien e colaboradores (2010) (CHIEN, E. Y. T. *et al.*, 2010).

A análise comparativa na região do sítio dos receptores D2 e D3, realizada por Chien e colaboradores (2010), sugere a existência de um segundo sítio de ligação responsável pela seletividade ao receptor D3. A importância deste sítio foi observada

durante ensaios de ancoragem molecular com o antagonista seletivo para D3, R22, indicando a formação do segundo sítio na região entre as alças extracelulares ELC1 e ELC2 e porções das hélices TM1, TM2 e TM7 (CHIEN, E. Y. T. *et al.*, 2010). Os autores argumentaram que devido a baixa taxa de conservação (44%) da hélice TM1 entre D2 e D3, e a divergência entre alguns resíduos das hélices TM2 e TM7, como a Thr368 (Phe no D2) que forma uma ligação de hidrogênio com a Tyr365, podem ocorrer diferenças significativas no empacotamento das duas estruturas (D2 e D3), principalmente na junção das hélices TM1, TM2 e TM7. Essas alterações, apesar de sutis, podem modular direta ou indiretamente a seletividade destes receptores (CHIEN, E. Y. T. *et al.*, 2010).

A elucidação da estrutura tridimensional do receptor D3 teve grande impacto na comunidade científica, a qual passou a utilizar esta estrutura como padrão para a análise do perfil de ligação de novos agentes terapêuticos (TSCHAMMER, N. *et al.*, 2011), bem como para estudar os parâmetros de seletividade D2/D3 (CARLSSON *et al.*, 2011; SORIANO-URSÚA *et al.*, 2011; FENG *et al.*, 2012; PLATANIA *et al.*, 2012). A importância deste receptor vem do fato de que estudos *in vitro* e *in vivo* do perfil de ligação de antipsicóticos demonstraram além ocupação gradual dos receptores D2, também há ocupação dos receptores D3, apesar destes apresentarem afinidade ligeiramente menor (SCHOTTE *et al.*, 1996). Um estudo utilizando a técnica de PET demonstrou que tanto o antipsicótico típico haloperidol quanto o atípico clozapina ligam-se a receptores D2 e D3 *in vivo* (GIRGIS *et al.*, 2011), reforçando o papel dos receptores D3 como um importante alvo no tratamento da esquizofrenia e outras desordens neurológicas (JOYCE, 2001; PRASAD *et al.*, 2002; SHIMOHAMA *et al.*, 2003).

Na região mesolímbica, foram observados níveis abundantes de RNA mensageiro de receptores D3 na área ventral, demonstrando o relevante papel do receptor D3 na regulação desta via (SOKOLOFF *et al.*, 1990). Na análise dos níveis de receptores D3 em pacientes com esquizofrenia que não faziam uso de medicamentos, encontrou-se o dobro do valor observado no grupo controle, enquanto que, em pacientes utilizando antipsicóticos, estes níveis foram similares ou inferiores ao dos controles. Esses resultados indicam alterações nos níveis de D3 associados com a patologia e sugerem que a modulação dos receptores D3 durante o curso do tratamento da esquizofrenia pode estar relacionada com o efeito terapêutico dos antipsicóticos (JOYCE e MEADOR-WOODRUFF, 1997). A análise da distribuição de receptores D2 e D3 no SNC, utilizando tecido *post mortem*, indicou a presença de receptores D2 na região dorsal do putamen e do núcleo caudato dorsal, mas não de receptores D3. Já na região ventral do putamen, ventral do caudado e do globo pálido, observou-se uma distribuição relativa entre D2:D3 na proporção de 2:1 (SEEMAN *et al.*, 2006). A administração de alguns antipsicóticos, principalmente os pertencentes a classe dos típicos, leva ao bloqueio dos receptores D2 no estriado, culminando no aparecimento dos efeitos colaterais motores, conhecidos como sintomas extrapiramidais, devido a forte inibição da via nigroestriatal. Além do mais, o antagonismo de D3 tem sido reconhecido como um novo e potente alvo terapêutico para o tratamento da esquizofrenia, a dependência química e outros transtornos (PILLA *et al.*, 1999; BOECKLER e GMEINER, 2006; HEIDBREDEDER e NEWMAN, 2010), reduzindo ou evitando o surgimento de sintomas extrapiramidais relacionado ao bloqueio de receptores D2 na região nigroestriatal (SOKOLOFF *et al.*, 1990; STEMP *et al.*, 2000; PARK *et al.*, 2003; JOYCE e MILLAN, 2005). Além do mais, estudos em primatas não humanos tratados com L-dopa mostraram que o antagonismo de D3 atenua os sintomas

de discinesia tardia (VISANJI *et al.*, 2009), porém traz prejuízos ao tratamento, enquanto que o agonismo parcial apresenta o mesmo efeito, porém não compromete o efeito terapêutico da L-Dopa (BEZARD *et al.*, 2003). Recentemente, foi correlacionado o aumento da expressão de receptores de dopamina D3 durante o tratamento com o antipsicótico haloperidol com aparecimento de discinesia tardia, enquanto que o tratamento com clozapina não teve o mesmo efeito (MAHMOUDI *et al.*, 2014). Esses dados destacam a importância de aprofundarmos nosso conhecimento na distribuição anatômica dos diferentes subtipos de receptores de dopamina no SNC, afim de buscarmos agentes terapêuticos capazes de melhorar a eficiência terapêutica atuando de forma subtipo-seletivo e evitando o aparecimento de efeitos adversos (CAMPIANI *et al.*, 2003; PARK *et al.*, 2003; JI *et al.*, 2005; CARLSSON *et al.*, 2011; LÖBER *et al.*, 2011; CHEN *et al.*, 2012).

1.2.1.3. Hipótese Dopaminérgica da Esquizofrenia

A esquizofrenia é um transtorno mental grave que afeta cerca de 0,5 a 1 % da população, surgindo normalmente no início da vida adulta e com maior prevalência entre homens (MESSIAS *et al.*, 2007). Este transtorno tem grande impacto para a sociedade e compromete as atividades diárias dos pacientes, manifestando-se através de diversos sintomas, os quais podem ser classificados como: positivos, negativos e cognitivos. Os sintomas positivos manifestam-se através de episódios de alucinações (normalmente auditivas), delírios envolvendo megalomanias e delírios de perseguição e desorganização da fala. Os sintomas negativos manifestam-se de forma mais complexa através da desmotivação e falta de prazer em iniciar/realizar atividades, do afeto embotado e da apatia (FOUSSIAS e REMINGTON, 2010). Por sua vez, os sintomas cognitivos envolvem prejuízos na memória de trabalho e na realização de funções executivas (ANDREASEN, 1982; 1993) (TANDON *et al.*). A esquizofrenia não tem

cura, contudo, o tratamento contínuo permite que seus sintomas sejam amenizados e controlados ao longo da vida do paciente. Um estudo realizado pela Organização Mundial da Saúde (OMS) em 2001, estimou que os gastos com esta patologia em países industrializados variam entre 1,6 a 2,6% dos custos em saúde (WHO, 2001). Em 2002, os valores despendidos nos Estados Unidos da América (EUA) foram estimados em torno de 62,7 bilhões de dólares (MCEVOY, 2007), enquanto que em 2004/05, na Inglaterra, foram gastos cerca de 6,7 bilhões de libras (ROSHNI MANGALORE, 2007).

A hipótese de que a dopamina e o sistema dopaminérgico estão intimamente ligados a fisiopatologia da esquizofrenia surgiu a cerca de 50 anos e passou por importantes modificações ao longo dos anos. Esta hipótese surgiu com os primeiros estudos de Carlsson e Lindqvist (1963) onde foi observado o aumento do metabolismo de dopamina devido a administração de clorpromazina e haloperidol em camundongos (CARLSSON e LINDQVIST, 1963) e foi reforçada pela observação de que o tratamento da psicose com reserpina levava ao bloqueio da recaptação de dopamina e outras monoaminas (CARLSSON *et al.*, 1957) e que o aumento dos níveis de monoaminas induzido pela administração de anfetamina promove sintomas semelhantes aos da psicose (LIEBERMAN *et al.*, 1987). Finalmente, na década de 70, pesquisadores associaram de forma concreta a administração de antipsicóticos e o bloqueio de receptores de dopamina (SEEMAN e LEE, 1975; CREESE *et al.*, 1976; HEISS *et al.*, 1976; SEEMAN *et al.*, 1976), reforçando a hipótese de alterações dopaminérgicas na patologia. Buscando a melhor compreensão do mecanismo de ação dos antipsicóticos, foram realizados ensaios de competição pela ligação ao receptor de dopamina, onde os valores de IC₅₀ para diversos agentes foram determinados e observou-se que estes correlacionam-se com as doses utilizadas na clínica, bem como com as doses utilizadas

para antagonizar os efeitos de agonistas em ensaios em animais (SEEMAN e LEE, 1975).

A partir da década de 90, estudos *post mortem* associados com técnicas de imagem permitiram a observação de alterações regionalizadas no SNC (DAVIS *et al.*, 1991). Evidências demonstravam que havia uma distribuição diferenciada dos diversos subtipos de receptores de dopamina no SNC, com prevalência de D2 subcortical e D1 cortical. Propôs-se, baseado nos níveis elevados de metabolitos da dopamina no estriado e a resposta clínica ao tratamento com antipsicóticos, que os sintomas positivos da esquizofrenia estavam relacionados com elevados níveis de dopamina nesta estrutura. Por outro lado, a partir de observações comportamentais de pacientes e animais com lesões no lóbulo frontal, atribui-se aos reduzidos níveis de dopamina na região do córtex frontal os sintomas negativos observados na clínica. Contudo, os estudos de imagem não foram conclusivos sobre a existência do aumento compensatório dos níveis de receptores D1 no córtex pré-frontal – frente aos níveis reduzidos de dopamina nesta região –, nem foram observadas alterações na densidade de D1 na região do estriado (ZAKZANIS e HANSEN, 1998).

Quando avaliados os níveis de receptores de dopamina, apesar de não ter sido possível a distinção entre os receptores D2 e D3 devido à baixa especificidade dos radioligantes utilizados, foi observado leve aumento da densidade destes na região do estriado, independente do paciente fazer uso de medicamentos ou não (FARDE *et al.*, 1990; ZAKZANIS e HANSEN, 1998). Outro estudo, utilizando tomografia computadorizada de emissão de fóton único (SPECT, do inglês “single photon emission computerized tomography”) em ensaios de competição com radioligantes, demonstrou o maior deslocamento do radioligante em pacientes com esquizofrenia, indicando a existência de níveis basais elevados de ocupação da dopamina nesses receptores durante

a esquizofrenia (ABI-DARGHAM *et al.*, 2000). Esse aumento pré-sináptico de dopamina na região do estriado foi também confirmado por estudos de imagem por tomografia de emissão de fóton (PET) (LINDSTRÖM *et al.*, 1999; MEYER-LINDENBERG *et al.*, 2002). Sabe-se que em dose clínicas todos antipsicóticos apresentam algum grau de bloqueio dos receptores D2, e que a eficácia terapêutica é atingida somente quando um nível de ocupação adequado é atingido (entre 60 e 80%), independente do perfil de ligação a outros receptores (KAPUR *et al.*, 1999; SEEMAN e TALLERICO, 1999). Este fato corrobora com os achados que demonstram níveis elevados de dopamina pré-sináptica na região do estriado e com os sintomas observados em pacientes e os efeitos obtidos durante a administração de antipsicóticos.

A análise da ligação de antipsicóticos típicos e atípicos por SPECT e PET demonstrou a ocupação de receptores da subfamília D2 no estriado e cortex temporal, sendo que os antipsicóticos atípicos clozapina, olanzapina, quetiapina e sertindol ligaram-se preferencialmente a receptores nas regiões corticais, enquanto que os agentes típicos não demonstraram diferenças. Estes dados, juntamente com outros da literatura, sugerem que enquanto os receptores na região estriatal são fortemente bloqueados pelos agentes típicos – levando ao surgimento de SEP -, os agentes atípicos promovem um bloqueio parcial colaborando para a ausência ou redução de SEP. Ao mesmo tempo, a modulação via bloqueio de receptores D2 e D3 na área límbica/cortical responde pelo efeito clínico antipsicótico (STRANGE, 2001).

1.2.1.4. Antipsicóticos

Devido ao grande número de GPCRs envolvidos em doenças humanas, tanto a indústria farmacêutica quanto a comunidade científica acadêmica, tem realizados investigações na busca de agentes terapêuticos capazes de modular a atividade de tais

receptores. No que concerne a receptores de dopamina, estima-se que em 2007, havia cerca de 5 milhões de usuários de antipsicóticos, resultando em um mercado de aproximadamente 18,6 bilhões de dólares (VISIONGAIN, 2008).

O primeiro antipsicótico a surgir foi a clorpromazina, pertencente a classe das fenotiazinas, na década de 1950. Inicialmente, este agente foi utilizado pelo cirurgião francês Henry-Marie Laborit em seu “Coquetel Lítico”, devido a suas propriedades anti-histamínicas, com a finalidade de reduzir o trauma do procedimento cirúrgico. Devido ao significativo efeito tranquilizante observado nos pacientes, a clorpromazina passou a ser investigada, com sucesso, no tratamento de pacientes psiquiátricos (LOPEZ-MUNOZ *et al.*, 2004). Alguns anos após o início da utilização da clorpromazina, uma nova classe foi introduzida, a das butirofenonas, com o surgimento do antipsicótico haloperidol. Infelizmente, devido ao seu perfil de ligação, estes agentes induzem o surgimento de sintomas extrapiramidais de forma pronunciada, causando grandes transtornos ao paciente e comprometendo a continuidade do tratamento. Este efeito adverso, hoje relacionado aos elevados níveis de ocupação dos receptores de dopamina na via nigroestriatal, inicialmente foi correlacionado com o surgimento dos efeitos clínicos, acreditando-se que um estava associado a outro.

Somente em 1958, com o avanço das pesquisas visando a descoberta de novos agentes antipsicóticos, foi sintetizado o primeiro agente terapêutico atípico: a clozapina (HIPPIUS, 1989). A administração de clozapina permitiu o tratamento dos pacientes sem o aparecimento dos efeitos colaterais observados nos antipsicóticos anteriores, demonstrando pela primeira vez a dissociação entre o surgimento de SEP e a ação clínica, promovendo a melhora da qualidade de vida dos pacientes. Além do mais, a clozapina era capaz de tratar não somente os sintomas positivos da doença como também os negativos. Infelizmente, logo após a sua comercialização, no inícios dos

anos 70, relatou-se vários casos de agranulocitose, um transtorno hematológico grave mas pouco frequente que pode ser provocado por alguns medicamentos, em pacientes que utilizavam este medicamento, levando o fabricante a retirá-la do mercado. Posteriormente, a clozapina foi reintroduzida no mercado sob rígidas condições de observância de uma série de marcadores clínicos nos pacientes. Apesar dos problemas apresentados pela clozapina, com ela iniciou-se uma nova linha de investigação buscando-se novos antipsicóticos que apresentassem aspectos terapêuticos semelhantes a clozapina contudo sem seus efeitos indesejados. Dentre os antipsicóticos atípicos desenvolvidos nas últimas décadas estão: a risperidona, olanzapina, quetiapina, aripiprazol e amisulpirida, entre outros. Contudo, apesar de representarem um avanço quando comparados com os agentes típicos, dentre os novos agentes, nenhum foi capaz de apresentar boas propriedades terapêuticas associadas com a completa ausência de efeitos adversos durante o tratamento, ou mesmo a ausência de SEP observada durante a administração da clozapina (ABOU-SETTA AM *et al.*, 2012; WENTHUR e LINDSLEY, 2013).

Entre os agentes antipsicóticos desenvolvidos alguns permaneceram na clínica ao longo do tempo, como é o caso do agente típico haloperidol. Também, o haloperidol tornou-se uma importante ferramenta na pesquisa, sendo utilizado no estudo comparativo com novos agentes, bem como em trabalhos que buscam melhor compreender a fisiopatologia da doença. De forma semelhante, o antipsicótico atípico eticloprida, que foi inicialmente desenvolvido para uso na clínica, passou a ser amplamente utilizado na pesquisa devido a sua alta seletividade a receptores da subfamília D2 como uma importante ferramenta para elucidar o papel dos receptores de dopamina e sua estrutura. Já outros antipsicóticos atípicos, como a risperidona e aripiprazol, destacaram-se por seus resultados clínicos e segurança, tendo sido liberados

para o tratamento de crianças e adolescentes com irritabilidade associada a autismo (YAN, 2007; CHRISTIAN *et al.*, 2012; SHARMA e SHAW, 2012).

Dentre os antipsicóticos, a eticloprida é um antagonista seletivo D2/D3 de grande importância para a pesquisa farmacológica e que foi utilizada na co-cristalização com o receptor de dopamina humano D3. De grande relevância clínica é o agente haloperidol, um antipsicótico típico com alta afinidade ao receptor de dopamina, o qual tem sido utilizado há anos devido a sua efetividade no tratamento de sintomas positivos da esquizofrenia e seu baixo custo. Já a risperidona é um antipsicótico atípico que apesar de possuir alta afinidade ao receptor de dopamina, apresenta reduzida incidência de SEP. Este agente é também utilizado no tratamento de crianças e adolescentes com esquizofrenia e irritabilidade associada com autismo. Por suas características peculiares, esses três antipsicóticos terão o seu perfil de ligação ao receptor de dopamina D3 estudados nesta trabalho. As estruturas químicas da eticloprida, do haloperidol e da risperidona estão representadas na figura 5, e uma breve descrição desses agentes é dada no texto que segue.

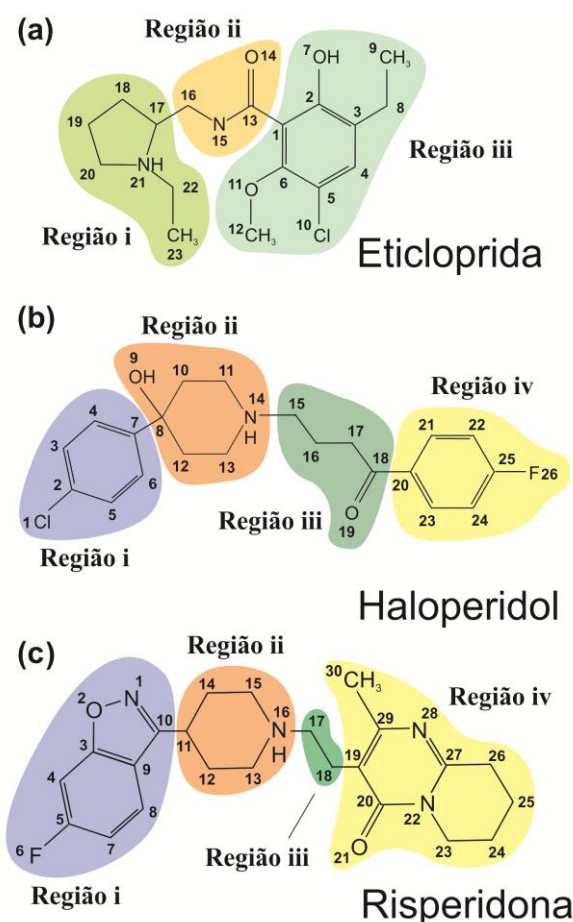


Figura 5: Estrutura molecular do antipsicótico típico (a) haloperidol, $C_{21}H_{23}ClFNO_2$; e, atípicos (b) risperidona, $C_{23}H_{27}FN_4O_2$, e (c) eticloprida, $C_{17}H_{25}ClN_2O_3$.

A eticloprida, (2S(-)-3-cloro-5-etil-N-[(1-etil-2-pirrolidínil)metil]-6-hidroxi-2-metoxibenzamida; fórmula química $C_{17}H_{25}ClN_2O_3$), é um análogo de benzamida substituída que apresenta alta afinidade e seletividade para receptores da subfamília D2. Apesar de não estar presente na clínica, sua importância decorre da sua utilização em testes pré-clínicos durante a investigação da função e papel dos receptores de dopamina, bem como da influência do bloqueio destes na regulação das vias dopaminérgicas (MARTELLE e NADER, 2008). Também, a relevância da eticloprida como ferramenta de estudo destaca-se pela publicação dos dados cristalográficos deste antipsicótico co-cristalizado com o receptor de dopamina humano D3 (CHIEN, E. Y. T. *et al.*, 2010).

O haloperidol (4-[4-(4-clorofenil)-4-hidroxi-piperidinil]-1-(4-fluorofenil)butanona; fórmula química $C_{21}H_{23}ClFN_2O_2$) é um antipsicótico típico que foi sintetizado em 1958 pela indústria Janssen Pharmaceutical (JANSSEN *et al.*, 1960). Desde então, tem sido utilizado clinicamente no tratamento de sintomas positivos da esquizofrenia, mania e desordens neurológicas (MUTSCHLER *et al.*, 1995). O haloperidol liga-se a vários receptores do SNC, tais como adrenérgicos e muscarínicos (ROTH *et al.*, 2004). Contudo, seu efeito terapêutico tem sido atribuído ao bloqueio de receptores de dopamina da subfamília D2 no mesocórtex e no sistema límbico. (SEEMAN, 2001; LUEDTKE *et al.*, 2012) De acordo com estudos de Malmberg e colaboradores (1998), este agente atua como antagonista em receptores D2, enquanto age como agonista inverso em receptores D3 (MALMBERG *et al.*, 1998). Apesar de desencadear o surgimento de sintomas extrapiramidas devido ao bloqueio de receptores D2 na via nigroestriatal (ANDREASSEN e JØRGENSEN, 2000), o haloperidol ainda é amplamente utilizado na clínica devido ao alto custo dos novos agentes atípicos, bem como os efeitos colaterais associados ao uso destes (MELTZER *et al.*, 1996; MOHAMMAD *et al.*, 2008; SHARMA e SHAW, 2012).

O antipsicótico atípico risperidona (3-(2-(4-(6-fluoro-1,2-benzoxazolil)-1-piperidinil)etil)-2-metil-6,7,8,9-tetra-hidro-4H-pirido[1,2-a]pirimidinona; fórmula química $C_{23}H_{27}FN_4O_2$) é um derivado de benzisoxazol utilizado na clínica para o tratamento de sintomas positivos e negativos da esquizofrenia. Em outubro de 2006, a agência reguladora norte-americana *Food and Drug Administration* (FDA) autorizou o uso da risperidona para o tratamento de crianças e adolescentes – entre 5 e 16 anos – diagnosticadas com esquizofrenia ou com sintomas de irritabilidade associado com autismo (YAN, 2007; SHARMA e SHAW, 2012). A importância da risperidona no tratamento pediátrico deve-se a sua eficácia no manejo de sintomas e problemas

comportamentais em crianças, apresentando raros e toleráveis efeitos adversos, apesar de estar associada ao ganho rápido de peso (SHEA *et al.*, 2004; SHARMA e SHAW, 2012). Apesar de este antipsicótico possuir afinidade por receptores de serotonina e dopamina (JANSSEN *et al.*, 1988), há objeções quanto a necessidade e relevância do bloqueio de receptores 5-HT₂ para o tratamento da psicose (KAPUR e SEEMAN, 2001).

1.2.1.4.1. Antipsicóticos Atípicos: Hipóteses de Mecanismo de Ação

Enquanto a administração de antipsicóticos típicos está correlacionada com o bloqueio dos receptores D2 da via nigroestriatal, levando ao desencadeamento de SEP e discinesia tardia, antipsicóticos atípicos parecem não afetar esta via na mesma magnitude (STAHL, 2003), apresentando cerca de 30% menos eventos relacionados SEP. Outra diferença marcante entre antipsicóticos típicos e atípicos é o fato de que a maioria dos antipsicóticos atípicos não promove o aumento dos níveis de prolactina como observado com os agentes típicos (risperidona é uma exceção) (KAPUR e SEEMAN, 2001).

Dentre as várias hipóteses que surgiram para explicar a diferença entre o mecanismo de ação dos antipsicóticos típicos e atípicos, destacam-se duas: (i) os agentes atípicos apresentam maior relação 5-HT₂/D2 do que os típicos, ligando-se preferencialmente nos receptores 5-HT_{2A} pré-sinápticos na região nigroestriatal e assim reduzindo a incidência de SEP por induzirem o aumento da liberação de dopamina na fenda sináptica (MELTZER, 1999; NEWMAN-TANCREDI e KLEVEN, 2011); (ii) antipsicóticos típicos possuem alta afinidade por receptores de dopamina, enquanto que os atípicos possuem baixa afinidade, dissociando-se rapidamente dos receptores e sendo facilmente deslocados pelo aumento da concentração local de dopamina. Desta forma,

os receptores permaneceriam bloqueados por tempo suficiente para atingir-se o efeito terapêutico, mas não tanto a ponto de desencadear os efeitos adversos extrapiramidais (SEEMAN e TALLERICO, 1999; KAPUR e SEEMAN, 2001).

Atualmente, prevalece o entendimento de que todo efeito antipsicótico passa necessariamente pelo bloqueio de receptores de dopamina, apesar de muitos agentes ligarem-se a outros receptores. Admite-se que, embora alguns antipsicóticos atípicos possuam afinidade por receptores 5-HT_{2A} (MELTZER *et al.*, 1989; MELTZER, 1999), o bloqueio deste não é necessário, nem relevante para o tratamento da psicose (KAPUR e SEEMAN, 2001), uma vez que o limiar de ocupação de receptores D2 necessário para a ação antipsicótica (entre 60 e 80%) ou para o surgimentos de SEP (cerca de 80%) não é alterado apesar do bloqueio de receptores 5-HT_{2A} (SEEMAN, 2002). Conforme destacado por Seeman (2002), o favorecimento da razão 5-HT₂/D2 para os antipsicóticos atípicos deve-se ao fato de que ambos os antipsicóticos testados (típicos e atípicos) não apresentaram diferença significativa de afinidade por 5-HT₂, enquanto que os atípicos apresentaram menor afinidade para D2 (SEEMAN, 2002). Além do mais, foi demonstrado que alguns agentes atípicos, como a amisulpirida e remoxiprida, não apresentam afinidade por 5HT₂.

Desta forma, a hipótese mais aceita atualmente, e portanto utilizada neste trabalho, propõe que a rápida dissociação dos antipsicóticos nos receptores D2 e o rápido deslocamento dos antipsicóticos por ondas de dopamina são suficientes para produzirem as características de agentes atípicos. Por esse mecanismo, os antipsicóticos atípicos desligam-se mais rápido dos receptores de dopamina do que os antipsicóticos típicos, bloqueando os receptores por tempo suficiente para atingir-se o efeito terapêutico, mas dissociando-se rapidamente, de forma a evitar os altos níveis de ocupação dos receptores que desencadeiam os efeitos adversos extrapiramidais

(KAPUR e SEEMAN, 2001). A representação esquemática do comportamento proposto para os antipsicóticos típicos e atípicos no receptor de dopamina está representada na figura 6.

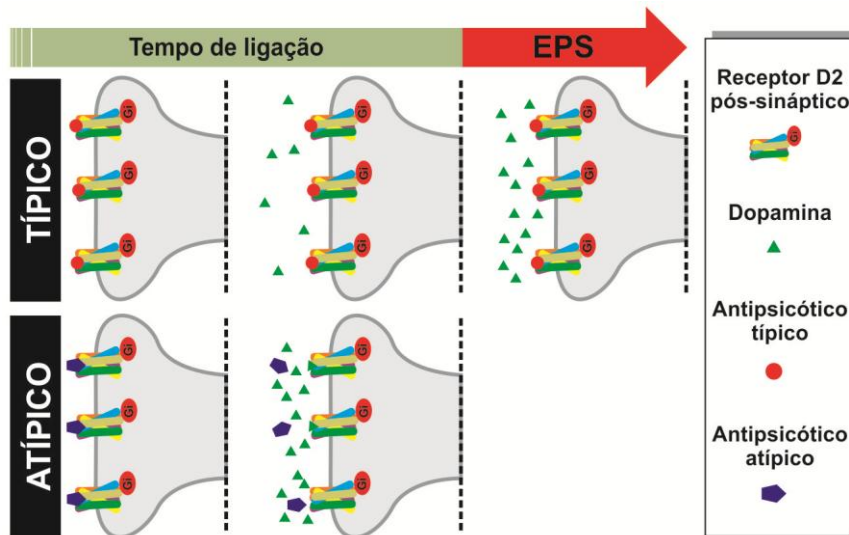


Figura 6: Hipótese de mecanismo de atipicidade dos antipsicóticos. Antipsicóticos típicos ligam-se com alta afinidade ao receptor de dopamina e mantêm-se ligados por um longo período, de forma a aumentar a ocupação dos receptores e provocar sintomas extrapiramidais (SEP). Antipsicóticos atípicos ligam-se com menor afinidade ao receptor de dopamina e por isso são facilmente dissociados. Este mecanismo promove a ação terapêutica dos agentes atípicos com a redução/ausência da manifestação de SEP devido ao rápido restabelecimento da sinalização dopaminérgica basal.

Tendo em vista a relevância do receptor de dopamina D3 na fisiopatologia da esquizofrenia e a importância de conhecermos o mecanismo de ação de importantes antipsicóticos para desenvolvermos novos agentes terapêuticos atípicos mais potentes e com menos efeitos colaterais, neste trabalho foram utilizados os dados cristalográficos da eticloprida co-cristalizada com o receptor de dopamina humano D3 para explorar, através do uso de técnicas computacionais envolvendo métodos clássicos e quânticos, o perfil de interação dos antipsicóticos eticloprida, haloperidol e risperidona com os resíduos de aminoácido que compõem o sítio de ligação do receptor D3.

2. Objetivos

2.1. Objetivo Geral

Estudar, através de métodos de bioquímica computacional, as interações entre o receptor de dopamina humano D3 e antipsicóticos típicos e atípicos, a fim de caracterizar as interações individuais relativas de cada resíduo de aminoácido integrante do sítio de ligação.

2.2. Objetivos Específicos

2.2.1. Consolidar protocolos de uso de ferramentas clássicas² e quânticas³ para a análise da interação molecular envolvendo o receptor humano de dopamina D3 e os antipsicóticos eticloprida, haloperidol e risperidona.

2.2.2. Utilizar cálculos quânticos para descrever as interações entre o antipsicótico eticloprida e o receptor humano de dopamina D3, através da análise dos dados cristalográficos (PDBID: 3PBL).

2.2.3. Utilizar cálculos clássicos e quânticos para descrever as interações entre antipsicóticos haloperidol e risperidona e o receptor humano de dopamina D3, através da análise da estrutura tridimensional gerada por ancoramento molecular⁴ seguido de refinamento geométrico⁵.

² Ver em anexos, seção: 8.1.1. Métodos Clássicos (Mecânica Molecular).

³ Ver em anexos, seção: 8.1.3. Métodos de Mecânica Quântica.

⁴ Ver em anexos, seção: 8.1.5. Ancoramento Molecular (*Docking*).

⁵ Neste estudo obtido através da minimização da energia do sistema, através da correção da geometria de regiões do modelo que apresentam contatos estéricos e/ou eletrostáticos desfavoráveis.

PARTE II



3. Publicações

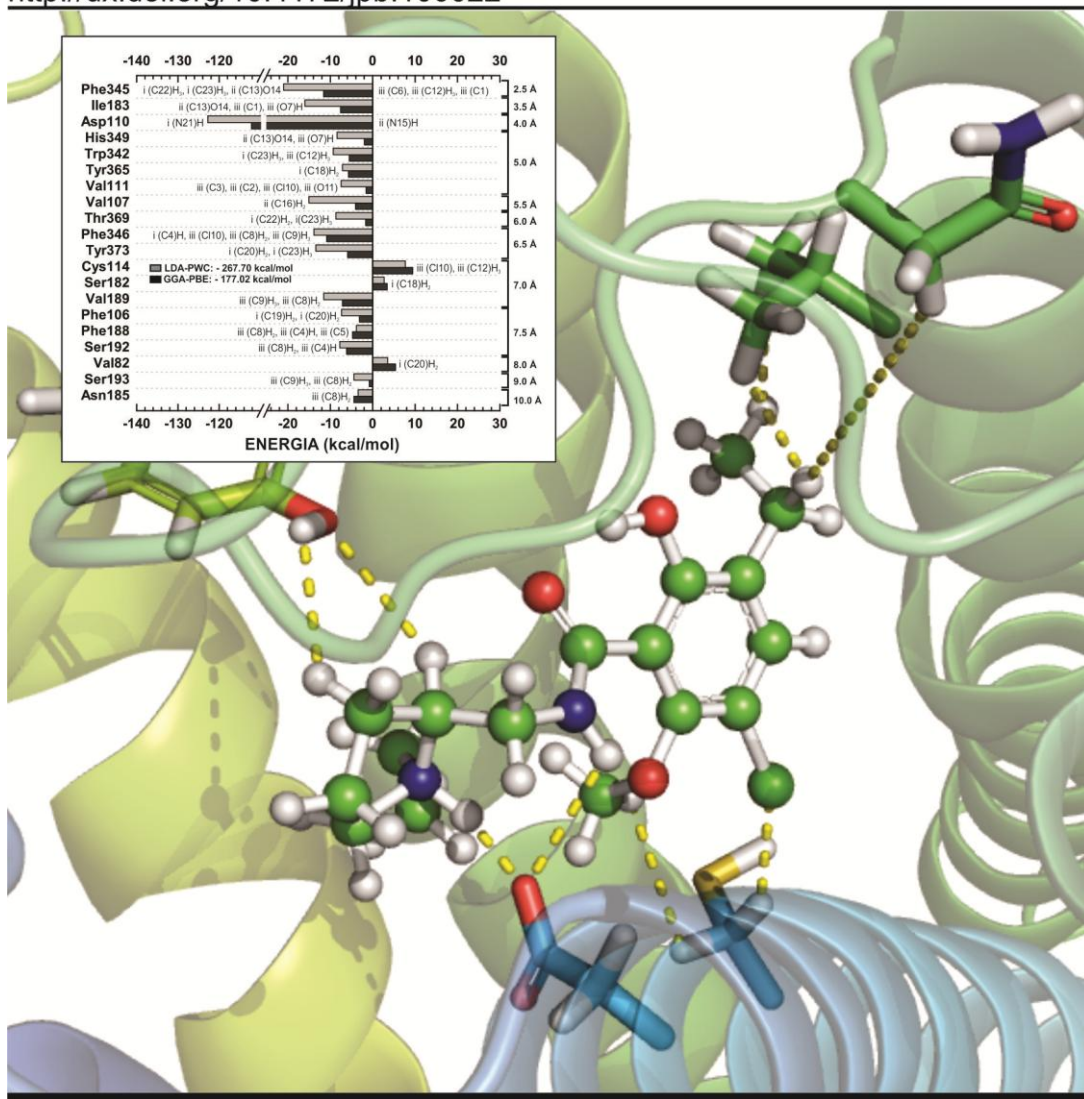
3.1. Capítulo 1: Quantum Biochemistry Description of the Human Dopamine D3 Receptor in Complex with the Selective Antagonist Eticlopride

3.2. Capítulo 2: Antipsychotic Haloperidol Binding to the Human Dopamine D3 Receptor: Going Beyond Docking Through QM/MM Refinement for the Design of Improved Schizophrenia Medicines

3.3. Capítulo 3: Two Docking Discovered Binding Poses for Risperidone in Dopamine D3 Receptor: Insights on the Fast-off Mechanism Through Quantum Biochemistry and Molecular Dynamics Simulations

Quantum Biochemistry Description of the Human Dopamine D3 Receptor in Complex with the Selective Antagonist Eticlopride

Publicado na revista:
 Journal of Proteomics & Bioinformatics em 27 de julho de 2012.
<http://dx.doi.org/10.4172/jpb.100022>



Quantum Biochemistry Description of the Human Dopamine D3 Receptor in Complex with the Selective Antagonist Eticlopride

Geancarlo Zanatta^{1*}, Ito L. Barroso-Neto², Victorio Bambini-Junior¹, Mellanie F. Dutra¹, Eveline M. Bezerra³, Roner F. da Costa⁴, Ewerton W. S. Caetano⁵, Benildo S. Cavada², Valder N. Freire⁴ and Carmem Gottfried¹

¹Department of Biochemistry at Federal University of Rio Grande do Sul, 90035-003 Porto Alegre, RS, Brazil

²Department of Biochemistry at Federal University of Ceará, 60455-760 Fortaleza, CE, Brazil

³Post-graduate Program in Pharmaceutical Sciences, Pharmacy Faculty, Federal University of Ceará, 60430-372 Fortaleza, CE, Brazil

⁴Department of Physics at Federal University of Ceará, 60455-760 Fortaleza, CE, Brazil

⁵Federal Institute of Education, Science and Technology, 60040-531 Fortaleza, CE, Brazil

Abstract

In the quest to improve the treatment of Parkinson's disease and Schizophrenia, one of the proposed strategies has been the development of subtype selective ligands targeting D₂ and D₃ dopamine receptors. An essential advance for this type of strategy was the recent crystallographic elucidation of the human dopamine D₃ receptor structure in complex with the antagonist eticlopride, revealing important features of the ligand-binding pocket. Taking this data into account, we have performed a quantum biochemistry investigation of the eticlopride binding to D₃ in order to understand the implications and the individual contribution of amino acid residues at the binding pocket. The contribution of the residues were evaluated using the molecular fractionation with conjugate caps approach and binding energies calculated within the framework of the density functional theory using both the local density and generalized gradient approximations. The simulations show that the total interaction energy of eticlopride bound to D₃ stabilizes only for a pocket radius of at least 8.0Å. The strongest estimated drug-residue interaction energy was observed for Asp110 followed, among others, by Phe345, Phe346, Ile183, Val107, Tyr373, Val189, Trp342, Cys114 and Val82 hydrogen and van der Waals bonds, the later being a repelling residue which was not considered to be important in the original crystallographic data analysis. Our results highlight the key amino acid residues involved in the binding of antipsychotics to D3R and collaborate to a potential further analysis with regard to the binding of different antagonists in members of the dopamine receptor family.

Keywords: Quantum biochemistry; Dopamine receptor; Eticlopride; D3 binding pocket; Quantum mechanics; DFT; Antipsychotic; *Ab initio*

Introduction

Dopamine is a fundamental neurotransmitter associated with fine movement coordination, cognition, emotion, affect, memory and the reward pathway. Impairments in its metabolism lead to severe disorders such as Parkinson's disease and schizophrenia [1-7]. Dopamine receptors belong to the G protein-coupled receptor (GPCR) family and are classified into two subfamilies: D1-like receptors (D1 and D5), which activate adenylyl cyclase through the stimulatory G-protein alpha subunit, and D2-like receptors (D2, D3 and D4) coupled to the inhibitory G-protein alpha subunit with inhibitory effect over adenylyl cyclase [8,9]. Due to alternative splicing events during the maturation of the receptor pre-mRNA and gene polymorphism, more than five different receptors can be observed and among them, two forms of D2 receptors (D2R) [10].

It is postulated that many antipsychotics exert their therapeutic effects through the blockage of dopamine receptors [11,12]. According to the binding profile, side effect events and mechanisms of action, antipsychotics are classified as typical or atypical [11-13]. Typical antipsychotics block D2R in the mesolimbic and nigrostriatal pathway leading to extrapyramidal symptoms (EPS) and tardive dyskinesia, while atypical antipsychotics are associated with fewer side effects [12]. Two hypothesis are frequently used to explain this phenomena: (i) the dopamine receptor blockade in the nigrostriatal pathway is reversed by serotonin receptor blockade [14,15]; (ii) atypical agents have fast dissociation from the dopamine receptor, lasting only long enough to cause antipsychotic action, but not long enough to cause the side effects associated with typical agents [13].

The focus of this work is on eticlopride, (C₁₇H₂₅ClN₂O₃), 2S(-)-3-chloro-5-ethyl-N-[(1-ethyl-2-pyrrolidinyl)methyl]-6-hydroxy-2-methoxybenzamide, which is a substituted benzamide analog with high affinity and selectivity for D2-like receptors that was initially developed as a potential antipsychotic agent [16]. A great deal of research has utilized this drug to understand better the central dopamine receptor function, the role of D2-like receptors in behavior, and the influence of blockade of these receptors on several preclinical animal models. While eticlopride is not used clinically, it remains a viable research tool for understanding dopamine receptor function and behavior [16].

Recently, the resolved structure at 3.15Å of the human dopamine D3 receptor (D3R) co-crystallized with the antagonist eticlopride, a potent D2R/D3R antagonist, has been published PDB ID: 3PBL [17]. The high degree of homology between D3R and D2R, especially in the binding pocket, makes this structure a key tool to study, at the molecular level, the mechanisms surrounding the interactions of agonists and antagonists with the receptor, the stabilization of the binding energy and the structural determinants of receptor specificities. Additionally,

***Corresponding author:** Geancarlo Zanatta, Departamento de Bioquímica, Rua Ramiro Barcelos, 2600 – anexo, Bairro Santa Cecília 90035-000 - Porto Alegre – RS, Brazil, Tel: +55 51 3308-3570 / 3308-5551; E-mail: geancarlo.zanatta@gmail.com

Received June 05, 2012; Accepted July 24, 2012; Published July 27, 2012

Citation: Zanatta G, Barroso-Neto IL, Bambini-Junior V, Dutra MF, Bezerra EM, et al. (2012) Quantum Biochemistry Description of the Human Dopamine D3 Receptor in Complex with the Selective Antagonist Eticlopride. J Proteomics Bioinform 5: 155-162. doi:[10.4172/jpb.1000229](http://dx.doi.org/10.4172/jpb.1000229)

Copyright: © 2012 Zanatta G, et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

information from eticlopride contact residues at the pocket side is remarkable as it is known that it have a greater affinity to D2R over D3R and no affinity for D1R [16,17]. The crystal structure of the human D3R provides an opportunity to identify subtle structural differences, at the molecular level, between closely related GPCRs that can be exploited for novel drug design [17]. On the other hand, a DOCK2010 participation involved in the blind prediction of the dopaminergic D3 receptor in complex with the D2/D3 selective antagonist eticlopride, succeeded in producing a correctly predicted eticlopride-D3 receptor complex out of three submitted models [18].

The use of quantum *ab initio* simulations commonly applied in chemistry to investigate biological systems at the molecular level is very tempting. However, it demands a high computational cost due to the very large number of electrons involved. One way to overcome this difficulty is to describe the system by using the electronic density $\rho(r)$, which depends on three space coordinates only, instead of the wave function, which changes on the $3N$ space coordinates (N being the number of electrons). Such is the essential feature of Density Functional Theory (DFT), where the total energy of a multielectronic system is expressed as a functional of the electron charge density, which is found after solving the Kohn-Sham equations [19,20]. Another important approach to work through quantum mechanics calculations on large molecules or molecular systems is the use of fragmentation methods to make it more computationally acceptable and, at the same time, maintain the good accuracy of the quantum calculation [21]. The Molecular Fractionation with Conjugate Caps (MFCC) methods is a useful approach to calculate interaction energies for protein-ligand systems. In this method, the peptide bonds of the protein are fragmented and the bonds are capped with portions of the neighboring amino-acid residues of the molecule in order to resemble the local environment [21-25].

In this context, a detailed understanding of the eticlopride bonding to each D3R residue in the binding pocket by quantum biochemistry methods [26] is essential for its energetic description and also to determine the individual contributions to the total binding energy. In addition, this approach may contribute to the molecular structure improvement and/or to the design of new antipsychotic drugs. As emphasized by Zhou et al. [27], quantum mechanical (QM) methods are becoming popular in computational drug's design and development, mainly because high accuracy is required to estimate (relative) binding affinities. According to Raha et al. [28], the routine use of QM methods in all phases of *in silico* drug design is of upmost importance for the evolution of this field. Recent works in our group have employed quantum approaches combined with classical molecular dynamics to predict the adsorption of ascorbic acid on the C60 fullerene and suggested the use of this formulation to act against the oxidative effect of C60 [29]. Also, using this approach, it was possible to predict the theoretical absorption levels of ibuprofen on C60 fullerene seeking its transdermal delivery [30]. Moreover, the effectiveness of drug inhibition of HMG-CoA reductase using quantum biochemistry computations were predicted by comparing the binding energy profile of different statins [31]. QM methods can also be used locally to improve crystal structures [24]. While quantum refinement is computationally expensive if compared with standard crystal structure refinement techniques, it may become a standard tool, as the computers are becoming faster and cheaper, especially when the refined site is of major interest [24].

The purpose of this work is to present an improved description

of the eticlopride binding to D3R through a quantum biochemistry investigation of their interaction with close residues inside binding pockets of varying radii. The individual contribution of amino acid residues involved in D3R-eticlopride binding was calculated using the X-ray structure of the D3R co-crystalized with eticlopride [17]. The present study highlights the significant energy contribution of Asp110, and demonstrated for the first time the participation of Val107, Ser182, Phe188, Val82 and Asn185 on the binding of eticlopride to D3.

Materials and Methods

Structural data

The calculations performed during this study took advantage of the X-ray crystal structure of human dopamine D3 receptor in complex with eticlopride (PDB ID: 3PBL) determined with a resolution of 3.15Å. The crystal asymmetric unit contains two receptors (A and B) in an antiparallel orientation, both exhibiting slight differences in shape. Thus, we arbitrarily chose the receptor A to use as a model of study. All residues of amino acids within a radius up to 10Å from the centroid of eticlopride were taken into account. The protonation state of eticlopride at physiological pH was obtained using the Marvin Sketch code version 5.4.1.0 (Marvin Beans Suite- ChemAxon). The crystallographic structure modification was performed by adding a single hydrogen atom into the amine group at the ethyl-pyrrolidine ring of eticlopride followed by the charging setup to +1 (electron charge = -1).

Classical and DFT calculations

Hydrogen atoms were inserted into the D3 X-ray structure and their positions were optimized classically, keeping the other atoms frozen. The optimization procedure was performed using the Forcite code with convergence tolerances set to 2.0×10^{-5} kcal·mol⁻¹ (total energy variation), 0.001 kcal·mol⁻¹Å⁻¹ (maximum force per atom) and 1.0×10^{-5} Å (maximum atomic displacement).

Calculations at DFT level, using the DMOL3 code [32,33], were performed using: 1) the Local Density Approximation (LDA) for the exchange-correlation functional with PWC parameterization, and 2) the Generalized Gradient Approximation (GGA) with PBE parameterization. The DNP numerical basis set was adopted to expand the Kohn-Sham orbital for all electrons. The orbital cutoff, which is a parameter used to control the quality of the numerical basis set and the numerical integrations performed during the computations was set to 3.7Å. This cutoff serves to reduce computation time with little impact on the accuracy of the results and is a very fine value for the atoms involved in the system under study. The total energy variation, which specifies the self-consistent field (SCF) convergence threshold, was selected to be 10^{-6} Ha, ensuring a well converged electronic structure for the system.

Molecular fractionation with conjugate caps (MFCC)

The MFCC scheme is a very useful approach to achieve an accurate description of biological systems through quantum calculations [21-25]. To avoid missing important amino acid residue interactions, all amino acid residues within an increasing radius from the centroid of eticlopride were taken into account until energy convergence has been achieved (see "Energy stabilization versus residue distance to the centroid", below). The set of chosen amino acid residues were used to form individual sets of capped fragments, including disulfide concaps when necessary (Figure 1). The eticlopride molecule is represented by M and R^i is the i -th amino acid residue interacting with M . The C^{i-1}

(Cⁱ⁺¹) cap is made from the residue covalently bound to the amine (carboxyl) group of Rⁱ with hydrogen atoms added wherever necessary to passivate the dangling bonds.

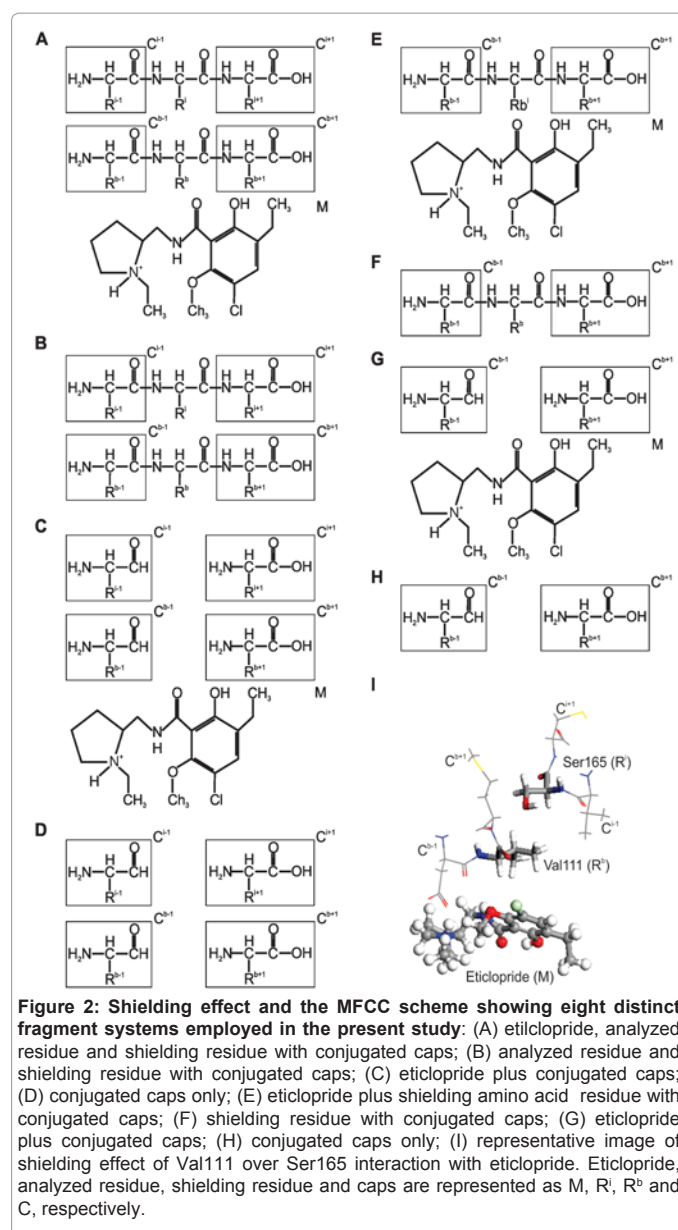
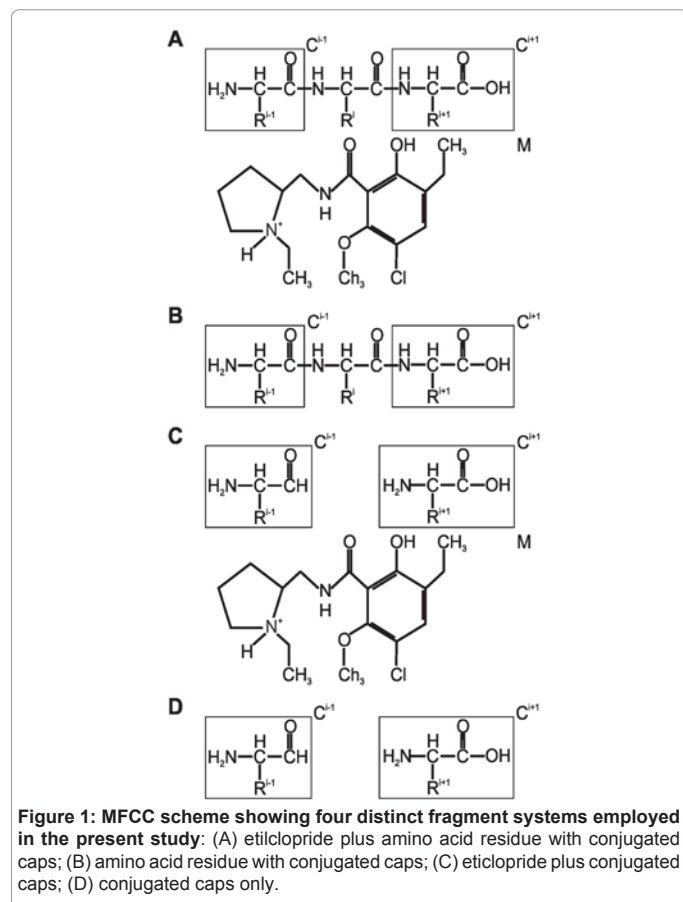
The interaction (binding) energy between the eticlopride molecule M and each amino acid residue Rⁱ, E(M-Rⁱ), is calculated at DFT level [32,33], according to:

$$E(M-R^i) = E(M-C^{i-1}R^iC^{i+1}) - E(C^{i-1}R^iC^{i+1}) - E(M-C^{i-1}C^{i+1}) + E(C^{i-1}C^{i+1}) \quad (1)$$

At the right side of Eq. (1), the first term E(M-Cⁱ⁻¹RⁱCⁱ⁺¹) is the total energy of the system formed by the eticlopride and the capped residue; the second term, E(Cⁱ⁻¹RⁱCⁱ⁺¹), gives the total energy of the capped residue alone, while the third term, E(M-Cⁱ⁻¹Cⁱ⁺¹) is the total energy of the system formed by the set of caps and M; finally, E(Cⁱ⁻¹Cⁱ⁺¹) is the total energy of the system formed by the isolated caps.

The BIRD Panel

The energies of individual amino acid residues are plotted into the panel BIRD (Binding site, Interaction energy and Residues Domain), which shows clearly: (i) the binding energy (in kcal•mol⁻¹) of the drug to each residue at the binding site depicted using horizontal bars, from which one can assess quantitatively the relevance of each residue at the binding site, whether attracting or repelling the drug; (ii) the most important residues contributing to the binding, which are shown in the column of residues in the left side; (iii) the region i, ii or iii of eticlopride closer to each residue; and (iv) the radius distance of each residue to the eticlopride centroid, as given in the right side. The total binding energy was obtained by adding up the individual contribution of each residue.



Shielding effect

The shielding effect decreases the attraction between the Rⁱ residue and the eticlopride molecule M and is due to the presence of neighbour residues (R^b) placed between eticlopride and Rⁱ. In this situation, the interaction (binding) energy E(M-Rⁱ) is calculated in two steps (Figure 2). First, the energy, taking in to account both the R^b and Rⁱ contributions, E(M-R^{i+b}), is obtained:

$$E(M-R^{i+b}) = E(M-C^{i-1}R^iC^{i+1} C^{b-1}R^bC^{b+1}) - E(C^{i-1}R^iC^{i+1} C^{b-1}R^bC^{b+1}) - E(M-C^{i-1}C^{i+1} C^{b-1}C^{b+1}) + E(C^{i-1}C^{i+1} C^{b-1}C^{b+1}) \quad (2)$$

Secondly, the E(M-R^b) energy contribution is calculated:

$$E(M-R^b) = E(M-C^{b-1}R^bC^{b+1}) - E(C^{b-1}R^bC^{b+1}) - E(M-C^{b-1}C^{b+1}) + E(C^{b-1}C^{b+1}) \quad (3)$$

Finally, the corresponding individual interaction (binding) energy E(M-Rⁱ) is obtained according to:

$$E(M-R^i) = E(M-R^{i+b}) - E(M-R^b) \quad (4)$$

Energy stabilization versus residue distance to the centroid

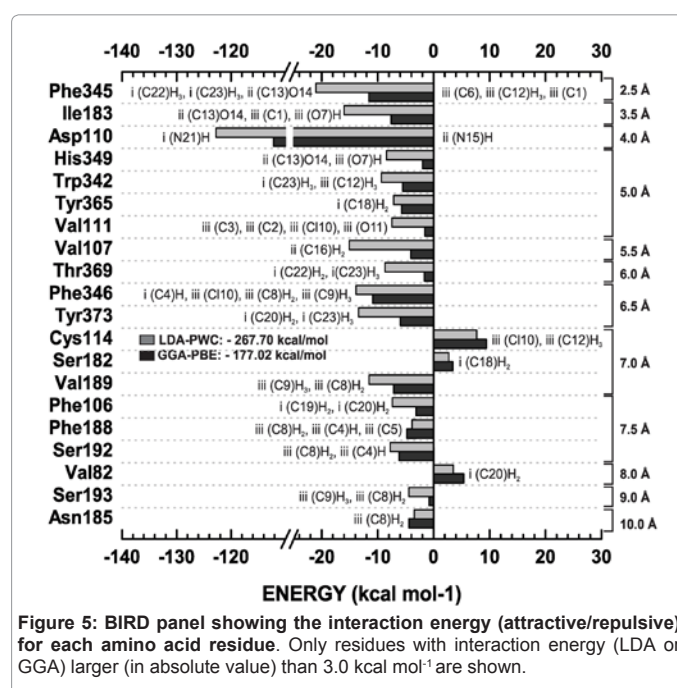
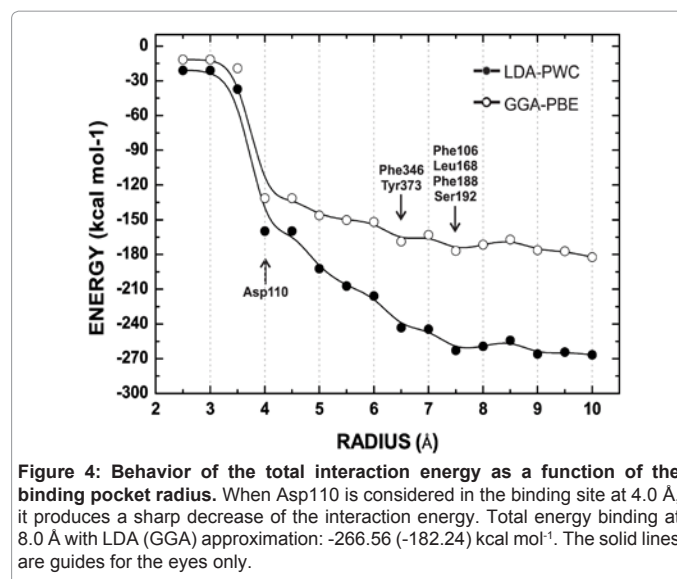
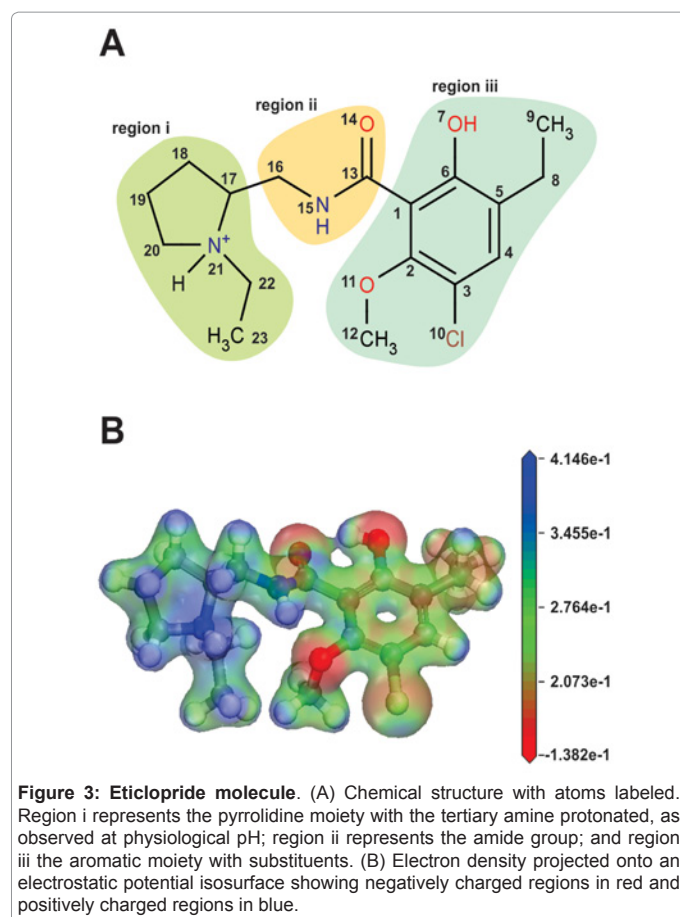
To avoid using an arbitrary binding pocket size which could risk missing residues with important contributions to the binding energy, the binding radius was varied until the total binding energy variation was very small. The total binding energy as a function of the binding site radius was obtained for a 2.5-10 Å radius range with increasing steps of 0.5 Å (only residues with at least one atom inside an imaginary sphere centered at the drug centroid were taken into account to compute the total binding energy). The converged binding pocket radius was achieved when the variation of the total binding energy was smaller than 10% after a radius size increase by 2 Å.

Results

In order to best mimic the physiologic conditions, an eticlopride molecule structure was assessed at pH 7.2 and showed protonation at the amine group of the pyrrolidine region. Protonated eticlopride with numbered atoms is shown in Figure 3-A, and its electron density onto an electrostatic potential isosurface is represented in Figure 3-B.

To investigate the binding mechanism of eticlopride, hydrogen atoms were added to the D3 receptor-eticlopride crystallographic structure (receptor-eticlopride) and their positioning was optimized to minimize the total energy. This procedure generated a new structure with shorter distances among residues and eticlopride (Table 1).

Afterwards, to ensure that all relevant residues were included into



the QM analysis, the dependence of the total binding energy on the binding site radius (measured from the eticlopride centroid) was assessed (Figure 4). According to our simulations, interaction energy stabilization was achieved for a binding site radius of 8.0 Å (nineteen residues included, LDA: -259.21 kcal•mol⁻¹; GGA: -171.48 kcal•mol⁻¹), with no significant change for a radius up to 10 Å (LDA: -266.56 kcal•mol⁻¹; GGA: -182.24 kcal•mol⁻¹). The most important residues within 8.0 Å are: Phe345, Ile183, Asp110, His349, Trp342, Tyr365, Val111, Val107, Thr369, Phe346, Tyr373, Cys114, Ser182, Val189, Leu168, Phe106, Phe188, Ser192 and Val82.

The complete list of individual energy contribution of 42 residues (using LDA and GGA approximations) as well as the distance to the eticlopride centroid are depicted in Table 2. Among them, twenty contribute significantly to the total binding energy as shown in the

Residues	Distance(Å)	Eticlopride		Residues	Distance(Å)	Eticlopride	
Asn 185	7.6	iii	(C8)H ₂	Ser192	2.3	iii	(C8)H ₂
Asp 110	1.7	i	(N21)H	Ser192	2.6	iii	(C4)H
Asp 110	2.8	ii	(N15)H	Ser193	3.3	iii	(C8)H ₂
Cys 114	2.6	iii	C110	Ser193	2.3	iii	(C9)H ₃
Cys 114	3.4	iii	(C12)H ₃	Ser196	3.1	iii	(C4)H
His 349	3.1	ii	(C13)O14	Ser196	4.0	iii	C110
His 349	2.7	iii	(O7)H	Thr115	4.1	iii	C110
Ile 183	3.1	ii	(C13)O14	Thr369	2.1	i	(C22)H ₂
Ile 183	2.6	iii	(C1)	Thr369	3.2	i	(C23)H ₃
Ile 183	2.8	iii	(O7)H	Trp342	2.4	i	(C23)H ₃
Leu 89	3.7	i	(C19)H ₂	Trp342	2.9	iii	(C12)H ₃
Phe 106	2.3	i	(C19)H ₂	Tyr365	2.7	i	(C18)H ₂
Phe 106	3.3	i	(C20)H ₂	Tyr365	3.1	i	(C17)H
Phe 188	4.2	iii	(C8)H ₂	Tyr373	2.4	i	(C20)H ₂
Phe 188	5.1	iii	(C4)H	Tyr373	3.4	i	(N21)H
Phe 188	5.0	iii	(C3)	Tyr373	2.6	i	(C23)H ₃
Phe 345	2.6	i	(C22)H ₂	Val107	3.8	i	(C19)H ₂
Phe 345	2.2	ii	(C13)O14	Val107	2.7	ii	(C16)H ₂
Phe 345	2.8	iii	(O7)H	Val111	2.4	iii	C110
Phe 345	2.9	iii	(C2)	Val111	2.9	iii	O11
Phe 345	3.4	iii	(C12)H ₃	Val111	2.9	iii	C6
Phe 345	3.1	iii	(C9)H ₃	Val111	3.1	iii	C5
Phe 346	2.6	iii	(C4)H	Val189	3.1	iii	(C9)H ₃
Phe 346	3.3	iii	C110	Val189	2.4	iii	(C8)H ₂
Phe 346	2.6	iii	(C8)H ₂	Val350	3.1	iii	(C9)H ₃
Phe 346	2.8	iii	(C9)H ₃	Val82	4.3	i	(C20)H ₂
Ser 182	3.6	i	(C18)H ₂	Val86	3.0	i	(C20)H ₂
Ser 182	4.4	ii	(C16)H ₂	Val86	3.3	i	(C19)H ₂

Table 1: Centroid distances between eticlopride and the amino acid residues at the binding site after inserting and optimizing hydrogen atomic coordinates.

Residue	E _{LDA}	E _{GGA}	Radius	Residue	E _{LDA}	E _{GGA}	Radius
Phe345	-21.04	-11.61	2.5	Thr108	0.90	1.03	8.5
Ile183	-15.99	-7.57	3.5	Val86	0.30	0.27	8.5
Asp110	-122.78	-112.21	4.0	Cys181	-2.68	-2.97	9.0
His349	-8.44	-1.97	5.0	Leu109	-0.83	-0.81	9.0
Trp342	-9.31	-5.53	5.0	Ser165	-2.17	-2.05	9.0
Tyr365	-7.15	-5.72	5.0	Ser184	0.93	0.87	9.0
Val111	-7.47	-1.56	5.0	Ser193	-4.44	-0.83	9.0
Val107	-15.07	-4.08	5.5	Ser196	-0.58	-0.88	9.0
Thr369	-8.70	-1.68	6.0	Thr115	1.19	0.77	9.0
Phe346	-13.87	-10.86	6.5	Thr368	-1.51	-1.85	9.0
Try373	-13.42	-5.94	6.5	Val350	-1.52	-1.52	9.0
Cys114	7.70	9.41	7.0	Met113	1.65	-0.83	9.5
Ser182	2.70	3.40	7.0	Thr353	0.72	0.10	9.5
Val189	-11.55	-7.16	7.0	Val78	-0.68	-0.23	9.5
Leu168	0.63	0.28	7.5	Asn173	-0.99	-1.46	10.0
Phe106	-7.35	-3.13	7.5	Asn185	-3.43	-4.43	10.0
Phe188	-3.85	-4.78	7.5	Asn352	2.70	2.84	10.0
Ser192	-7.77	-6.16	7.5	Leu89	-1.49	-2.00	10.0
Val82	3.52	5.39	8.0	Phe197	0.28	0.44	10.0
Gly372	1.56	1.33	8.5	Thr348	0.04	-0.67	10.0
Met112	2.19	1.85	8.5	Trp370	0.50	0.27	10.0

Table 2: Individual amino acid residue contribution as a function of the radius size. Energies are given in kcal·mol⁻¹. In red, residues pointed as interacting to eticlopride in the crystallographic data; in blue, residues with important contributions to the energy, but not mentioned in the analysis of crystal measurements. LDA and GGA are expressed in kcal·mol⁻¹; radius in Å.

BIRD panel depicted in Figure 5 as follows: Phe345, Ile183, Asp110, His349, Trp342, Tyr365, Val111, Val107, Thr369, Phe346, Tyr373, Cys114, Ser182, Val189, Phe106, Phe188, Ser192, Val82, Ser193, and Asn185.

A classical characteristic of eticlopride is the formation of two pseudo rings: (i) between the carbonyl group (O14) at amide group and the hydroxyl group (O7H) at the aromatic ring; (ii) between the oxygen (O11) at the methoxy group and the hydrogen atom bound to nitrogen (NH15) at amide group. Intramolecular hydrogen bonds were observed after energy minimization procedures and can be observed in Figure 6, where also residues with large energy contribution to eticlopride binding are represented.

The charge distribution in the ligand-binding pocket can be visualized by projecting the charge density onto an electrostatic potential isosurface, as shown in Figure 7 for the LDA data. Looking at it, we see the attractive and repulsive residues at the D3 binding pocket. The carboxylate group of Asp110 exhibits a negative charge density while i(N21)H shows a positive charge density, which explains the relevance of this interaction in the formation of the ionic bridge.

Discussion

The recent crystal structure elucidation of D3R-eticlopride has made it possible to use the structural data of the receptor to predict binding-molecular [17,34]. In this study, we have used *ab initio* computations applying the Molecular Fractionation with the Conjugate Caps (MFCC) [23-25] approach, within the framework of DFT, to evaluate the interaction energy between eticlopride and individual residues in D3 receptor. The results reveal the strength of the drug interaction with each residue in the binding pocket, as well as the behavior of the total interaction energy as a function of the binding pocket size.

Using the hydrogen-optimized structure, further quantum

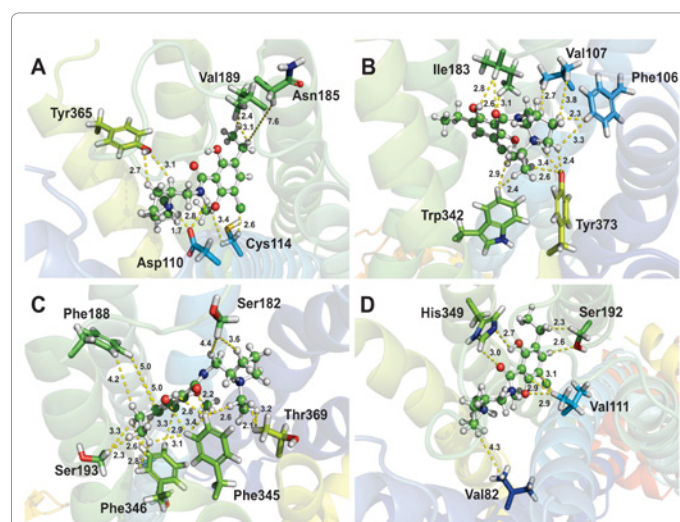


Figure 6: Spatial arrangement of amino acid residues with largest contribution to the binding energy at the binding pocket. (A) Salt bridge between Asp110 side chain and the tertiary amine at pyrrolidine ring. A repulsive interaction with Cys114 is related with the presence of a chloride substituent in the aromatic ring. Orientation of the optimized hydrogen atom in (O7)H in the direction of oxygen in the hydroxyl group (O14) indicates the formation of a pseudoring. (B) Ile183 is the second closest residue to eticlopride and interacts via hydrogen and van der Waals bonds. (C) Attractive interactions of Phe345 and Phe346 and repulsive contribution of Ser182. (D) Val82 repels eticlopride probably due to its interaction with region i. Yellow dashed lines show the distance of the most relevant amino acid residues to the closest atoms of eticlopride.

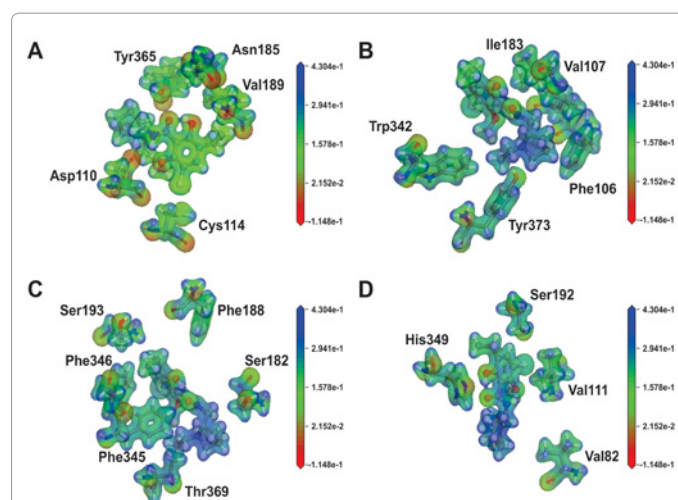


Figure 7: Electrostatic potential isosurfaces. Figure shows projected electron densities for eticlopride interacting with the attractive residues (A) Asp110, Asn185, (B) Ile183, Val107, (C) Phe345, Phe346, Phe188, and with the repulsive residues (A) Cys114, (C) Ser182 and (D) Val82.

calculations were carried out to obtain a binding energy profile. Different from other approaches, QM methods are practical only for systems with a few hundred of atoms at most due to the computational cost. This limitation has led us to make a compromise in choosing an appropriate range of neighbour residues to be taken into account for the binding energy calculations. Indeed, as pointed out by Hu et al. [35], to assess the relevance of residues based only on their relative positioning can be misleading, as the interaction energy contribution of each residue does not always correlate with distance. In this study, we have fragmented the D3-eticlopride structure using the MFCC approach and the individual contributions of each residue were calculated. This strategy was made to overcome the limitation in the number of atoms and to be able to analyze, via quantum biochemistry, more residues than those previously reported as important in both crystallographic data (contact residues) [17] and modeled structures of the dopamine receptor [34,36].

After an exhaustive analysis of individual energy contribution of 42 amino acid residues, we have achieved the stabilization of the binding energy at a radius of 8Å from the eticlopride centroid. At this radius distance, nineteen residues give rise to a binding energy of -259.21 (-171.48) kcal•mol⁻¹ using LDA (GGA) approximation, only attractive interactions were observed for the residues within 6.5Å, while repulsive interactions were found for larger distances.

As described in previous studies, the Asp110 side chain of TM3, which is pivotal to the binding of aminergic ligands in dopamine receptors [34,36-38], was responsible for the largest contribution through an attractive interaction with the tertiary amine in the ethyl-pyrrolidine ring of eticlopride of -122.78 (-112.21) kcal•mol⁻¹, obtained using LDA (GGA) approximation. This interaction occurs through a 2.8Å salt bridge between the amine group of eticlopride and the carboxylate of Asp110, which has been described as structurally and pharmacologically critical for high-affinity ligand-binding to the aminergic subfamily of GCPRs [17]. In the same way, a recent study using a docking approach demonstrated the importance of the interaction between the amine group of ligands and the residue Asp110 to the control of the stereospecificity of tetrahydropyrazolopyridines (R) and (S) and the reference phenylpiperazine in the D3R receptor

[39]. Another key component of the eticlopride pharmacophore is a substituted aromatic ring connected to the pyrrolidine by an amide bond that fits tightly within a hydrophobic cavity formed by Phe345 and Phe346 in helix VI; Val189, Ser192, and Ser193 in helix V; and Val111 in helix III, as well as Ile183.

The analysis of our results shows five important residues which were not considered to be relevant in the original crystallographic analysis: Val107, Ser182, Phe188, Val82 and Asn185. Val107 interacts attractively with a LDA (GGA) binding energy of -15.07 (-4.08) kcal·mol⁻¹, to eticlopride regions i and ii. This contribution is much larger than that of Leu89 (LDA: -1.49 kcal mol⁻¹; GGA: -2.00 kcal·mol⁻¹) and larger or equivalent to Phe106, Thr369, Trp342, Tyr365, Tyr373 and Val86. In the opposite way, Ser182 repels eticlopride at region I, with 2.70 (3.40) kcal·mol⁻¹ in the LDA (GGA) approximation, overcoming the contribution of Val86. Additionally, Val82, with a LDA (GGA) contribution of 3.52 (5.39) kcal·mol⁻¹ also acts by repelling the ligand at region i. Interacting with region iii, Phe188 is located in the hydrophobic region of the binding pocket and contributes through attractive interaction with LDA (GGA) energy of -3.85 (-4.78) kcal·mol⁻¹. This contribution is similar to that of Ser193 and larger than the values observed for Ser196 and Val350. Surprisingly, despite the distance to the eticlopride centroid (8Å), Asn185 contributes with an attractive LDA (GGA) binding energy of -3.43 (-4.43) kcal·mol⁻¹.

Another important result is the formation of two intramolecular hydrogen bonds in the eticlopride molecule. One of them, between the methoxy group at aromatic 2-position and the region ii (NH15) at amide moiety, was described in a previous study, with the formation of a six-membered pseudoring being indicated as a requirement for activity *in vitro* [40]. The second bond leads to the formation of a pseudoring between (O7)H at aromatic 6-position, and O14 at amide moiety. These two intramolecular hydrogen bonds were already described by quantum mechanical calculations of D2-receptors antagonists [41], and are responsible for stabilizing the planar conformation of eticlopride in the binding pocket, as described in the crystallographic data [17] and docking approaches [18].

The data presented in this study may contribute to efforts in developing reliable models of G protein-coupled receptors structures, as well as to predict their interaction with agonists and antagonists. Recently, Soriano-Ursúa et al. [34] have predicted, using computational methods, the binding affinities for agonists and antagonists in modeled rat and human D2 dopamine receptor, having suggested the importance of Ser193, Ser194 and Ser197 (Ser192, Ser193 and Ser196 in D3R). Kortagere et al. [42], in a recent publication using site-directed mutagenesis and homology modeling studies, have showed that Ser192 in TM5 seems to be crucial for receptor interaction and activation by a ligand through hydrogen bonding with its hydroxyl group. We have demonstrated here the strong attractive interaction of Ser192, Ser193 and Phe188 with eticlopride, and the relative weakness of the interaction with Ser196. In the same way, our data shows the attractive profile of Phe346, Phe106, Phe188, Val189 and Trp342 and the repulsive interactions of Cys114, Ser182 and Val82, which are in agreement with results from Kalani et al. [36], who argued that Phe110, Cys118, Phe189, Val190, Trp386 and Phe390 (Phe106, Cys114, Phe188, Val189, Trp342 and Phe346 in D3R, respectively) are crucial for ligand-binding in modeled D2R structures. Moreover, the understanding of the binding interactions has been useful in approaches as to the prediction of the structure of de D2R in complex with eticlopride, as performed by Obiol-Pardo et al. [18], which used information about

the salt bridge formed by Asp110 and the tertiary amine group, the formation of intracellular hydrogen interactions and a more precise evaluation of the ligand energy on binding to predict plausible models of eticlopride binding through docking methodology. Our results also provide information about the individual residues contribution, making useful the description of the binding pocket energy and its interactions with ligands, to further studies in search of new and more potent antipsychotic agents with fewer side effects.

Conclusion

In the last decade, consensus was reached that the understanding of dopamine antagonism is extremely necessary to the development of new more efficient drugs with less adverse effects. In the present study, we analyzed the crystallographic structure D3R-eticlopride via a quantum method, establishing the behavior of the total interaction energy as a function of the binding pocket radius. Considering the range of amino acid residues implicated with the eticlopride binding, we highlighted the significant energy contribution of Asp110, and demonstrated for the first time the participation of Val107, Ser182, Phe188, Val82 and Asn185 on this binding. The present theoretical approach is useful for future studies on the influence of mutated amino acid residues in the binding site using *in silico* simulations through the virtual replacement of residues followed by steps of energy minimization and quantum calculation. Moreover, the present data is of interest due to its potential use in biological analysis, such as site-directed mutagenesis studies and assays of binding affinity of different antagonists to D3R and other members of the dopamine receptor family.

Acknowledgments

The authors acknowledge Prof. D.L. Azevedo at the Federal University of Maranhão, where part of the computational calculations was performed using the DMOL3 code. B.S.C. and V.N.F. are senior researchers from the Brazilian National Research Council (CNPq) and acknowledge the financial support received during the development of this work from the Brazilian Research Agency CNPq-INCT-Nano(Bio) Simes, project 573925/2008-9. E.W.S.C. received financial support from CNPq projects 304338/2007-9 and 482051/2007-8. C.G. received financial support from CNPq project 478916/2010-8.

References

1. Wildenauer DB (2009) Dissecting the Molecular Causes of Schizophrenia. In: *Molecular Biology of Neuropsychiatric Disorders*, Wildenauer DB (Ed), Springer, Berlin.
2. Inta D, Meyer-Lindenberg A, Gass P (2011) Alterations in Postnatal Neurogenesis and Dopamine Dysregulation in Schizophrenia: A Hypothesis. *Schizophr Bull* 37: 674-680.
3. Weinberger DR (1987) Implications of Normal Brain Development for the Pathogenesis of Schizophrenia. *Arch Gen Psychiatry* 44: 660-669.
4. Davie CA (2008) A review of Parkinson's disease. *Br Med Bull* 86: 109-127.
5. Fahn S (2008) The history of dopamine and levodopa in the treatment of Parkinson's disease. *Mov Disord* 23: S497-S508.
6. Snyder SH (1976) The dopamine hypothesis of schizophrenia: focus on the dopamine receptor. *Am J Psychiatry* 133: 197-202.
7. Howes OD, Kapur S (2009) The Dopamine Hypothesis of Schizophrenia: Version III—The Final Common Pathway. *Schizophr Bull* 35: 549-562.
8. Missale C, Nash SR, Robinson SW, Jaber M, Caron MG (1998) Dopamine Receptors: From Structure to Function. *Physiol Rev* 78: 189-225.
9. Callier S, Snapyan M, Le Crom S, Prou D, Vincent JD, et al. (2003) Evolution and cell biology of dopamine receptors in vertebrates. *Biol Cell* 95: 489-502.
10. Giros B, Sokoloff P, Martres MP, Riou JF, Emorine LJ, et al. (1989) Alternative splicing directs the expression of two D2 dopamine receptor isoforms. *Nature* 342: 923-926.
11. Strange PG (2001) Antipsychotic Drugs: Importance of Dopamine Receptors

- for Mechanisms of Therapeutic Actions and Side Effects. *Pharmacol Rev* 53: 119-133.
12. Stahl SM (2003) Describing an Atypical Antipsychotic: Receptor Binding and Its Role in Pathophysiology. *J Clin Psychiatry* 5: 9-13.
13. Kapur S, Seeman P (2001) Does Fast Dissociation From the Dopamine D(2) Receptor Explain the Action of Atypical Antipsychotics?: A New Hypothesis. *Am J Psychiatry* 158: 360-369.
14. Meltzer HY (1999) The Role of Serotonin in Antipsychotic Drug Action. *Neuropsychopharmacology* 21: 106S-115S.
15. Newman-Tancredi A, Kleven MS (2011) Comparative pharmacology of antipsychotics possessing combined dopamine D2 and serotonin 5-HT1A receptor properties. *Psychopharmacology (Berl)* 216: 451-473.
16. Martelle JL, Nader MA (2008) A Review of the Discovery, Pharmacological Characterization, and Behavioral Effects of the Dopamine D2-Like Receptor Antagonist Eticlopride. *CNS Neurosci Ther* 14: 248-262.
17. Chien EY, Liu W, Zhao Q, Katritch V, Han GW, et al. (2010) Structure of the Human Dopamine D3 Receptor in Complex with a D2/D3 Selective Antagonist. *Science* 330: 1091-1095.
18. Obiol-Pardo C, López L, Pastor M, Selent J (2011) Progress in the structural prediction of G protein-coupled receptors: D3 receptor in complex with eticlopride. *Proteins* 79: 1695-1703.
19. Hohenberg P, Kohn W (1964) Inhomogeneous Electron Gas. *Phys Rev* 136: B864-B871.
20. Kohn W, Sham LJ (1965) Self-Consistent Equations Including Exchange and Correlation Effects. *Phys Rev* 140: A1133-A1138.
21. Gordon MS, Fedorov DG, Pruitt SR, Slipchenko LV (2012) Fragmentation Methods: A Route to Accurate Calculations on Large Systems. *Chem Rev* 112: 632-672.
22. He X, Zhang JZ (2005) A new method for direct calculation of total energy of protein. *J Chem Phys* 122: 31103.
23. Zhang DW, Zhang JZ (2003) Molecular fractionation with conjugate caps for full quantum mechanical calculation of protein-molecule interaction energy. *J Chem Phys* 119: 3599-3605.
24. Chen X, Zhang Y, Zhang JZ (2005) An efficient approach for ab initio energy calculation of biopolymers. *J Chem Phys* 122: 184105.
25. Gao AM, Zhang DW, Zhang JZH, Zhang Y, (2004) An efficient linear scaling method for ab initio calculation of electron density of proteins. *Chem Phys Lett* 394: 293-297.
26. Matta CF (2010) *Quantum Biochemistry*. Wiley-VCH, Germany.
27. Zhou T, Huang D, Caflich A (2010) Quantum Mechanical Methods for Drug Design. *Curr Top Med Chem* 10: 33-45.
28. Raha K, Peters MB, Wang B, Yu N, Wollacott AM, et al. (2007) The role of quantum mechanics in structure-based drug design. *Drug Discov Today* 12: 725-731.
29. Santos SG, Santana JV, Maia FF Jr, Lemos V, Freire VN, et al. (2008) Adsorption of Ascorbic Acid on the C60 Fullerene. *J Phys Chem B* 112: 14267-14272.
30. Hadad A, Azevedo DL, Caetano EWS, Freire VN, Mendonça GLF, et al. (2011) Two-Level Adsorption of Ibuprofen on C60 Fullerene for Transdermal Delivery: Classical Molecular Dynamics and Density Functional Theory Computations. *J Phys Chem C* 115: 24501-24511.
31. da Costa RF, Freire VN, Bezerra EM, Cavada BS, Caetano EW, et al. (2012) Explaining statin inhibition effectiveness of HMG-CoA reductase by quantum biochemistry computations. *Phys Chem Chem Phys* 14: 1389-1398.
32. Delley B (1990) An all-electron numerical method for solving the local density functional for polyatomic molecules. *J Chem Phys* 92: 508-517.
33. Delley B (2000) From molecules to solids with the DMol[^{sup}3] approach. *J Chem Phys* 113: 7756-7764.
34. Soriano-Ursúa MA, Ocampo-López JO, Ocampo-Mendoza K, Trujillo-Ferrara JG, Correa-Basurto J (2011) Theoretical study of 3-D molecular similarity and ligand binding modes of orthologous human and rat D2 dopamine receptors. *Comput Biol Med* 41: 537-545.
35. Hu L, Eliasson J, Heimdal J, Ryde U (2009) Do Quantum Mechanical Energies Calculated for Small Models of Protein-Active Sites Converge? *J Phys Chem A* 113: 11793-11800.
36. Kalani MY, Vaidehi N, Hall SE, Trabanino RJ, Freddolino PL, et al. (2004) The predicted 3D structure of the human D2 dopamine receptor and the binding site and binding affinities for agonists and antagonists. *Proc Natl Acad Sci USA* 101: 3815-3820.
37. Javitch JA, Fu D, Chen J (1996) Differentiating dopamine D2 ligands by their sensitivities to modification of the cysteine exposed in the binding-site crevice. *Mol Pharmacol* 49: 692-698.
38. Boeckler F, Gmeiner P (2006) The structural evolution of dopamine D3 receptor ligands: Structure-activity relationships and selected neuropharmacological aspects. *Pharmacol Ther* 112: 281-333.
39. Tschammer N, Elsner J, Goetz A, Ehrlich K, Schuster S, et al. (2011) Highly Potent 5-Aminotetrahydropyrazolopyridines: Enantioselective Dopamine D3 Receptor Binding, Functional Selectivity, and Analysis of Receptor-Ligand Interactions. *J Med Chem* 54: 2477-2491.
40. de Paulis T, Kumar Y, Johansson L, Råmsby S, Florvall L, et al. (1985) Potential neuroleptic agents. 3. Chemistry and antidopaminergic properties of substituted 6-methoxysalicylamides. *J Med Chem* 28: 1263-1269.
41. Saran A, Coutinho E (1994) Quantum mechanical calculations on dopamine D2-receptor antagonists: Conformation of remoxipride, eticlopride and NCQ 115. *Chem Sci* 106: 149-161.
42. Kortagere S, Cheng SY, Antonio T, Zhen J, Reith ME, et al. (2011) Interaction of novel hybrid compounds with the D3 dopamine receptor: Site-directed mutagenesis and homology modeling studies. *Biochem Pharmacol* 81: 157-163.

Submit your next manuscript and get advantages of OMICS Group submissions

Unique features:

- User friendly/feasible website-translation of your paper to 50 world's leading languages
- Audio Version of published paper
- Digital articles to share and explore

Special features:

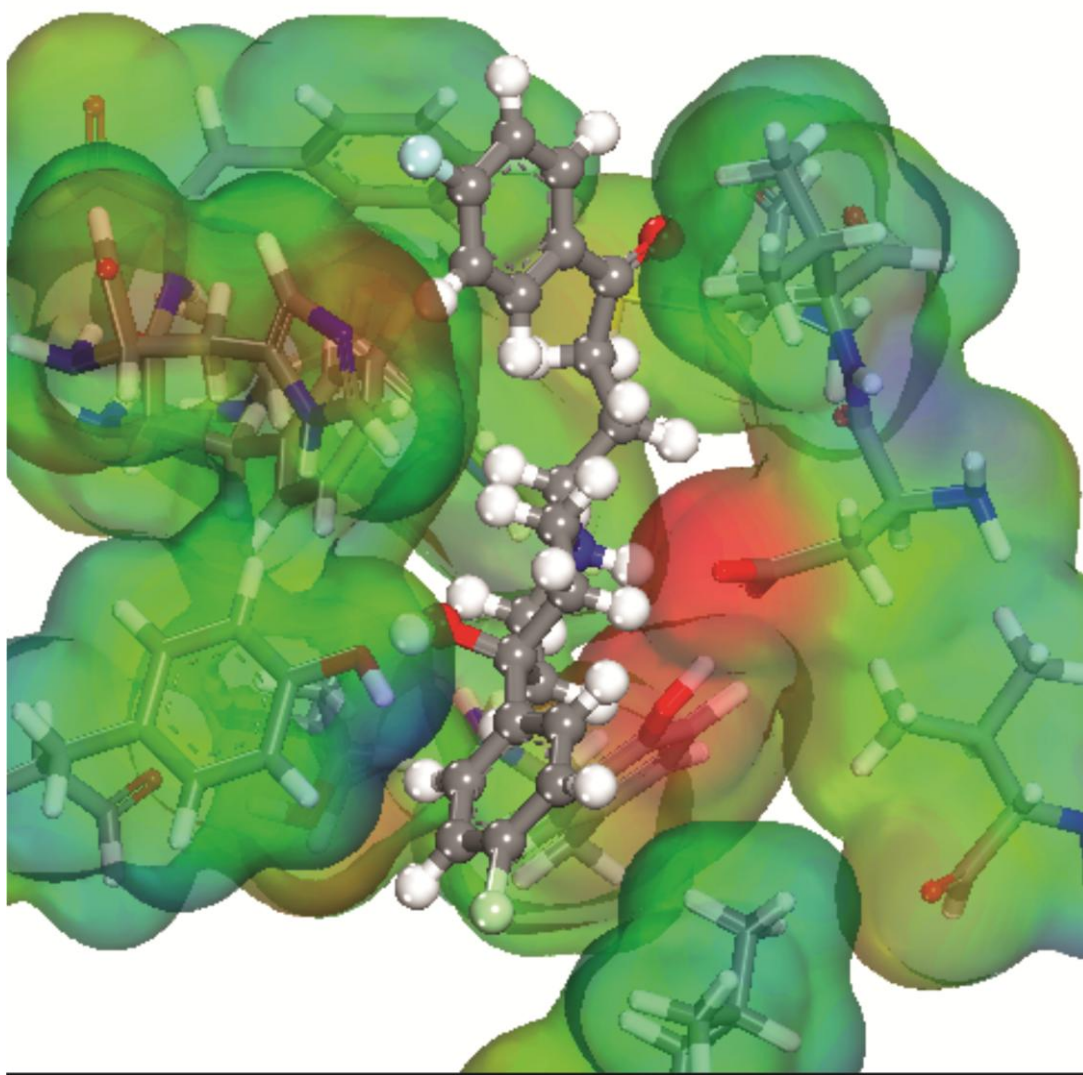
- 200 Open Access Journals
- 15,000 editorial team
- 21 days rapid review process
- Quality and quick editorial, review and publication processing
- Indexing at PubMed (partial), Scopus, DOAJ, EBSCO, Index Copernicus and Google Scholar etc
- Sharing Option: Social Networking Enabled
- Authors, Reviewers and Editors rewarded with online Scientific Credits
- Better discount for your subsequent articles

Submit your manuscript at: <http://www.editorialmanager.com/proteomics>

**Antipsychotic Haloperidol Binding
to the Human Dopamine D3 Receptor:
Going Beyond Docking
Through QM/MM Refinement
for the Design of Improved
Schizophrenia Medicines**

CAPÍTULO 2

Submetido para a revista Chemical Neuroscience em 16 de maio de 2014.



Antipsychotic Haloperidol Binding to the Human Dopamine D3 Receptor: Going beyond Docking Through QM/MM Refinement for the Design of Improved Schizophrenia Medicines

Geancarlo Zanatta^{a*}, Gustavo Nunes^a, Eveline M. Bezerra^b, Roner F. da Costa^c, Alice Martins^b, Ewerton W. S. Caetano^d, Valder N. Freire^e, Carmem Gottfried^a

^a Department of Biochemistry at Federal University of Rio Grande do Sul, 90035-003 Porto Alegre, RS, Brazil;

^b Post-graduate Program in Pharmaceutical Sciences, Pharmacy Faculty, Federal University of Ceará, 60430-372 Fortaleza, CE, Brazil;

^c Department of Physics, Universidade Federal Rural do Semi-Árido, 59780-000 Caraúbas, RN, Brazil;

^d Federal Institute of Education, Science and Technology, 60040-531 Fortaleza, CE, Brazil;

^e Department of Physics at Federal University of Ceará, 60455-760 Fortaleza, CE, Brazil.

KEYWORDS: *Quantum biochemistry; Dopamine receptor; Haloperidol; D3 binding pocket; Quantum mechanics; DFT; antipsychotic; ab initio; docking; QM/MM ONIOM method*

ABSTRACT: As the dopamine D3R receptor is a promising target for schizophrenia treatment, an improved understanding of the binding of existing antipsychotics to this receptor is crucial for the development of new potent and more selective therapeutic agents. In this work, we have used X-ray co-crystallization data of the antagonist eticlopride bound to D3R as a template to predict, through docking essays, the placement of the typical antipsychotic drug haloperidol at the D3R receptor binding site. Afterwards, classical and quantum mechanics/molecular mechanics (QM/MM) computations were employed to improve the quality of the docking calculations, the QM part of the simulations being accomplished by using the density functional theory (DFT) formalism. After docking, the calculated QM improved total interaction energy $E_{\text{QMDI}} = -170.1$ kcal/mol was larger (in absolute value) than that obtained with classical molecular mechanics improved ($E_{\text{CLDI}} = -156.3$ kcal/mol) and crude docking ($E_{\text{CRDI}} = -137.6$ kcal/mol) procedures. The QM/MM computations reveal the pivotal role of the Asp110 amino acid residue in the D3R haloperidol binding, followed by Tyr365, Phe345, Ile183, Phe346, Tyr373 and Cys114. Besides, it highlights the relevance of the haloperidol hydroxyl group axial orientation, which interacts with the Tyr365 and Thr369 residues enhancing its binding to dopamine receptors. Finally, our computations indicate that functional substitutions in the 4-chlorophenyl and in the 4-hydroxypiperidin-1-yl fragments (such as C3H and C12H hydrogen replacement by OH, OOH or Cl groups) can lead to haloperidol derivatives with distinct dopamine antagonism profiles. The results of our work are a first step towards *in silico* quantum biochemical design and probing of new medicines to treat schizophrenia.

INTRODUCTION

Schizophrenia is a mental illness affecting about five per thousand in population, varying across cultures and countries, and being more prevalent among males. (1) Symptoms are classified as positive (e.g. hallucination, delusions, etc.), negative (e.g. lack of pleasure, difficulties to begin and sustain activities, etc.) and cognitive (e.g. problems with executive functions, working memory, etc.). (2, 3) Schizophrenia is a severe and disabling neurological disorder that typically begins in late adolescence or early adulthood, having a large impact on the patients and society. World Health Organization estimates of schizophrenia-related economic costs in 2001, available only for some industrialized countries, range between 1.6% and 2.6% of the total health care expenditures. (4) For England, it was estimated a £6.7 billion schizophrenia-related societal cost in 2004/05. (5) In the United States, the cost of schizophrenia was estimated to be \$62.7 billion in 2002. (6)

Antipsychotics began to be introduced for the treatment of schizophrenia in the 1950s. Many of them exert their therapeutic effects through the blockage of the dopamine receptors group. (7-9) Binding profile, type of side effect events and mechanisms of action, among other characteristics, are used to characterize antipsychotics as first- and second-generation agents (also known as typical and atypical, respectively). (7, 8, 10) Typical antipsychotics (e.g. chlorpromazine, fluphenazine and haloperidol) are known to block the D2R dopamine receptor (see below) in the mesolimbic and nigrostriatal pathway, leading to extrapyramidal symptoms (EPS) and late dyskinesia. Atypical antipsychotics (e.g. clozapine, olanzapine and risperidone) were introduced in the last three decades, being believed to be more efficacious, tolerable and associated with fewer EPS. (11)

A complete understanding of dopaminergic neurotransmission is highly important to enhance the treatment of schizophrenic conditions. Dopamine regulates its pathway through the coordinated activation of dopamine receptors: D1-like (D1R and D5R) and D2-like (D2R, D3R and D4R). (12, 13) These receptors are G-protein-coupled (GPCR) (see the Nobel Prize in Chemistry lecture, 2012) (14-16) characterized by the presence of seven highly conserved transmembrane helices (TMH1-TMH7), connected by extracellular (EC) and intracellular (IC) loops. (17, 18) Receptors belonging to the D1-like family activate adenylyl cyclase through the stimulatory G-protein alpha subunit, while receptors of the D2-like family are coupled to the G-protein alpha subunit, with inhibitory effects over adenylyl cyclase. (19)

Among the dopamine receptors, the D3R subtype has been discovered as an important target for the treatment of schizophrenia, Parkinson's disease and other neurological diseases. (20-22) In medicated schizophrenic patients, the D3R level was similar to or less than control levels, but is doubled in antipsychotics free patients, suggesting that D3R is related to the antipsychotic efficacy in the treatment, while D2R blockade is involved with extrapyramidal side effects. (23) Analysis of postmortem tissues showed D2R distribution in the dorsal putamen and the dorsal caudate nucleus, but not D3R. In the ventral putamen, ventral caudate and globus pallidus, a D2R:D3R distribution in a 2:1 proportion was observed. (24) High D2R concentration in the striatum seems to be a target for antipsychotics and is related to motor side effects associated with the nigrostriatal region. In the mesolimbic region, D3R has an important role in the dopamine system (25) and its RNA encoding is abundant in the ventral area. Indeed, the understanding of the anatomical distribution of dopamine receptor subtypes in the central nervous system (CNS) is crucial to the rational development of subtype-selective agents in order to improve treatment efficacy, as well as to reduce side

effects. (26-31) In this regard, it has been recognized that antagonism in D3R may represent a novel and potent antipsychotic mechanism devoid of EPS, making D3R a good target for the improved drug treatment of schizophrenia. (25, 29)

Haloperidol, 4-[4-(4-chlorophenyl)-4-hydroxypiperidin-1-yl]-1-(4-fluorophenyl)butan-1-one, chemical formula $C_{21}H_{23}ClFNO_2$ (see Figure 1A), is a phenyl-piperidinyl-butyrophenone. It was synthesized in 1958 by Janssen Pharmaceutical and can be considered a typical antipsychotic (32), being an effective clinic agent employed in the therapy of the positive symptoms of schizophrenia, mania and neurological disorders. (33) It is argued that haloperidol acts through the blockade of dopamine D2-like receptors in the mesocortex and limbic systems of the brain. (34, 35) Additionally, according to Malmberg and colleagues, (36)(36) haloperidol is a D2R antagonist which also acts like an inverse agonist in D3R. Moreover, haloperidol also has an ability of binding to a wide variety of Central Nervous System receptors, such as the adrenergic and muscarinic ones, among others. (37)

The high homology degree of dopamine receptors explains the low specificity of haloperidol and other similar drugs. In fact, it was highlighted that D2R and D3R share 46% of homology, being 78% in the transmembrane helices (TM). (25, 38) Chien and colleagues (38) showed that among eighteen eticlopride contact residues in the binding pocket of D3R, seventeen are identical to D2R residues, suggesting that such similarities in the binding pocket give rise to closely related affinities, as observed for many compounds. Although promoting the D2R dopamine blockade in the nigrostriatal region, triggering extrapyramidal symptoms (dystonias, akathisia, late dyskinesia and pseudoparkinsonism), (39) haloperidol is still widely used in clinic as the newer atypical antipsychotics have high cost, being also related to the development of important side effects, unhappily. (40-42)

In this work, due to the haloperidol clinical relevance and its ability to antagonize D3R, it was investigated its mode of interaction with individual residues of its D3R binding pocket. The results of this *in silico* research work are quite useful as a guide to the design of haloperidol derivatives with stronger D3R antagonism. The published crystallographic data of D3R complexed with eticlopride (38) was taken into account to simulate the docking of haloperidol in the D3R by ligand replacement. Quantum Mechanics/Molecular Mechanics (QM/MM) computation procedures were carried out to optimize molecular geometries within the Density Functional Theory (DFT) formalism. The haloperidol-D3R amino acid residues interactions were evaluated using the divide to conquer-like molecular fractionation with conjugate caps (MFCC) technique. (43) A binding pocket radius r was defined, varying from 2.5 Å to 10.0 Å, being supposed to contain the most important D3R residues interacting with haloperidol. The interaction energies of haloperidol with individual amino acid residues were estimated, providing a description of the dependence of the total binding energy with the binding pocket radius. Besides, functional substitutions in the 4-chlorophenyl and in the 4-hydroxypiperidin-1-yl fragments (such as C3H and C12H hydrogen replacement by OH, OOH or Cl groups) were discovered as routes to search for haloperidol derivatives with distinct dopamine antagonism profiles. Our results are a first step towards *in silico* quantum biochemical design and probing of new medicines to treat schizophrenia.

RESULTS AND DISCUSSION

In the dopaminergic neuroscience domain, it is remarkable the recent publication of the D3R structure co-crystallized with eticlopride. (38) This work has motivated structure-based drug research through *in silico* simulations of ligands interaction with

D3R. As a matter of fact, Feng and colleagues (44) have used molecular dynamics to refine docking results of selective ligands, highlighting the importance of Thr369 to the selectivity of R-22 with D3R. On the other hand, the D3R crystallographic structure was used to generate D2R and D3R models which were validated through the docking of distinct ligands, followed by molecular dynamics procedures. (45)

Docking algorithms have become popular in the field of computer-aided drug design because they are useful tools to predict the binding of small molecules to a protein structure. (46-48) However, due to the low accuracy of the score functions, it is often hard to find the best pose among docking results. To deal with this problem, more robust approaches can be employed. In this sense, quantum mechanical (QM) methods, (49) which have been proving themselves to be of great importance in all phases of *in silico* drug design, (50) are becoming more popular due to their high accuracy to estimate (relative) binding affinities. (51) Nevertheless, the computational cost to simulate large systems at the QM level is very high because of the huge number of electrons involved. To overcome this difficulty, it is possible to describe the system by using its electron density $\rho(r)$, which depends on three spatial coordinates only, instead of the full electronic wave function, with $3N$ spatial coordinates (N being the total number of electrons involved). This is the essential feature of DFT, where the total energy of a multi-electronic system is expressed as a functional of the electron density, leading to the so-called Kohn-Sham equations. (52, 53) Besides, the divide to conquer-like Molecular Fractionation with Conjugate Caps (MFCC) scheme is most helpful to reduce the computational cost and preserving, at the same time, an accurate description of biological systems through quantum calculations. (43, 54-57) In particular, our group has employed previously the MFCC method to describe ligand-protein interactions at the quantum level in other relevant biological systems. (58-62)

Another important issue related to ligand-protein docking is how to take into account the flexibility of the protein structure to make the results more realistic. (48, 63) Among recent suggested strategies, one finds the use of hybrid QM/MM approaches to carry out docking refinement. (49, 64) The use of a hybrid method can be a good route for the study of large proteins, as it allows the partition of the entire system into two regions: (1) a small region of interest, which is described using QM methods; and (2) the rest of the protein system, which is modelled using a classical MM force field. Among the QM/MM methods, the Own N-layer Integrated molecular Orbital molecular Mechanics (ONIOM) has been used with success to treat biological systems due to its simplicity and high accuracy. (65) By combining docking and ONIOM techniques, it is possible to achieve a reliable structure to investigate protein-ligand interactions at the molecular level through quantum biochemistry *ab initio* simulations - see the Nobel Prize in Chemistry lecture of 2013. (66)

In the work here presented, the X-ray data of eticlopride co-crystallized with the dopamine receptor D3 at 3.15 Å of resolution, PDB ID: 3PBL (38) was adopted as a template for the docking essays, with the purpose of replacing the eticlopride molecule by haloperidol. As a matter of fact, the docking of haloperidol in the rigid structure of the crystallographic D3R was performed in the original eticlopride binding site, which was followed by classical and QM/MM optimizations. The QM calculations were performed both in the local-density approximation (LDA) (67, 68) and generalized gradient approximation approach with an extra dispersion correction scheme as proposed by Tkatchenko and Scheffler (GGA+TS). (69, 70) Such geometry optimizations allowed some degree of flexibility in the binding pocket site of the

receptor, which is fundamental for its function and drug design, (71) but is absent in the crude docking procedure. (47, 72, 73) Afterwards, ligand-residue interaction energies were calculated using DFT through the MFCC scheme. These procedures enabled a better description of the haloperidol in its human D3R receptor binding pocket.

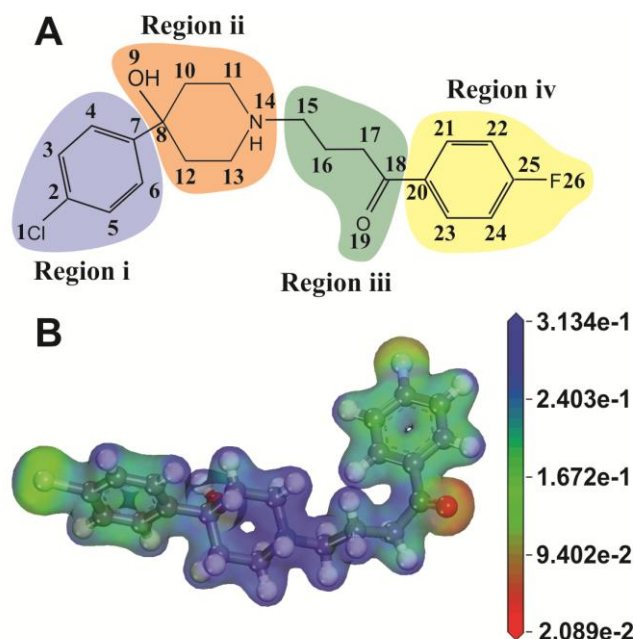


Figure 1. (A) Atom labels for haloperidol at physiological pH. Region i has the 4-chlorophenyl fragment; region ii has the 4-hydroxypiperidin-1-yl fragment with the tertiary amine protonated; region iii has the butan-1-one fragment, and region iv has the 4-fluorophenyl fragment. (B) Electron density calculated using DFT projected onto an electrostatic potential isosurface. Negatively charged regions are in red and positively charged regions are in blue, as depicted in the charge scale.

Haloperidol and Receptor Preparation

The protonation state of the ligand used in this study is in agreement with *in vitro* experiments which demonstrated that, among the use of charged and uncharged analogues of dopamine, the agonist activity is optimal for charged species. (74) Also, Chien and Colleagues (38) stated that the protonated ethyl-pyrrolidine ring of eticlopride, at physiological pH, is fundamental for the formation of a salt bridge with the carboxylate of Asp110, which is structural and pharmacologically critical for high affinity ligand binding to the aminergic subfamily of GPCRs. Such reports give us support to follow experiments using a protonation scheme reflecting the physiological pH, but considering variation due to the local protein environment. Calculations of haloperidol showed that in the 7.2-7.4 pH range there is a prevalence (97.34 – 95.85%) of protonation at the piperidine ring. Also, the protonation state of amino acid residues, at the physiological pH, was adjusted according to PROPKA tool results and the protonation tool in the Discovery Studio package (see Methods for more details). In this way, important residues within the radius of 10 Å from the centroid of haloperidol had their protonation adjusted according to results, such as Asp110 (pKa 3.9) and His349 (pKa 6.0), among others. Also, in order to improve the docking input, the protonated haloperidol molecule geometry was optimized through classical and quantum energy minimization steps, following the same protocol used to prepare the eticlopride for re-docking. The haloperidol protonation considered during the dock-

ing runs is depicted in Figure 1, together with the electron density distribution of the isolated haloperidol molecular structure after DFT geometry optimization.

Docking Results and Selected Pose

Initially, the docking parameters were set through the application of a re-docking protocol to the eticlopride-D3R system using Autodock 4.0. Two essays of re-docking were performed, the simple one using the eticlopride structure as given by the crystallographic data, and an improved one where it was considered a quantum optimized built molecule (see Figure S1 in the supporting information). As no significant differences were observed between the re-docking essays, the initial structure of haloperidol was built and optimized using the same approach applied to generate the molecule of eticlopride through the re-docking (see Experimental Methods) before being used for the docking in the rigid pocket of D3R. The tuning of the docking machinery for haloperidol was performed following the same steps of the eticlopride-D3R re-docking. Docking experiments generated one thousand poses, which were clustered using a RMSD tolerance of 1.0 \AA^2 ; the first pose of each cluster scored better than the threshold of -10 kcal/mol , being evaluated in a re-score procedure (see pose selection in Experimental Methods). This approach allowed us to quickly evaluate the docking score of thirteen poses in order to choose the most representative of them. Probably because our calculation took into consideration all hydrogen atoms in the system (differently from the Autodock approach, which compute only the polar hydrogen atoms in the protein), which makes the calculation more accurate by allowing a more realistic spatial arrangement of the atoms during geometry optimizations, it was

obtained a slightly different ranking of poses (see Table S1). Nevertheless, our re-score calculation confirmed as the best representative pose the same one indicated by the Autodock score (the first pose from the cluster 1). From now on, such pose will be labeled DOC. Moreover, during visual inspection it was observed that DOC represents the haloperidol orientation with the fluorine atom pointing towards Helix V, and the chlorine atom pointing towards Helix II, agreeing with the haloperidol orientation in D2R as indicated by Hjerde and colleagues. (75) However, it curiously differ from that obtained by Wang and colleagues, (76) which have obtained that the *para*-fluoro phenyl plane is oriented along the Helix II in their modelling of D2 and D3 receptors. Also, it was observed that in DOC the haloperidol piperidine ring assumes a chair conformation, as described in the literature, (77, 78) and also that the phenyl ring was oriented in the equatorial position while the hydroxyl group was oriented axially. (78)

Some of the discrepancies observed in published docking simulations can be due to methodological differences. As a matter of fact, Wang *et al.* (76) have used modeled structures in their study (the crystallographic data of D3R had not yet been published then), building the ligand haloperidol *in situ* and carrying out energy minimization steps followed by molecular dynamics (MD) calculations to refine the structures. As advanced by Sousa *et al.*, (47) MD is known to have several pitfalls when used in attempts to replace docking algorithms in ligand-protein systems, mainly due to difficulties in scanning over the typically rugged energy hypersurface of biological systems and in crossing high-energy barriers. Moreover, the simulation time could not be large enough to adequately sample the conformational space in such a way that a stabilized binding is not achieved.

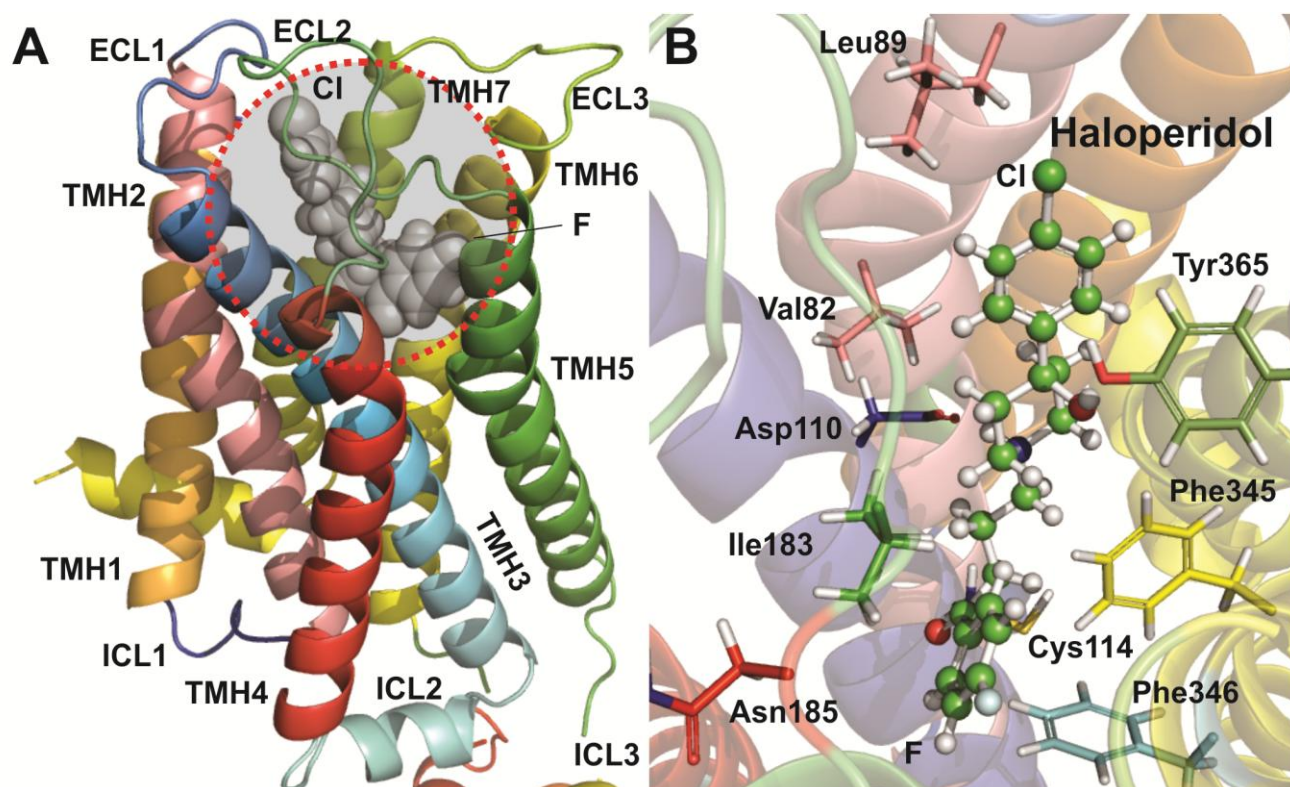


Figure 2. QM/MM optimization after haloperidol docking in D3R. (A) The haloperidol ligand at the binding pocket of D3R, with its atoms depicted as spheres scaled according to the respective van der Waals (VDW) radii. The binding region is enclosed by the dashed red circle. (B) Orientation and structure of haloperidol in its D3R binding pocket. The amino acid residue Asp110 in helix III, which is pivotal to the D3R haloperidol binding, is indicated together with other important residues.

Considering that the side chains of proteins are supposed to reorganize in a wide range of ways within the binding pocket (backbone displacement is more rare), (79) we performed three distinct geometry optimization procedures for the sake of comparison and to improve the quality of the results. In the first procedure, hydrogen atoms were added to the DOC structure and only their positions were classically optimized to minimize the haloperidol-D3R total energy. From now on, this new geometry will be referred as Crude Docking Input (CRDI) structure. In the second procedure, it was generated the Classical Mechanics Docking Input (CLDI) structure through the optimization of all hydrogen atoms and the entire molecule of haloperidol through a classical mechanics energy minimization approach. The third procedure of optimization was carried out using the QM/MM scheme in the ONIOM picture for docking improvement,(65) in such a way that the haloperidol was set as part of the QM layer, while the totality of the D3R residues was set into the MM layer. The resulting structure is referred as Quantum Mechanics Docking Input (QMDI) from now on. During the optimization, all hydrogen atoms of the complex, the haloperidol molecule inside the D3R binding pocket with amino acid residues up to a radius of 10 Å from the haloperidol centroid, were allowed to relax. Figure 2 shows the haloperidol at the D3R binding pocket after QMDI optimization. As a matter of fact, the QMDI structure showed significant differences in regard to the conformation of the haloperidol in the binding pocket as compared with the original crude docking result (see Figure 3). The total electronic interaction energy of the system followed the sequence ($E_{\text{QMDI}} < E_{\text{CLDI}} < E_{\text{CRDI}}$), showing that QMDI converged complex is more stable than the CLDI and CRDI ones. Results indicating the dependence of the total binding energy on the binding site radius (measured from the haloperidol centroid) are shown in Figure 4. After the QM/MM optimization, the calculated total binding energy including all residues inside the 10 Å binding radius was -269.5 (-170.1) kcal/mol at the LDA-OBS (GGA-TS) level. For the largest radius, one obtains the total electronic interaction energy, E^T . For $r < 4.0$ Å, $E(r)$ decreases (the binding increases) strongly, the main contribution coming from the Asp110-ii (N14)H interaction at 4.0 Å (see Figs. 4-6). In the 4.0 Å $< r < 6.0$ Å range, $E(r)$ decreases more weakly, evolving towards a constant value; the main contribution are the His349-iv (C22)H and Tyr365-ii (O9)H at 5.0 Å. For $r > 6$ Å, while $E(r)$ decreases continuously and oscillates in the LDA case, it oscillates around a mean constant value in the GGA case. The differences obtained when using LDA or GGA is due to the nature of each functional. While within the DFT-LDA approach the long range interactions are over valued during the exchange-correlation description, the use of the DFT-GGA-TS functional (80) allows the description of the Van der Walls and hydrogen bonds through an improved description of long range interactions, resulting in a $E(r)$ stabilization for $r > 6$ Å. Besides, the oscillations are due to the DFT difficulty to describe long range Coulomb interactions related do distant charged residues. Note that for 6.0 Å $< r < 10.0$ Å, the most relevant interacting residues are Cys181, Phe188, Val189, Leu89, Ser192, Thr368 and Trp370.

The analysis of the final structures generated from the CRDI, CLDI, and QMDI approaches shows the displacement of haloperidol atoms from the original docking pose towards a more stable conformation. For a detailed general perception of this structural rearrangement, one can inspect in the Table S2 of the supplementary material the interatomic distances of the D3R amino acid residues in the binding pocket to the haloperidol centroid after each optimization strategy. Atomic charges and bond lengths of haloperidol *in vacuo*, after docking and after classical and QM/MM optimizations were also calculated (Tables S2 and

S3, supplementary material). The charge partitioning methodology known as Hirshfeld population analysis (HPA) (66, 81) was adopted as it minimizes the loss of information related to the formation of chemical bonds between atoms in a molecule, (15, 82) and produces improved Fukui function indices (83-85) capable of predicting reactivity trends within a molecule better than traditional Mulliken population analysis, (86) natural bond orbital analysis,(87) and fitted electrostatic potentials. (88) However, Hirshfeld charges tend to be too small, (89, 90) as Hirshfeld atoms in general resemble the neutral atoms. (91, 92) Such limitation, however, can be amended using the iterative Hirshfeld charge technique, (90) which has been successfully applied to the solid state (93) and the discussion of Fukui functions. (94)

The GGA-TS calculated Hirshfeld charges of the individual atoms of haloperidol for the molecular conformation obtained after *in vacuo*/docking optimizations are depicted in Table S3, and the bond distances of non-hydrogen atoms are show in Table S4. The results are expressed in units of the fundamental charge e , and were calculated using the HPA scheme available in the DMOL3 code.(95) They point to O19 and O9(H) as the most negatively charged atomic species (Hirshfeld charges of -0.209e and -0.190e, respectively). The N14(H) nitrogen atom belonging to the hydroxypiperidiny group, responsible for a large attractive interaction with Asp110 in the binding pocket, is positively charged (0.080e).

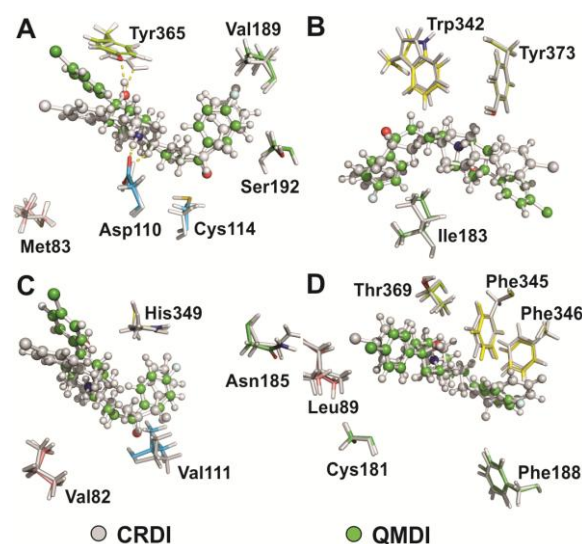


Figure 3. Different superposed views of the D3R-haloperidol geometry before (CRDI) and after (QMDI) QM/MM optimization. (A) Hydrogen bonds of haloperidol with Asp110 and Tyr365 are almost unaffected by QM/MM optimization; (B) the rearrangement of haloperidol and the side chain Ile183 is depicted; (C) large displacement of haloperidol region I (4-chlorophenyl fragment); (D) QM/MM optimization promotes a decrease of the mean distance from haloperidol atoms to Leu89 and Cys181, increasing their attractive interaction with haloperidol.

Interaction Energy per Individual Amino Acid Residue

DFT calculations (52, 53) were employed to assess the relative contribution of each amino acid residue at the binding pocket to the D3R-haloperidol interaction. As the size of the complete protein structure does prevent the use of quantum calculations for the full system, a fragmentation (divide to conquer) approximation was employed. Commonly, fragmentation techniques take into account only the ligand and a given residue with some sort of capping for the dangling bonds, so that the resulting interaction

directly reflects the local electronic structure. To improve the accuracy of the method, especially when residues at large distances are included, shielding effects due to neighbor amino acid residues were considered following a procedure established in previous works we published. (58, 59, 61) Assessments with and without shielding effects included exhibited smaller interaction energy differences for the residues closest to haloperidol, such as Phe345 (3.5 Å), with interaction energy of -11.10 (-12.30) kcal/mol (not) considering shielding, but significant differences for residues at larger distances, such as Cys114 (7.5 Å), which has an interaction energy with (without) shielding effect of 8.80 (-4.00) kcal/mol using the GGA- TS functional. Thus, in order to improve the accuracy of our study, shielding corrections were included in all simulation runs.

The interaction energies of haloperidol with 43 amino acid residues of the D3R binding pocket were calculated, the results being presented in Table 1. The sum of the individual contribution of residues from the QM/MM optimized structure indicate that the interaction energy does not vary much when the residues located more than 6.0 Å distant from the haloperidol centroid are accounted for. We have closely investigated the interaction of haloperidol with the Cys114 residue, which is located close to Asp110 (Figure 2B), in TMH III, and is part of an important domain for ligand interactions in the D3R binding pocket. (17) The Cys114 amino acid residue is involved in the binding of ligands with, at least, one N-propyl group in its structure. When compared with the wild type, in a competition binding experiment with [3H]-spiperone, the mutated Cys114S receptor showed 272- and 102 fold increases in the *ki* value for two aminotetralin antagonists, UH-232 and AJ-76, respectively. (96) On the other hand, our results show a repulsive interaction of Cys114 (8.80 kcal/mol) with haloperidol obtained within the GGA-TS approach. (69, 70)

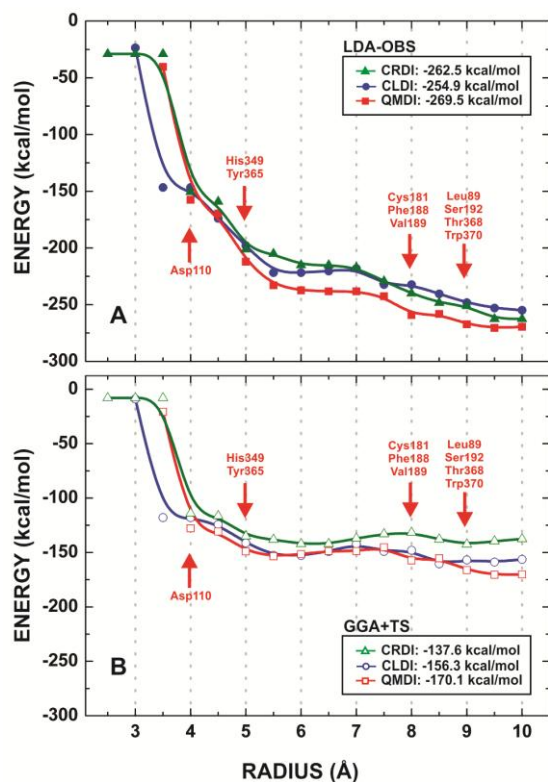


Figure 4. Behavior of the haloperidol-D3R total interaction energy as a function of the binding pocket radius. Computations were performed within the DFT formalism using the (A) LDA-OBS and (B) the GGA-TS functional.

There are 23 residues with relevant contributions to the binding, the sum of their individual interaction energies being very close to the value of the total binding energy. We were able to identify attractive and repulsive amino acid residues, as one can see from the BIRD panels shown in Figures 5A and 5B, the former obtained through the LDA exchange-correlation functional with OBS dispersion correction, and the later through the GGA exchange-correlation functional with TS dispersion correction (see Experimental Methods for details of the BIRD panel representation).

It was argued that typical antipsychotics induce a smaller displacement in the transmembrane helix TMH5 of the dopamine D2 receptor in comparison with the others TMHs, while haloperidol non-bonded interactions were larger with helix 3, followed by interactions with helices 6, 7, 2 and 5, respectively. (75) In our crude docking simulations, a similar ranking of interactions was obtained: TMH3 > TMH6 > TMH7 > TMH5 > ECL2 >> TMH2. In contrast, after the QM/MM geometry optimization this ranking changed to TMH3 > TMH7 > TMH6 > ECL2 > TMH5 >> TMH2. This result suggests that in D3R haloperidol has stronger interaction with helix 5 (GGA-TS calculated interaction energy of -12.90 kcal/mol) than with helix 2 (GGA-TS calculated interaction energy of 3.90 kcal/mol), but weaker interactions with helices 7, 6 and ECL2, which is agreement with the smaller displacement in helix 5 observed for typical antipsychotics. These results also show that haloperidol interacts more strongly with helix 3 where Asp110 is located. This residue is commonly acknowledged as responsible for a strong interaction with the tertiary amine of the ligand. (58, 97-101) The value of the Asp110 interaction energy is -117.00 (-107.00) kcal/mol at the LDA-OBS (GGA-TS) level, slightly smaller than that observed in our previous work for eticlopride (-112.21 kcal/mol using GGA-TS). (58) Among the residues in helix 7, Tyr373 and Tyr365 have interaction energies of -10.90 (-6.60) and -28.00 (-16.00) kcal/mol according with the LDA-OBS (GGA-TS) calculations, respectively.

A hydrogen bond between Tyr365 and the alcohol functional group ii(O9)H in haloperidol can be observed before the QM/MM geometry optimization, and after that, its length decreases from 2.240 Å to 1.748 Å, which is in agreement with the increase of the interaction energy from -13.00 kcal/mol to -16.00 kcal/mol at the GGA-TS level. This result highlight the relevance of the axial orientation of the haloperidol's hydroxyl group, which was described as not essential for binding, but important to the enhancement of the binding at the D2 receptor. (102)

Distances of important D3R residues in the binding pocket to haloperidol after the QM/MM optimization are shown in Figure 6, being observed that:

- (i) in helix 6, Phe345 has a pi-cation interaction with the region ii (N14) with energy of -24.60 (-11.10) kcal/mol at the LDA-OBS (GGA-TS) approximation;
- (ii) in the region iv (C22)H, Phe346 has an interaction energy of -12.10 (-8.30) kcal/mol and His349 has a pi-sigma interaction energy of -4.50 (-1.30) kcal/mol at the LDA-OBS (GGA-TS) level;
- (iii) the GGA-TS repulsive effect of Ser182 was slightly reduced from 5.90 (CRDI) to 2.90 kcal/mol (QMDI), while the LDA-OBS repulsive energy of 4.00 kcal/mol at the CRDI level became an attractive interaction with -2.50 kcal/mol interaction energy in the QMDI picture;

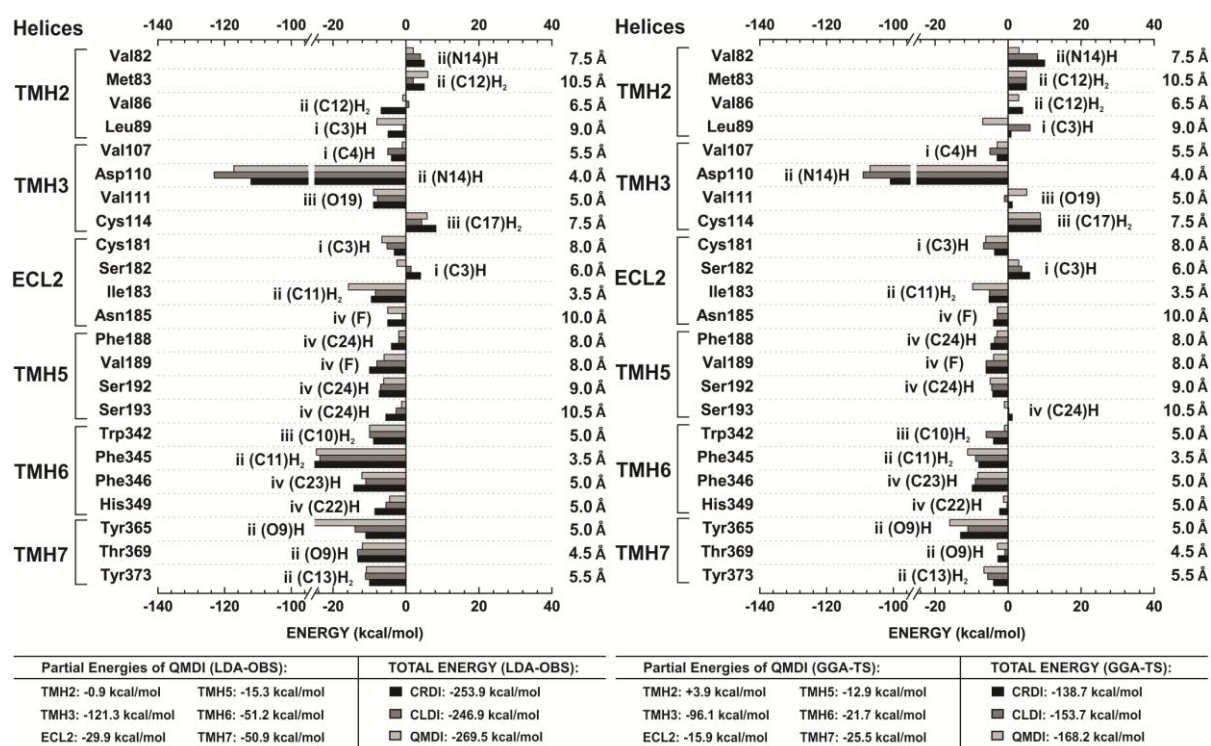


Figure 5. (A) BIRD panel showing the interaction energy for each amino acid residue in the D3R binding pocket evaluated considering the LDA exchange-correlation functional with OBS dispersion correction; (B) BIRD panel showing the interaction energy for each amino acid residue in the D3R binding pocket evaluated considering the GGA exchange-correlation functional with TS dispersion correction.

(iv) the chlorine atom attached to C2 enhances the QMDI GGA-TS interaction strength with Cys181 (from -3.70 CRDI to -6.10 kcal/mol QMDI) and Tyr365 (from -16.00 to -15.00 kcal/mol);

(v) the observed change in the interaction with Leu89 was significant (from 0.80 kcal/mol GGA-TS CRDI to -7.00 kcal/mol GGA-TS QMDI), while the repulsive effect of Ser182 decreased by more than 50% (from 5.90 GGA-TS CRDI to 2.90 kcal/mol GGA-TS QMDI).

These results indicate that, for an improved understanding of the mechanism of interaction of haloperidol derivatives with D3R, simple docking calculations are not enough, further QM/MM optimizations of the drug-binding site system being required.

The extracellular loop 2 is the home of important contributions to the haloperidol-D3R binding, mainly the residues Ile183 and Cys181, both with attractive interaction. Ser182 (Ile183, in D2R), which is close to haloperidol region i(C3)H, in contrast, is repulsive. After the QM/MM geometry optimization, the relative attraction of haloperidol to ECL2 almost doubled as the distance to Ile183 and Cys181 was reduced (Figure 3) in comparison with that within CRDI; interaction with Ser182 may also occur through its interaction with region i of haloperidol.

The residue Ser192 in helix 5, whose replacement by Ala (S192A) decreased the affinity of D3R agonists, (103) has a LDA-OBS (GGA-TS) interaction energy of -6.10 (-4.90) kcal/mol. A similar figure was observed for Val189, with -6.00 (-4.00) kcal/mol of attractive interaction within the LDA-OBS (GGA-TS) picture. Ser193, while showing a repulsive GGA-TS interaction with

energy 1.10 kcal/mol in the CRDI picture, changed its interaction state to attractive with GGA-TS interaction energy of -1.00 kcal/mol in the QMDI picture.

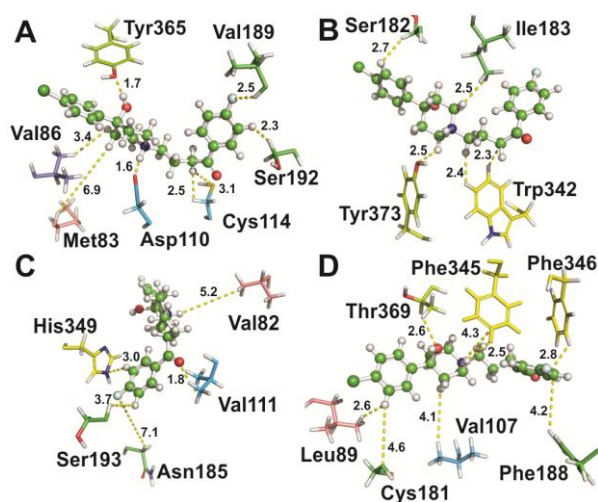


Figure 6. Spatial arrangement of some D3R amino acid residues interacting with haloperidol. Their interaction energies rank among the largest GGA-TS calculated contributions to the total Haloperidol-D3R binding energy. The residues-haloperidol distances are depicted by yellow dashed lines.

Table 1. Individual amino acid residue contributions to the total haloperidol-D3R interaction energy calculated at the LDA-OBS and GGA+TS levels. Energies are given in kcal/mol and the radial distance of each residue do the haloperidol centroid in Å.

Receptor segment	Residue	CRDI			CLDI			QMDI		
		LDA	GGA	r(Å)	LDA	GGA	r(Å)	LDA	GGA	r(Å)
TMH1	Tyr36	-11.00	1.00	10.5	-5.00	-6.00	10.0	2.00	2.40	10.0
TMH2	Val78	-1.00	-2.00	9.5	-2.00	0.00	9.5	-1.00	0.00	9.5
	Val82	5.00	10.00	7.5	4.00	8.00	7.5	2.00	3.00	7.5
	Met83	5.00	5.00	10.5	2.00	5.00	10.0	6.00	5.00	6.5
	Val86	-6.80	4.00	8.0	0.80	0.10	7.5	-0.90	2.90	6.5
	Leu89	-4.90	0.80	9.5	-0.70	6.00	9.0	-8.00	-7.00	9.0
TMH3	Phe106	-7.00	-1.00	7.5	-2.00	-2.00	7.0	-2.00	-1.00	6.0
	Val107	-4.00	-3.00	5.5	-5.00	-5.00	5.5	-1.00	-3.00	5.5
	Thr108	-1.00	-1.00	9.0	0.00	1.00	9.0	1.00	1.00	9.0
	Leu109	-1.00	-1.00	9.0	-1.00	-1.00	9.0	-1.20	-1.30	9.5
	Asp110	-112.10	-100.90	4.0	-123.10	-109.00	3.5	-117.20	-107.00	4.0
	Val111	-8.90	1.10	5.0	-7.80	-1.00	5.5	-8.90	5.10	5.5
	Met112	2.00	1.00	9.0	1.00	1.00	9.0	1.00	0.00	9.0
	Met113	2.00	2.00	9.5	2.00	2.00	10.0	1.00	1.00	10.0
	Cys114	8.20	9.00	7.0	4.30	9.00	7.0	5.80	8.80	7.5
	Thr115	1.00	1.00	9.5	0.00	1.00	10.0	1.00	1.00	10.0
TMH4	Leu168	4.00	3.00	7.5	0.00	1.00	8.0	-2.00	1.00	8.0
ECL2	Asn173	0.00	1.00	10.5	0.00	-1.00	10.0	0.00	-2.00	10.0
	Cys181	-3.20	-3.70	9.0	-5.20	-6.70	8.5	-6.60	-6.10	8.0
	Ser182	4.00	5.90	7.0	1.40	3.70	6.5	-2.50	2.90	6.0
	Ile183	-9.50	-5.20	4.0	-8.40	-5.10	4.5	-15.80	-9.70	3.5
	Ser184	1.00	1.00	9.0	0.00	1.00	9.0	1.00	0.00	9.0
	Asn185	-5.00	-4.00	10.0	-1.00	-3.00	10.5	-5.00	-3.00	10.0
TMH5	Phe188	-4.00	-4.70	8.0	-2.00	-3.70	8.5	-2.00	-3.00	8.0
	Val189	-10.00	-6.00	7.5	-8.00	-6.00	7.5	-6.00	-4.00	8.0
	Ser192	-7.30	-4.20	8.5	-7.00	-4.50	9.0	-6.10	-4.90	9.0
	Ser193	-5.50	1.10	9.5	-2.70	0.20	10.0	-1.20	-1.00	10.5
	Ser196	-0.60	-0.90	9.0	-1.70	-0.90	9.5	0.00	0.00	10.0
TMH6	Trp342	-8.90	-4.00	5.0	-10.00	-6.00	5.0	-10.00	-1.00	5.0
	Phe345	-29.00	-8.00	2.5	-23.60	-8.90	3.0	-24.60	-11.10	3.5
	Phe346	-14.30	-9.80	7.0	-11.00	-9.00	7.5	-12.10	-8.30	7.5
	Thr348	-1.00	1.00	9.5	-1.00	0.00	10.0	1.00	1.00	9.5
	His349	-8.50	-2.30	4.5	-5.50	-0.30	4.5	-4.50	-1.30	5.0
	Val350	-3.00	-1.00	9.5	0.00	-2.00	10.0	0.00	-1.00	9.5
	Asn352	2.00	2.00	10.0	2.70	3.30	10.0	2.00	1.00	10.0
	Thr353	0.00	0.00	9.5	0.00	2.00	9.5	1.00	0.00	9.0
TMH7	Tyr365	-11.00	-13.00	5.0	-14.00	-11.00	5.0	-28.00	-16.00	5.0
	Ser366	-2.00	1.00	10.0	-2.00	-3.00	9.5	-2.00	-3.00	9.5
	Thr368	-1.00	-2.00	8.5	-1.00	-3.00	8.5	-1.00	-2.00	9.0
	Thr369	-13.20	-2.80	5.0	-13.30	-0.90	4.5	-12.00	-2.90	4.5
	Trp370	1.00	0.00	9.5	1.00	0.00	9.5	2.00	2.00	9.0
	Gly372	0.00	2.00	8.0	0.00	1.00	8.5	1.00	2.00	8.5
	Tyr373	-10.00	-4.00	6.0	-11.10	-5.60	5.5	-10.90	-6.60	5.5

When the interaction energies of amino acid residues belonging to the TMH2 region were calculated at the CRDI picture, it was observed a strong repulsive interaction. After QM/MM optimization, however, this repulsive effect was significantly reduced, mainly due to the approximation of haloperidol to the residue Leu89, which showed GGA-TS interaction energy of -7.00 kcal/mol after the QM/MM optimization in comparison with the 0.80 kcal/mol obtained within the CRDI picture. The electron density distribution in the binding cleft of the GGA-TS optimized structure within the QM/MM picture can be observed in Figure 7, where a high (low) electron density is represented in red (blue) color on an electrostatic potential isosurface, with color scales given at the right side.

As described in Table S5, all residues found as the most important for the binding of haloperidol in D3R are conserved in D2R. This

may explain the lack of selectivity observed for haloperidol. Nevertheless, among the 43 residues analyzed, six are non-conserved in D2R and D3R, suggesting that such differences may account to the selectivity of haloperidol either through the direct interaction in the binding pocket or promoting changes in the spatial arrangement of both receptors. As observed by Chien et al., (39) the different residue in the extracellular loops give rise to different D2R and D3R electrostatic surfaces in the second binding pocket, (38) which is formed by ECL1/ECL2 and the junction of helices I, II and VII. Interestingly, it was observed that haloperidol interacts strongly with Tyr373, a conserved residue that forms the second binding pocket. Tyr36 (Leu41 in D2R) is spatially positioned between Tyr373 and Glu95 in D3R and is arranged in the binding pocket closely to the 4-chloropheny fragment, showing a repulsive interaction with haloperidol. Moreover, Tyr36 is located at the extracellular end of TMH1 in a stretch of

five non-conserved residues, which should contribute to the differences in the packing between D2R and D3R. Also, the replacement of serines in the ELC2 (Ser182 and Ser184) of D3R, which are amino acids with uncharged side chain, for Isoleucine (Ser182-Ile183) and Alanine (Ser184-Ala185) in D2R, both with hydrophobic side chains contributes to the explanation of the higher affinity of haloperidol for D2R. In such scenario, the replacement of Ser182, which are facing the aromatic ring of haloperidol's 4-chlorophenyl fragment (region i), by isoleucine, would improve the hydrophobic effect in the cavity, increasing the interaction with aromatic ring of the 4-chlorophenyl fragment in a similar manner as observed in the interaction of Ile183 (D3R) and the aromatic ring of the 4-fluorophenyl fragment of haloperidol.

In order to evaluate the feasibility of designing new haloperidol derivatives using the BIRD panel results as a guideline, we have performed haloperidol modifications *in silico* and *in situ* (meaning that the haloperidol molecule was modified while docked to the D3R binding site) through the addition of functional groups OH, OOH or Cl. These modifications were also performed on the structure obtained after the QM/MM optimization procedure, followed by a classical optimization of the haloperidol derivatives and all hydrogen atoms of the D3R receptor.

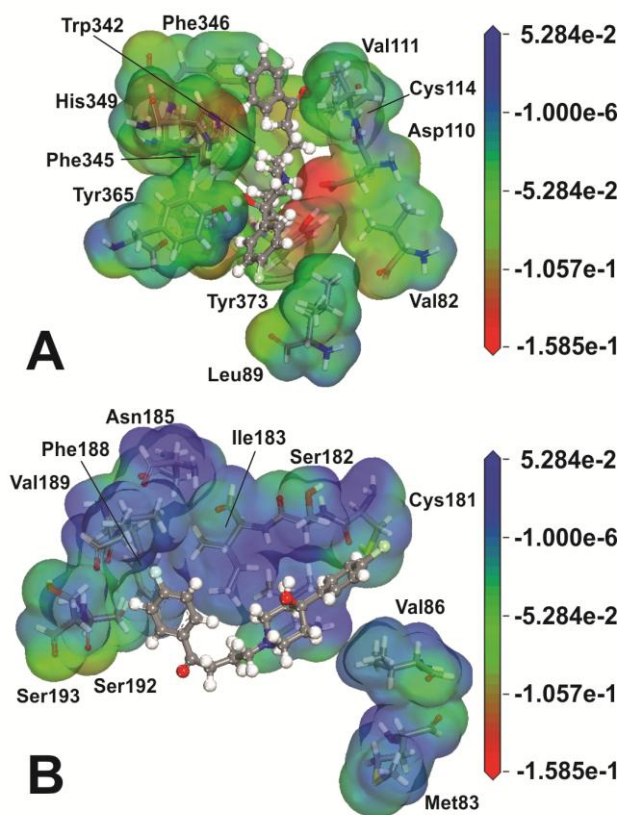


Figure 7. Electrostatic potential isosurfaces of the haloperidol-DR3 binding pocket after the GGA-TS QM/MM optimization. (A) Projected electron densities for the main interacting residues in the D3R binding pocket, highlighting negative charge concentrations at Asp110, Tyr373 and His349; (B) the interacting residues of TMH5 and ECL2 are depicted at the top, while the repulsive residues Met83 and Val86 from TMH2 are also represented right-below. Electrostatic potentials were calculated without taking into account the haloperidol molecule, which was inserted only to visualize which haloperidol regions interact with the residues.

For instance, the use of the information gathered in this study for the development of derivative/ novel compounds through computations performed at the GGA-TS level showed that the insertion of a hydroxyl group at C12 of haloperidol (see Figure 1A) enhances the attractive interaction with Asp110 from -107.00 kcal/mol to -121.80 kcal/mol, decreases the repulsive effect of Val86 from 2.90 kcal/mol to 0.50 kcal/mol, and enhances the Met83 repulsion from 5.00 kcal/mol to 8.00 kcal/mol. When a hydroxyl group was added to C24, small changes were observed in the haloperidol interaction with Phe188 (from -3.00 kcal/mol to -4.00 kcal/mol) and Ser193 (from -1.00 kcal/mol to -1.50 kcal/mol).

On the other hand, the addition of a hydroxyl group to C3 reduced significantly the derivative haloperidol interaction energy with Tyr365, located at the opposite site of the aromatic ring, with reduction of the attractive strength from -16.00 kcal/mol to -6.00 kcal/mol. Interaction with Leu89, which is close to C3, was not affected by the hydroxyl substitution, while Cys181 interacted more strongly (interaction energy changing from -6.10 kcal/mol to -10.70 kcal/mol), and Ser182 exhibited a reduction in its repulsive effect (from 2.90 kcal/mol to 0.60 kcal/mol). The OOH group addition at C3 reduced the attractive effect of Leu89 (from -7.00 kcal/mol to -3.00 kcal/mol).

As stated above, the use of the per residue interaction's information generated in this study can be a useful guide for the development of derivative and/or novel compounds. However, further experiments must be carried out to pursue the proposed advantageous modifications, taking into consideration the enhancement of clinical effects (through *in vitro* and *in vivo* assays) of such compounds. This includes the development of the synthesis of the proposed haloperidol derivatives, followed by the measurement of their IC₅₀ values at D3R. The authors hope the present work will stimulate efforts to turn our theoretical findings in new improved Schizophrenia medicines.

CONCLUSIONS

The lack of information on the detailed mechanism surrounding the binding interaction of small molecules in the dopamine receptor D3 motivated us to use computer simulations at the quantum level to investigate the relative energy contribution of individual amino acid residues to the binding of distinct antipsychotic agents. Our aim is to obtain data from typical and atypical agent coupled to D3 in order to map the relevant binding patterns, which will be crucial for the development of new, more potent and more selective antipsychotic agents. With such perspective, this work is the second of a series of studies to be carried out – ref (58) is the first one, and the next to follow briefly is about the antipsychotic risperidone. Here, by taking advantage of the crystallographic structure of the D3R binding site, we performed docking simulations of haloperidol, a typical antipsychotic agent, followed by the application of a QM/MM energy minimization strategy to improve the quality of the docking result.

The variation of the binding pocket radius r was taken into account to obtain a more accurate estimate of the haloperidol-D3R interaction energy, its value varying from 2.5 Å to 10 Å. Individual interaction energies with haloperidol for each amino acid residue in the binding pocket were thus estimated, showing the pivotal role of Asp110 followed by Tyr365, Phe345, Ile183, Phe346, Tyr373 and Cys114, among others. Conformation analysis pointed out the important role of the axial orientation of the haloperidol's hydroxyl, which has a significant attractive interaction with Tyr365. The haloperidol attractiveness strength to the D3R helices after the GGA-TS QM/MM calculations follows the

sequence TMH3 > TMH7 > TMH6 > ECL2 > TMH5 >> TMH2, being the interaction with the TMH2 region a repulsive one. Our results, therefore, are helpful to elucidate, at the molecular level, the binding features of the classical antipsychotic haloperidol with respect to the dopamine D3 receptor, highlighting hot spots to be acted upon on D3R with the purpose to develop better therapeutic atypical antipsychotics with the ability to selectively blockade this dopamine receptor. Finally, our state of the art simulations indicate that functional substitutions in the 4-chlorophenyl and in the 4-hydroxypiperidin-1-yl fragments (such as C3H and C12H hydrogen replacement by OH, OOH or Cl groups) can lead to haloperidol derivatives with distinct dopamine antagonism profiles. Our results are a first step towards *in silico* quantum biochemical design and probing of new medications to treat schizophrenia.

EXPERIMENTAL METHODS

Structural data

The calculations performed in this study have taken full advantage of the X-ray crystal structure of human dopamine D3 receptor in complex with eticlopride, PDB ID: 3PBL at 3.15 Å of resolution. (38) The D3R crystal asymmetric unit cell contains two receptors (A and B) in an antiparallel orientation exhibiting slight shape differences. We arbitrarily chose receptor A to prepare the docking input, replacing the eticlopride molecule by haloperidol in D3R. The preparation of the molecular structure and the protonation state set up at physiological pH of haloperidol were accomplished using the Marvin Sketch code version 5.5.0.1 (Marvin Beans Suite – ChemAxon). To adjust the molecular structure to the protonation state at physiological pH, a single hydrogen atom was added to the amine group of haloperidol, and its charge was adjusted to +1 (electron charge -1). The protonation state of the receptor was adjusted according to results obtained from the PROPKA 3.1 web server tool (<http://propka.ki.ku.dk/>) and from the Protonation tool in Discovery Studio package.

Molecular Docking

Molecular docking was performed using Autodock4. (63, 104, 105) To validate the docking protocol adopted in this work, we performed the re-docking of eticlopride in the D3 receptor, as describe elsewhere. (41, 106) Two distinct eticlopride conformations were selected: (i) the ligand in its crystallographic conformation, (ii) the ligand at the minimum energy configuration obtained after classical annealing and quantum DFT geometry optimization. For the docking of haloperidol, the molecule was build up and geometry improved using classical annealing followed by classical and quantum DFT (GGA-TS functional) energy minimization approaches. During the docking of haloperidol, the Lamarckian genetic algorithm (GA) was employed. Docking was performed 20 times using the optimized structure of haloperidol as the input file, a GA with 25,000,000 energy evaluations per run, population size set to 150, and a maximum of 27,000 generations per run. At the end, a thousand poses were obtained (50 poses per output) and clustered using a RMSD tolerance of 1.0 Å² using Autodock Tools. (63, 107)

Construction of the haloperidol-D3R complexes

An isolated haloperidol molecule was first DFT optimized, after wich it was docked (as described above) into its D3R binding pocket within a rigid-protein protocol. Among the clusters formed under a RMSD tolerance of 1.0 Å², the first pose (of those scored better than the threshold of -10 kcal/mol) were analyzed in order to choose the best representative pose. The haloperidol-D3R complexes were prepared using the dopamine D3 receptor structure after the removal of eticlopride. Every complex was first classically optimized in two consecutive steps: (i) only hydrogen atoms were free to move during optimization; (ii) hydrogen atoms

and the haloperidol molecule were free to move during optimization. The classical optimization procedure was performed using the Forcite code with the force field CVFF, the convergence tolerances set to 2.0 x 10⁻⁵ kcal/mol (total energy variation), 0.001 kcal/mol.Å (maximum force per atom), and 1.0 x 10⁻⁵ Å (maximum atomic displacement).

Pose selection

The score of the selected poses was revalidated, in order to ensure the accuracy of the method, through a classical binding energy calculation (E_b) of the best poses from the clusters scored better than the threshold, as described below:

$$E_b = E_{D3R+L} - (E_{D3R} + E_L) \quad (1)$$

At the right side of Eq. (1), the first term E_{D3R+L} is the total energy of the system formed by haloperidol binding in the D3R; E_{D3R} is the total energy of the D3 receptor alone, while the third term E_L is the total energy of the haloperidol molecule alone.

ONIOM (QM/MM) Optimization

The preparation of the inputs was performed through the TAO package. (108) Quantum mechanics/molecular mechanics (QM/MM) optimization was performed within the 2-layer ONIOM framework (109) available in the Gaussian code (110), employing the hybrid meta exchange-correlation functional M06-2X, (111, 112) and the 6-311G(d,p) basis set to expand the electronic orbitals for the QM layer. The AMBER force field was used to carry out the MM calculations within an electronic embedding scheme. Ligand charges were assigned using the AMBER force field, and all amino acid residues inside a 10.0 Å radius from the haloperidol centroid were allowed to move freely during the geometry optimization. Haloperidol was considered as belonging to the QM layer, while the entire D3 receptor was treated as belonging to the MM layer.

Classical and DFT calculations

Hydrogen atoms were inserted into the D3R X-ray structure to fill any dangling bonds, and their positions were optimized classically keeping the other atoms frozen. The classical optimization procedure was performed using the Forcite code with convergence tolerances set to 2.0 x 10⁻⁵ kcal/mol (total energy variation), 0.001 kcal/mol.Å (maximum force per atom) and 1.0 x 10⁻⁵ Å (maximum atomic displacement).

Calculations at the DFT level were carried out using the DMOL3 code (95, 113) to find out the interaction energies of haloperidol with the amino acid residues of D3R inside the binding pocket. The following exchange correlation functionals were employed: (i) Local Density Approximation (LDA-OBS) with PWC parameterization (67) and the OBS dispersion correction scheme, (68) and (ii) the Generalized Gradient Approximation (GGA-TS) with PBE parameterization (69) and TS dispersion correction (70). A Double Numerical plus Polarization (DNP) basis set was chosen to expand the Kohn-Sham orbitals for all electrons. The orbital cutoff was adjusted to ensure a good balance between accuracy and computational time. The self-consistent field (SCF) convergence threshold was set to 10⁻⁶ Ha, which is more than enough to reach a well converged electronic structure.

Molecular Fractionation with Conjugate Caps (MFCC) and Shielding Effects

The MFCC scheme is a very useful approach to be achieved an accurate description of biological systems through quantum calculations (43, 54-57) without a very high computational cost. In order to avoid missing important interactions, all amino acid residues within an increasing radius from the centroid of haloperi-

dol were taken into account until total energy convergence has occurred. For each amino acid residue, individual sets of capping fragments were formed, including disulfide concaps when necessary. The haloperidol molecule M and the i-th amino acid residue R_i interact, with R_i being capped by C_{i-1} and C_{i+1} , the first being the residue covalently bound to the R_i amine group, and the second being the residue covalently bound to the R_i carboxyl group. Hydrogen atoms were added to passivate all dangling bonds.

The electrostatic shielding effect due to the presence of neighbor residues R_b placed between haloperidol and R_i may contribute significantly to affect the M- R_i interaction (see Figure S2 in the supplementary material). In such situation, the interaction (binding) energy $E_i[M-R_i]$ is calculated at the DFT level (95, 113) in three steps. First, the energy taking into account both the R_b and R_i contributions (Figure S3), $E_i[M-R_bR_i]$ being evaluated according to:

$$E_i[M-R_bR_i]=E[M+C_{b-1}R_bC_{b+1}+C_{i-1}R_iC_{i+1}]-E[C_{b-1}R_bC_{b+1}+C_{i-1}R_iC_{i+1}]-E[M+C_{b-1}C_{b+1}+C_{i-1}C_{i+1}]+E[C_{b-1}C_{b+1}+C_{i-1}C_{i+1}]. \quad (2)$$

At the right side of Eq. (2), the first term $E[M+C_{b-1}R_bC_{b+1}+C_{i-1}R_iC_{i+1}]$ is the total energy of the system formed by haloperidol, shielding residues and the residue of interest with caps; $E[C_{b-1}R_bC_{b+1}+C_{i-1}R_iC_{i+1}]$ gives the total energy of the capped residues alone, while the third term $E[M+C_{b-1}C_{b+1}+C_{i-1}C_{i+1}]$ is the total energy of the system formed by the set of caps only and M; finally, $E[C_{b-1}C_{b+1}+C_{i-1}C_{i+1}]$ is the total energy of the system formed by the isolated caps.

After obtaining $E_i[M-R_bR_i]$, we calculate the interaction energy $E_i[M-R_b]$ between M and the shielding residues R_b (Figure S4) according with:

$$E_i[M-R_b]=E[M+C_{b-1}R_bC_{b+1}]-E[C_{b-1}R_bC_{b+1}]-E[M+C_{b-1}C_{b+1}]+E[C_{b-1}C_{b+1}]. \quad (3)$$

Here, each term in the second member is obtained from Eq. (2) by simply removing each occurrence of R_i , $C_{i-1}R_iC_{i+1}$, and $C_{i-1}C_{i+1}$, and. At last, the corresponding interaction energy $E_i[M-R_i]$ of M with R_i is calculated as follows:

$$E_i[M-R_i]=E_i[M-R_bR_i]-E_i[M-R_b]. \quad (4)$$

Energy stabilization versus residue distance to the centroid
To avoid using an arbitrary binding pocket size which could risk missing residues with important contributions to the binding energy (this always occurs in general), the binding pocket radius was varied until the total binding energy change was sufficiently small. The total binding energy as a function of the binding site radius was obtained for a 2.5-10 Å radius range with increasing steps of 0.5 Å. Only residues with at least one atom inside an imaginary sphere centered at the drug centroid were taken into account to compute the total binding energy at a chosen radius.

The BIRD Panel

Interaction energies of D3R individual amino acid residues with haloperidol within a given set of approximations were plotted in a panel labeled BIRD (acronym for Binding site, Interaction energy and Residues Domain) depicting:

(i) the binding energy (in kcal/mol) of the drug to each amino acid residue at the binding site employing horizontal bars. In this way, one can assess visually the relevance of each residue and the

nature of its interaction with the ligand, whether attractive or repulsive;

(ii) the most important residues contributing to the binding interaction, which are shown in a column of residues at the left panel side;

(iii) the corresponding region of the ligand, i, ii, iii, iv, etc. which is closer to each residue;

(iv) the distance of each residue to the centroid of the ligand molecule, provided at the right side of the panel.

Molecule Drawing and Images Acquisition
Marvin Sketch code version 5.5.0.1- 2011, ChemAxon (<http://www.chemaxon.com>), was used to draw the 2D haloperidol structure and to predict its protonation state at physiological pH. The images of the resulting poses were obtained using PyMol 1.3. (114)

AUTHORS INFORMATION

Corresponding Author

Geancarlo Zanatta
E-mail: geancarlo.zanatta@gmail.com
Departamento de Bioquímica
Rua Ramiro Barcelos, 2600 – anexo
Bairro Santa Cecília
90035-000 - Porto Alegre – RS
Phone: +55 51 3308-3570 / 3308-5551

Author Contributions

The manuscript was written through contributions of all authors. All authors have given approval to the final version of the manuscript.

ACKNOWLEDGMENT

The authors would like to thank the Brazilian System of High Performance Processing (Sistema Nacional de Processamento de Alto Desempenho – SINAPAD), specially CESUP-RS and CENAPAD-UFC. A.M., E. W. S. C., V.N.F., and C. G. are senior researchers from the Brazilian National Research Council (CNPq), and acknowledge the financial support received during the development of this work from the Brazilian Research Agency CNPq-INCT-Nano(Bio)Simes, project 573925/2008-9. E.W.S.C. received financial support from CNPq project 307843/2013-0. C.G. received financial support from CNPq project 478916/2010-8.

REFERENCES

- Messias, E. L., Chen, C. Y., and Eaton, W. W. (2007) Epidemiology of schizophrenia: review of findings and myths, *Psychiatr. Clin. North Am.* 30, 323-338.
- Andreasen, N. C. (1993) Positive and Negative Symptoms of Psychosis - a Citation-Classic Commentary on Negative Symptoms in Schizophrenia - Definition and Reliability by Andreasen, N.C., and on Negative V Positive Schizophrenia - Definition and Validation by Andreasen, N.C., Olsen, S., *Ce/Clin Med*, 8-8.
- Andreasen, N. C. (1982) Negative V Positive Schizophrenia - Definition and Validation, *Archives of General Psychiatry* 39, 789-794.
- WHO, W. H. O. (2001) Nations for Mental Health - Schizophrenia and public health, *Geneva*.

5. Roshni Mangalore, M. K. (2007) Cost of schizophrenia in England, *Journal of Mental Health Policy and Economics* 10, 23-41.
6. McEvoy, J. (2007) The costs of schizophrenia., *J. Clin. Psychiatry* 68 Suppl 14:4-7.
7. Stahl, S. M. (2003) Describing an Atypical Antipsychotic: Receptor Binding and Its Role in Pathophysiology, *The Journal of Clinical Psychiatry* 5, 9-13.
8. Strange, P. G. (2001) Antipsychotic Drugs: Importance of Dopamine Receptors for Mechanisms of Therapeutic Actions and Side Effects, *Pharmacol. Rev.* 53, 119-134.
9. Carlsson, A., and Lindqvist, M. (1963) Effect of Chlorpromazine or Haloperidol on Formation of 3-methoxytyramine and Normetanephrine in Mouse Brain, *Acta Pharmacol. Toxicol. (Copenh)*. 20, 140-144.
10. Kapur, S., and Seeman, P. (2001) Does Fast Dissociation From the Dopamine D2 Receptor Explain the Action of Atypical Antipsychotics?: A New Hypothesis, *The American Journal of Psychiatry* 158, 360-369.
11. Chien, W. T., and Yip, A. L. (2013) Current approaches to treatments for schizophrenia spectrum disorders, part I: an overview and medical treatments, *Neuropsychiatr Dis Treat* 9, 1311-1332.
12. Keabian, J. W., and Calne, D. B. (1979) Multiple receptors for dopamine, *Nature* 277, 93-96.
13. Jaber, M., Robinson, S. W., Missale, C., and Caron, M. G. (1997) Dopamine receptors and brain function, *Neuropharmacology* 35, 1503-1519.
14. Rasmussen, S. G., Choi, H. J., Rosenbaum, D. M., Kobilka, T. S., Thian, F. S., Edwards, P. C., Burghammer, M., Ratnala, V. R., Sanishvili, R., Fischetti, R. F., Schertler, G. F., Weis, W. I., and Kobilka, B. K. (2007) Crystal structure of the human beta2 adrenergic G-protein-coupled receptor, *Nature* 450, 383-387.
15. Ayers, P. W., Morrison, R. C., and Roy, R. K. (2002) Variational principles for describing chemical reactions: Condensed reactivity indices, *The Journal of Chemical Physics* 116, 8731-8744.
16. De Lean, A., Stadel, J. M., and Lefkowitz, R. J. (1980) A ternary complex model explains the agonist-specific binding properties of the adenylate cyclase-coupled beta-adrenergic receptor, *J. Biol. Chem.* 255, 7108-7117.
17. Ostrowski, J., Kjelsberg, M. A., Caron, M. G., and Lefkowitz, R. J. (1992) Mutagenesis of the beta2-Adrenergic Receptor: How Structure Elucidates Function, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 32, 167-183.
18. Sibley, D. R., and Monsma, F. J. (1992) Molecular biology of dopamine receptors, *Trends Pharmacol. Sci.* 13, 61-69.
19. Missale, C., Nash, S. R., Robinson, S. W., Jaber, M., and Caron, M. G. (1998) Dopamine Receptors: From Structure to Function, *Physiol. Rev.* 78, 189-225.
20. Shimohama, S., Sawada, H., Kitamura, Y., and Taniguchi, T. (2003) Disease model: Parkinson's disease, *Trends in Molecular Medicine* 9, 360-365.
21. Joyce, J. N. (2001) Dopamine D3 receptor as a therapeutic target for antipsychotic and antiparkinsonian drugs, *Pharmacol. Ther.* 90, 231-259.
22. Prasad, S. S., Kojic, L. Z., Li, P., Mitchell, D. E., Hachisuka, A., Sawada, J., Gu, Q., and Cynader, M. S. (2002) Gene expression patterns during enhanced periods of visual cortex plasticity, *Neuroscience* 111, 35-45.
23. Joyce, J. N., and Meador-Woodruff, J. H. (1997) Linking the Family of D2 Receptors to Neuronal Circuits in Human Brain: Insights into Schizophrenia, *Neuropsychopharmacology* 16, 375-384.
24. Seeman, P., Wilson, A., Gmeiner, P., and Kapur, S. (2006) Dopamine D2 and D3 receptors in human putamen, caudate nucleus, and globus pallidus, *Synapse* 60, 205-211.
25. Sokoloff, P., Giros, B., Martres, M.-P., Bouthenet, M.-L., and Schwartz, J.-C. (1990) Molecular cloning and characterization of a novel dopamine receptor (D3) as a target for neuroleptics, *Nature* 347, 146-151.
26. Chen, J., Levant, B., and Wang, S. (2012) High-affinity and selective dopamine D3 receptor full agonists, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 22, 5612-5617.
27. Carlsson, J., Coleman, R. G., Setola, V., Irwin, J. J., Fan, H., Schlessinger, A., Sali, A., Roth, B. L., and Shoichet, B. K. (2011) Ligand discovery from a dopamine D3 receptor homology model and crystal structure, *Nat Chem Biol* 7, 769-778.
28. Löber, S., Hübner, H., Tschammer, N., and Gmeiner, P. (2011) Recent advances in the search for D3- and D4-selective drugs: probes, models and candidates, *Trends Pharmacol. Sci.* 32, 148-157.
29. Park, W.-K., Jeong, D., Yun, C.-W., Lee, S., Cho, H., Kim, G.-D., Koh, H. Y., Pae, A. N., Cho, Y. S., Choi, K. I., Jung, J. Y., Jung, S. H., and Kong, J. Y. (2003) Pharmacological actions of a novel and selective dopamine D3 receptor antagonist, KCH-1110, *Pharmacol. Res.* 48, 615-622.
30. Campiani, G., Butini, S., Fattorusso, C., Catalanotti, B., Gemma, S., Nacci, V., Morelli, E., Cagnotto, A., Meregheiti, I., Mennini, T., Carli, M., Minetti, P., Di Cesare, M. A., Mastroianni, D., Scafetta, N., Galletti, B., Stasi, M. A., Castorina, M., Pacifici, L., Vertechy, M., Serio, S. D., Ghirardi, O., Tinti, O., and Carminati, P. (2003) Pyrrolo[1,3]benzothiazepine-Based Serotonin and Dopamine Receptor Antagonists. Molecular Modeling, Further Structure-Activity Relationship Studies, and Identification of Novel Atypical Antipsychotic Agents, *J. Med. Chem.* 47, 143-157.
31. Ji, M., Chen, J., Ding, K., Wu, X., Varady, J., Levant, B., and Wang, S. (2005) Design, synthesis and structure-activity relationship studies of hexahydropyrazinoquinolines as a novel class of potent and selective dopamine receptor 3 (D3) ligands, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 15, 1701-1705.
32. Janssen, P. J., Jageneau, A. M., and Schellekens, K. L. (1960) Chemistry and pharmacology of compounds related to 4-(4-hydroxy-4-phenyl-piperidino)-butyrophenone, *Psychopharmacologia* 1, 389-392.
33. Mutschler, E., Derendorf, H., Schafer-Korting, M., Elrod, K., and Ester, K. S. (1995) Drug actions: basic principles and therapeutic aspects, *Medpharm Scientific Publishers, Stuttgart*, 116-125.
34. Luedtke, R. R., Mishra, Y., Wang, Q., Griffin, S. A., Bell-Horner, C., Taylor, M., Vangveravong, S., Dillon, G. H., Huang, R.-Q., Reichert, D. E., and Mach, R. H. (2012) Comparison of the Binding and Functional Properties of Two Structurally Different D2 Dopamine Receptor Subtype Selective Compounds, *ACS Chemical Neuroscience* 3, 1050-1062.
35. Seeman, P. (2001) Antipsychotic drugs, dopamine receptors, and schizophrenia, *Clinical Neuroscience Research* 1, 53-60.
36. Malmberg, Mikael, and Mohell, N. (1998) Agonist and inverse agonist activity at the dopamine D3 receptor measured by guanosine 5'-gamma-thio-triphosphate-35S- binding, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 285, 119-126.
37. Roth, B. L., Sheffler, D. J., and Kroeze, W. K. (2004) Magic shotguns versus magic bullets: selectively non-selective drugs for mood disorders and schizophrenia, *Nat Rev Drug Discov* 3, 353-359.
38. Chien, E. Y. T., Liu, W., Zhao, Q., Katritch, V., Won Han, G., Hanson, M. A., Shi, L., Newman, A. H., Javitch, J. A., Cherezov, V., and Stevens, R. C. (2010) Structure of the Human Dopamine D3 Receptor in Complex with a D2/D3 Selective Antagonist, *Science* 330, 1091-1095.
39. Andressen, O. A., and Jørgensen, H. A. (2000) Neurotoxicity associated with neuroleptic-induced oral dyskinesias in rats: Implications for tardive dyskinesia?, *Prog. Neurobiol.* 61, 525-541.
40. Meltzer, H. Y., Thompson, P. A., Lee, M. A., and Ranjan, R. (1996) Neuropsychologic deficits in schizophrenia: Relation to social function and effect of antipsychotic drug treatment, *Neuropsychopharmacology* 14, 27S-33S.
41. Mohammad, M. K., Al-masri, I. M., Taha, M. O., Al-Ghoussein, M. A. S., AlKhatib, H. S., Najjar, S., and Bustanji, Y. (2008) Olanzapine inhibits glycogen synthase kinase-3β: An investigation by docking simulation and experimental validation, *Eur. J. Pharmacol.* 584, 185-191.
42. Sharma, A., and Shaw, S. R. (2012) Efficacy of Risperidone in Managing Maladaptive Behaviors for Children With Autistic Spectrum Disorder: A Meta-Analysis, *J. Pediatr. Health Care* 26, 291-299.

43. Gao, A. M., Zhang, D. W., Zhang, J. Z. H., and Zhang, Y. (2004) An efficient linear scaling method for ab initio calculation of electron density of proteins, *Chemical Physics Letters* 394, 293-297.
44. Feng, Z., Hou, T., and Li, Y. (2012) Selectivity and activation of dopamine D3R from molecular dynamics, *J Mol Model* 18, 5051-5063.
45. Platania, C. B. M., Salomone, S., Leggio, G. M., Drago, F., and Bucolo, C. (2012) Homology Modeling of Dopamine D₂ and D₃ Receptors: Molecular Dynamics Refinement and Docking Evaluation, *PLoS ONE* 7, e44316.
46. Abagyan, R., and Totrov, M. (2001) High-throughput docking for lead generation, *Curr. Opin. Chem. Biol.* 5, 375-382.
47. Sousa, S. F., Fernandes, P. A., and Ramos, M. J. (2006) Protein-ligand docking: Current status and future challenges, *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics* 65, 15-26.
48. Brooijmans, N., and Kuntz, I. D. (2003) MOLECULAR RECOGNITION AND DOCKING ALGORITHMS, *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 32, 335-373.
49. Cho, A. E., Chung, J. Y., Kim, M., and Park, K. (2009) Quantum mechanical scoring for protein docking, *J. Chem. Phys.* 131, 134108.
50. Raha, K., Peters, M. B., Wang, B., Yu, N., Wollacott, A. M., Westerhoff, L. M., and Merz, K. M., Jr. (2007) The role of quantum mechanics in structure-based drug design., *Drug Discovery Today* 12, 725-731.
51. Zhou, T., Huang, D., and Caflisch, A. (2010) Quantum Mechanical Methods for Drug Design, *Current Topics in Medicinal Chemistry* 10, 33-45.
52. Hohenberg, P., and Kohn, W. (1964) Inhomogeneous Electron Gas, *Physical Review* 136, B864.
53. Kohn, W., and Sham, L. J. (1965) Self-Consistent Equations Including Exchange and Correlation Effects, *Physical Review* 140, A1133.
54. Chen, X., Zhang, Y., and Zhang, J. Z. H. (2005) An efficient approach for ab initio energy calculation of biopolymers, *The Journal of Chemical Physics* 122, 184105.
55. He, X., and Zhang, J. Z. H. (2005) A new method for direct calculation of total energy of protein, *The Journal of Chemical Physics* 122, 031103-031104.
56. Zhang, D. W., and Zhang, J. Z. H. (2003) Molecular fractionation with conjugate caps for full quantum mechanical calculation of protein-molecule interaction energy, *The Journal of Chemical Physics* 119, 3599-3605.
57. Gordon, M. S., Fedorov, D. G., Pruitt, S. R., and Slipchenko, L. V. (2011) Fragmentation Methods: A Route to Accurate Calculations on Large Systems, *Chem. Rev.* 112, 632-672.
58. Zanatta, G., Barroso-Neto, I. L., Bambini-Junior, V., Dutra, M. F., Bezerra, E. M., da Costa, R. F., Caetano, E. W. S., Cavada, B. S., Freire, V. N., and Gottfried, C. (2012) Quantum Biochemistry Description of the Human Dopamine D₃ Receptor in Complex with the Selective Antagonist Eticlopride, *Proteomics & Bioinformatics* 5, 155-162.
59. Barroso-Neto, I. L., Marques, J. P. C., da Costa, R. F., Caetano, E. W. S., Cavada, B. S., Gottfried, C., and Freire, V. N. (2012) Inactivation of Ovine Cyclooxygenase-1 by Bromoaspirin and Aspirin: A Quantum Chemistry Description, *The Journal of Physical Chemistry B* 116, 3270-3279.
60. Rodrigues, C. R. F., Oliveira, J. I. N., Fulco, U. L., Albuquerque, E. L., Moura, R. M., Caetano, E. W. S., and Freire, V. N. (2013) Quantum biochemistry study of the T3-785 tropocollagen triple-helical structure, *Chemical Physics Letters* 559, 88-93.
61. da Costa, R. F., Freire, V. N., Bezerra, E. M., Cavada, B. S., Caetano, E. W. S., de Lima Filho, J. L., and Albuquerque, E. L. (2012) Explaining statin inhibition effectiveness of HMG-CoA reductase by quantum biochemistry computations, *Physical Chemistry Chemical Physics* 14, 1389-1398.
62. Martins, A. C. V., de Lima-Neto, P., Barroso-Neto, I. L., Cavada, B. S., Freire, V. N., and Caetano, E. W. S. (2013) An ab initio explanation of the activation and antagonism strength of an AMPA-sensitive glutamate receptor, *Rsc Advances* 3, 14988-14992.
63. Morris, G. M., Huey, R., Lindstrom, W., Sanner, M. F., Belew, R. K., Goodsell, D. S., and Olson, A. J. (2009) AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility, *Journal of Computational Chemistry* 30, 2785-2791.
64. Burger, S. K., Thompson, D. C., and Ayers, P. W. (2010) Quantum Mechanics/Molecular Mechanics Strategies for Docking Pose Refinement: Distinguishing between Binders and Decoys in Cytochrome c Peroxidase, *Journal of Chemical Information and Modeling* 51, 93-101.
65. Chung, L. W., Hirao, H., Li, X., and Morokuma, K. (2012) The ONIOM method: its foundation and applications to metalloenzymes and photobiology, *Wiley Interdisciplinary Reviews: Computational Molecular Science* 2, 327-350.
66. Hirshfeld, F. L. (1977) *Theor. Chim. Acta* 44.
67. Perdew, J. P., and Wang, Y. (1992) Accurate and simple analytic representation of the electron-gas correlation energy, *Physical Review B* 45, 13244-13249.
68. Ortmann, F., Bechstedt, F., and Schmidt, W. G. (2006) Semiempirical van der Waals correction to the density functional description of solids and molecular structures, *Physical Review B* 73, 205101.
69. Perdew, J. P., Burke, K., and Ernzerhof, M. (1996) Generalized Gradient Approximation Made Simple, *Physical Review Letters* 77, 3865-3868.
70. Tkatchenko, A., and Scheffler, M. (2009) Accurate Molecular Van Der Waals Interactions from Ground-State Electron Density and Free-Atom Reference Data, *Physical Review Letters* 102, 073005.
71. Martin, Y., and Muchmore, S. (2012) Frozen out: molecular modeling in the age of cryocrystallography, *J. Comput. Aided Mol. Des.* 26, 91-92.
72. Król, M., Chaleil, R. A. G., Tournier, A. L., and Bates, P. A. (2007) Implicit flexibility in protein docking: Cross-docking and local refinement, *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics* 69, 750-757.
73. Teague, S. J. (2003) Implications of protein flexibility for drug discovery, *Nat Rev Drug Discov* 2, 527-541.
74. Chang, Y.-A., Ares, J., Anderson, K., Sabol, B., Wallace, R. A., Farooqui, T., Uretsky, N., and Miller, D. D. (1987) Dopamine agonists: effects of charged and uncharged analogs of dopamine, *J. Med. Chem.* 30, 214-218.
75. Hjerde, E., Dahl, S. G., and Sylte, I. (2005) Atypical and typical antipsychotic drug interactions with the dopamine D₂ receptor, *European Journal of Medicinal Chemistry* 40, 185-194.
76. Wang, Q., Mach, R. H., Luedtke, R. R., and Reichert, D. E. (2010) Subtype selectivity of dopamine receptor ligands: insights from structure and ligand-based methods, *J Chem Inf Model* 50, 1970-1985.
77. Keller, C., Karr, P., Zandler, M., and Carper, W. R. (1992) Conformational studies of haloperidol, *Struct Chem* 3, 195-201.
78. Reed, L. L., and Schaefer, J. P. (1973) The crystal and molecular structure of haloperidol, a potent psychotropic drug, *Acta Crystallographica Section B* 29, 1886-1890.
79. Boström, J., Hogner, A., and Schmitt, S. (2006) Do Structurally Similar Ligands Bind in a Similar Fashion?, *J. Med. Chem.* 49, 6716-6725.
80. Reckien, W., Janetzko, F., Peintinger, M. F., and Bredow, T. (2012) Implementation of empirical dispersion corrections to density functional theory for periodic systems, *Journal of Computational Chemistry* 33, 2023-2031.
81. Silva, A. M., Silva, B. P., Sales, F. A. M., Freire, V. N., Moreira, E., Fulco, U. L., Albuquerque, E. L., Maia, F. F., Jr., and Caetano, E. W. S. (2012) Optical absorption and DFT calculations in L-aspartic acid anhydrous crystals: Charge carrier effective masses point to semiconducting behavior, *Physical Review B* 86, 195201.
82. Nalewajski, R. F., and Parr, R. G. (2000) Information theory, atoms in molecules, and molecular similarity, *Proceedings of the National Academy of Sciences* 97, 8879-8882.
83. Kinkar Roy, R., Hirao, K., Krishnamurty, S., and Pal, S. (2001) Mulliken population analysis based evaluation of condensed Fukui function indices using fractional molecular charge, *The Journal of Chemical Physics* 115, 2901-2907.
84. Roy, R. K., Pal, S., and Hirao, K. (1999) On non-negativity of Fukui function indices, *The Journal of Chemical Physics* 110, 8236-8245.

85. Parr, R. G., and Yang, W. (1984) Density functional approach to the frontier-electron theory of chemical reactivity, *Journal of the American Chemical Society* 106, 4049-4050.
86. Mulliken, R. S. (1955) Electronic Population Analysis on LCAO-MO Molecular Wave Functions. I, *The Journal of Chemical Physics* 23, 1833-1840.
87. Foster, J. P., and Weinhold, F. (1980) Natural hybrid orbitals, *Journal of the American Chemical Society* 102, 7211-7218.
88. Bonaccorsi, R., Scrocco, E., and Tomasi, J. (1970) Molecular SCF Calculations for the Ground State of Some Three-Membered Ring Molecules: (CH₂)₃, (CH₂)₂NH, (CH₂)₂NH₂⁺, (CH₂)₂O, (CH₂)₂S, (CH)₂CH₂, and N₂CH₂, *The Journal of Chemical Physics* 52, 5270-5284.
89. Davidson, E., and Chakravorty, S. (1992) A test of the Hirshfeld definition of atomic charges and moments, *Theoret. Chim. Acta* 83, 319-330.
90. Bultinck, P., Van Alsenoy, C., Ayers, P. W., and Carbó-Dorca, R. (2007) Critical analysis and extension of the Hirshfeld atoms in molecules, *The Journal of Chemical Physics* 126, -.
91. Ayers, P. (2006) Information Theory, the Shape Function, and the Hirshfeld Atom, *Theor Chem Account* 115, 370-378.
92. Parr, R. G., Ayers, P. W., and Nalewajski, R. F. (2005) What Is an Atom in a Molecule?, *The Journal of Physical Chemistry A* 109, 3957-3959.
93. Verstraelen, T., Sukhomlinov, S. V., Van Speybroeck, V., Waroquier, M., and Smirnov, K. S. (2011) Computation of Charge Distribution and Electrostatic Potential in Silicates with the Use of Chemical Potential Equalization Models, *The Journal of Physical Chemistry C* 116, 490-504.
94. Bultinck, P., Fias, S., Van Alsenoy, C., Ayers, P. W., and Carbó-Dorca, R. (2007) Critical thoughts on computing atom condensed Fukui functions, *The Journal of Chemical Physics* 127, -.
95. Delley, B. (2000) From molecules to solids with the DMol[sup 3] approach, *The Journal of Chemical Physics* 113, 7756-7764.
96. Alberts, G. L., Pregenzer, J. F., and Bin Im, W. (1998) Contributions of cysteine 114 of the human D3 dopamine receptor to ligand binding and sensitivity to external oxidizing agents, *Br. J. Pharmacol.* 125, 705-710.
97. Mansour, A., Meng, F., Meador-Woodruff, J. H., Taylor, L. P., Civelli, O., and Akil, H. (1992) Site-directed mutagenesis of the human dopamine D2 receptor, *European Journal of Pharmacology: Molecular Pharmacology* 227, 205-214.
98. Soriano-Ursúa, M. A., Ocampo-López, J. O., Ocampo-Mendoza, K., Trujillo-Ferrara, J. G., and Correa-Basurto, J. (2011) Theoretical study of 3-D molecular similarity and ligand binding modes of orthologous human and rat D2 dopamine receptors, *Comput. Biol. Med.* 41, 537-545.
99. Kalani, M. Y. S., Vaidehi, N., Hall, S. E., Trabanino, R. J., Freddolino, P. L., Kalani, M. A., Floriano, W. B., Kam, V. W. T., and Goddard, W. A. (2004) The predicted 3D structure of the human D2 dopamine receptor and the binding site and binding affinities for agonists and antagonists, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 3815-3820.
100. Javitch, J. A., Fu, D., and Chen, J. (1996) Differentiating dopamine D2 ligands by their sensitivities to modification of the cysteine exposed in the binding-site crevice, *Mol. Pharmacol.* 49, 692-698.
101. Boeckler, F., and Gmeiner, P. (2006) The structural evolution of dopamine D3 receptor ligands: Structure-activity relationships and selected neuropharmacological aspects, *Pharmacol. Ther.* 112, 281-333.
102. Sikazwe, D. M. N., Li, S., Mardenborough, L., Cody, V., Roth, B. L., and Ablordeppey, S. Y. (2004) Haloperidol: towards further understanding of the structural contributions of its pharmacophoric elements at D2-like receptors, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 14, 5739-5742.
103. Kortagere, S., Cheng, S.-Y., Antonio, T., Zhen, J., Reith, M. E. A., and Dutta, A. K. (2011) Interaction of novel hybrid compounds with the D3 dopamine receptor: Site-directed mutagenesis and homology modeling studies, *Biochem. Pharmacol.* 81, 157-163.
104. Huey, R., Morris, G. M., Olson, A. J., and Goodsell, D. S. (2007) A semiempirical free energy force field with charge-based desolvation, *Journal of Computational Chemistry* 28, 1145-1152.
105. Morris, G. M., Goodsell, D. S., Halliday, R. S., Huey, R., Hart, W. E., Belew, R. K., and Olson, A. J. (1998) Automated docking using a Lamarckian genetic algorithm and an empirical binding free energy function, *Journal of Computational Chemistry* 19, 1639-1662.
106. Halperin, I., Ma, B., Wolfson, H., and Nussinov, R. (2002) Principles of docking: An overview of search algorithms and a guide to scoring functions, *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics* 47, 409-443.
107. Sanner, M. F. (1999) Python: A Programming Language for Software Integration and Development., *J. Mol. Graphics Mod.* 17, February, 57-61.
108. Tao, P., Fisher, J. F., Shi, Q., Vreven, T., Mobashery, S., and Schlegel, H. B. (2009) Matrix Metalloproteinase 2 Inhibition: Combined Quantum Mechanics and Molecular Mechanics Studies of the Inhibition Mechanism of (4-Phenoxyphenylsulfonyl)methylthiirane and Its Oxirane Analogue, *Biochemistry (Mosc.)* 48, 9839-9847.
109. Vreven, T., Morokuma, K., Farkas, Ö., Schlegel, H. B., and Frisch, M. J. (2003) Geometry optimization with QM/MM, ONIOM, and other combined methods. I. Microiterations and constraints, *Journal of Computational Chemistry* 24, 760-769.
110. Frisch, M. J., Trucks, G. W., Schlegel, H. B., Scuseria, G. E., Robb, M. A., Cheeseman, J. R., Scalmani, G., Barone, V., Mennucci, B., Petersson, G. A., Nakatsuji, H., Caricato, M., Li, X. H., H. P.; Izmaylov, A. F., Bloino, J. Z., G.; , Sonnenberg, J. L., Hada, M. E., M.; , Toyota, K., Fukuda, R., Hasegawa, J., Ishida, M., Nakajima, T., Honda, Y., Kitao, O., Nakai, H., Vreven, T., Montgomery, J., J. A.; , Peralta, J. E., Ogliaro, F., Bearpark, M., Heyd, J. J., Brothers, E., Kudin, K. N., Staroverov, V. N., Kobayashi, R., Normand, J., Raghavachari, K., Rendell, A., Burant, J. C., Iyengar, S. S., Tomasi, J., Cossi, M., Rega, N., Millam, J. M., Klene, M., Knox, J. E., Cross, J. B., Bakken, V., Adamo, C., Jaramillo, J., Gomperts, R., Stratmann, R. E., Yazyev, O., Austin, A. J., Cammi, R., Pomelli, C., Ochterski, J. W., Martin, R. L., Morokuma, K., Zakrzewski, V. G., Voth, G. A., Salvador, P., Dannenberg, J. J., Dapprich, S., Daniels, A. D., Farkas, Ö., Foresman, J. B., Ortiz, J. V., Cioslowski, J., and Fox, D. J. Gaussian 09, Revision A.1, *Gaussian, Inc., Wallingford CT, 2009*.
111. Zhao, Y., and Truhlar, D. G. (2008) Exploring the Limit of Accuracy of the Global Hybrid Meta Density Functional for Main-Group Thermochemistry, Kinetics, and Noncovalent Interactions, *Journal of Chemical Theory and Computation* 4, 1849-1868.
112. Zhao, Y., and Truhlar, D. (2008) The M06 suite of density functionals for main group thermochemistry, thermochemical kinetics, noncovalent interactions, excited states, and transition elements: two new functionals and systematic testing of four M06-class functionals and 12 other functionals, *Theor Chem Acc* 120, 215-241.
113. Delley, B. (1990) An all-electron numerical method for solving the local density functional for polyatomic molecules, *The Journal of Chemical Physics* 92, 508-517.
114. Schrodinger, LLC. (2010) The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.3r1.

Captions

Figure 1. (A) Atom labels for haloperidol at physiological pH. Region i has the 4-chlorophenyl fragment; region ii has the 4-hydroxypiperidin-1-yl fragment with the tertiary amine protonated; region iii has the butan-1-one fragment, and region iv has the 4-fluorophenyl fragment. (B) Electron density calculated using DFT projected onto an electrostatic potential isosurface. Negatively charged regions are in red and positively charged regions are in blue, as depicted in the charge scale.

Figure 2. QM/MM optimization after haloperidol docking in D3R. (A) The haloperidol ligand at the binding pocket of D3R, with its atoms depicted as spheres scaled according with the respective van der Waals (VDW) radii. The binding region is enclosed by the dashed red circle. (B) Orientation and structure of haloperidol in its D3R binding pocket. The amino acid residue Asp110 in helix III, which is pivotal to the D3R haloperidol binding, is indicated together with other important residues.

Figure 3. Different views of the D3R-haloperidol geometry before (CRDI) and after (QMDI) QM/MM optimization. (A) Hydrogen bonds of haloperidol with Asp110 and Tyr365 are almost unaffected by QM/MM optimization; (B) the rearrangement of haloperidol and the side chain Ile183 is depicted; (C) large displacement of haloperidol region I (4-chlorophenyl fragment); (D) QM/MM optimization promotes the reduction of the haloperidol distance from Leu89 and Cys181, increasing their attractive interaction with haloperidol.

Figure 4. Behavior of the haloperidol-D3R total interaction energy as a function of the binding pocket radius. Computations were performed within the DFT formalism using the (A) LDA-OBS and (B) the GGA-TS functionals.

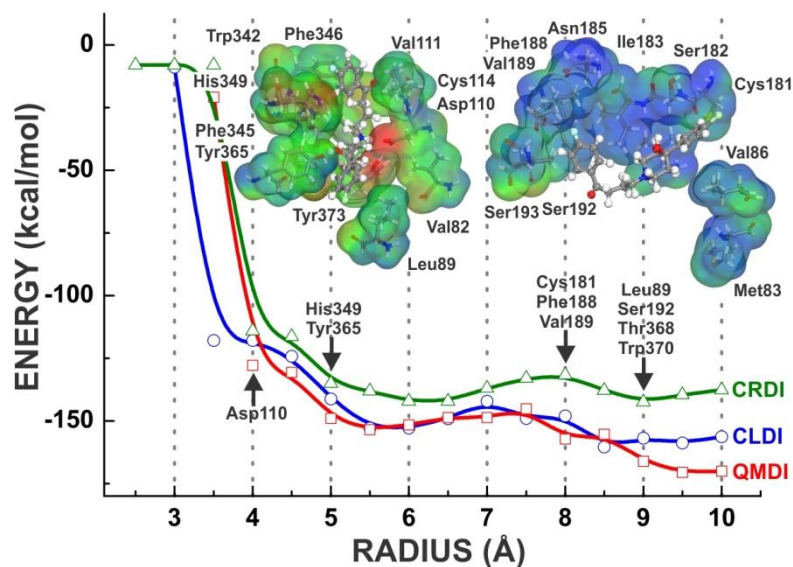
Figure 5. (A) BIRD panel showing the interaction energy for each amino acid residue in the D3R binding pocket evaluated considering the LDA exchange-correlation functional with OBS dispersion correction; (B) BIRD panel showing the interaction energy for each amino acid residue in the D3R binding pocket evaluated considering the GGA exchange-correlation functional with TS dispersion correction.

Figure 6. Spatial arrangement of some D3R amino acid residues interacting with haloperidol. Their interaction energies rank among the largest GGA-TS calculated contributions to the total Haloperidol-D3R binding energy. The residues-haloperidol distances are depicted by yellow dashed lines.

Figure 7. Electrostatic potential isosurfaces of the haloperidol-D3R binding pocket after the GGA-TS QM/MM optimization. (A) Projected electron densities for the main interacting residues in the D3R binding pocket, highlighting negative charge concentrations at Asp110, Tyr373 and His349; (B) the interacting residues of TMH5 and ECL2 are depicted at the top, while the repulsive residues Met83 and Val86 from TMH2 are also represented right-below. Electrostatic potentials were calculated without taking into account the haloperidol molecule, which was inserted only to visualize which haloperidol regions interact with the residues.

Table 1. Individual amino acid residue contributions to the total haloperidol-D3R interaction energy calculated at the LDA and GGA+TS levels. Energies are given in kcal/mol and the radial distance of each residue do the haloperidol centroid in Å.

Table of Contents



Antipsychotic Haloperidol Binding to the Human Dopamine D3 Receptor: Going beyond Docking Through QM/MM Refinement for the Design of Improved Schizophrenia Medicines

Geancarlo Zanatta^{a*}, Gustavo Nunes^a, Eveline M. Bezerra^b, Roner F. da Costa^c, Alice Martins^b, Ewerton W. S. Caetano^d, Valder N. Freire^e, Carmem Gottfried^a

^a Department of Biochemistry at Federal University of Rio Grande do Sul, 90035-003 Porto Alegre, RS, Brazil;

^b Post-graduate Program in Pharmaceutical Sciences, Pharmacy Faculty, Federal University of Ceará, 60430-372 Fortaleza, CE, Brazil;

^c Department of Physics, Universidade Federal Rural do Semi-Árido, 59780-000 Caraúbas, RN, Brazil;

^d Federal Institute of Education, Science and Technology, 60040-531 Fortaleza, CE, Brazil;

^e Department of Physics at Federal University of Ceará, 60455-760 Fortaleza, CE, Brazil.

SUPPORTING INFORMATIONS

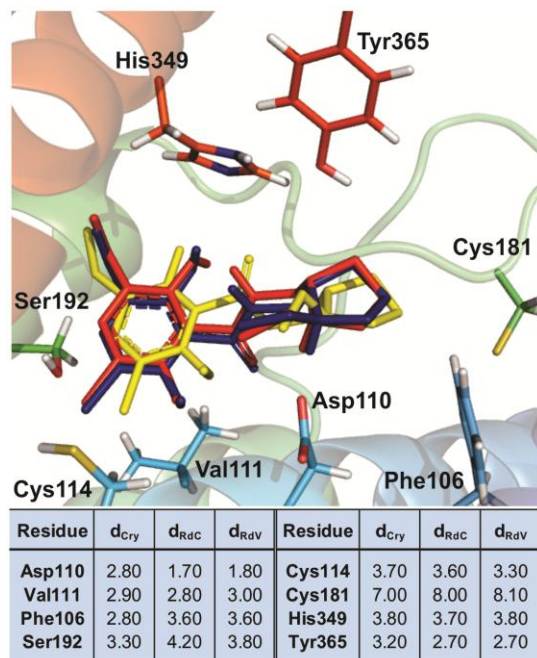


Figure S1. Redocking of eticlopride in the binding pocket of D3R to tune the docking machinery using the crystallographic ligand conformation – see ref. (39) in the paper. Eticlopride at crystallographic coordinates is represented in yellow (d_{Cry}); redocking using crystallographic conformation is represented in red (d_{RdC}); and redocking using ligand optimization in vacuum is represented in blue (d_{RdV}). The distances between poses and some residues at the binding pocket are described are given in Å in the Table. The results were obtained using the software Autodock 4.0.

As inputs to tune the docking machinery, we tested eticlopride in two distinct conformations: the crystallographic conformation (RdC), and an in vacuum energy minimized structure (RdV). As depicted in figure S1, the resulting poses of both RdC and RdV were similar to the crystallographic coordinates, with RMSD values of 1.2113 and 1.2425 Å², respectively. As the RMSD difference between these two approaches was just about 0.03 Å², we were convinced that the achieved parameterization with Autodock 4.0 was adequate to ground the docking of haloperidol after the optimization of the structure in vacuum through DFT methods.

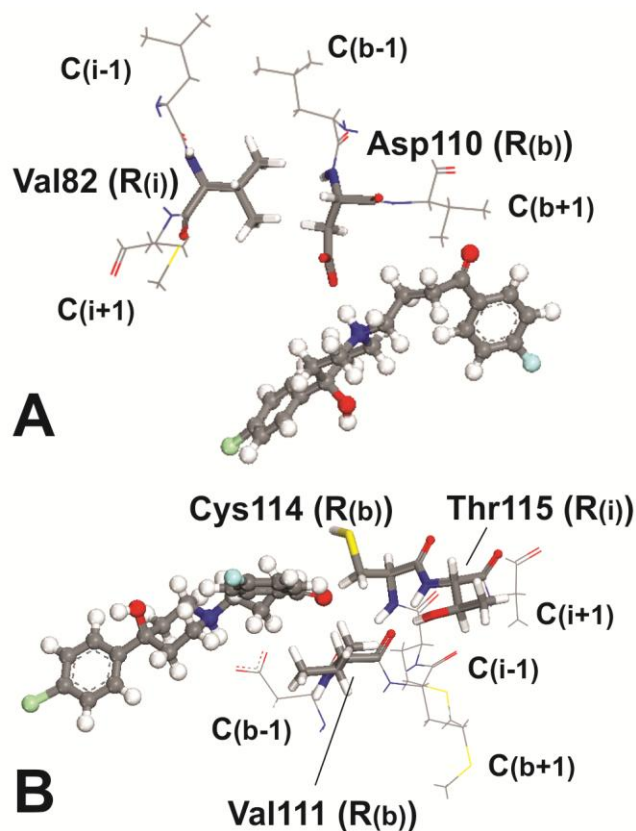


Figure S2. Description of a shielding effect calculation within the MFCC approach for haloperidol in D3R: (A) Shielding effect of Asp110 in respect to the interaction of Val82 with haloperidol. (B) Shielding effect of residues Cys114 and Val111 in respect to the interaction of Thr115 with haloperidol. Note that the shielding residues do not necessarily need to be placed directly between the drug and the residue of interest. The Haloperidol, the amino acid residue of interest, the shielding residues and caps are represented as M, R_i, R_b and C_{i,b}, respectively.

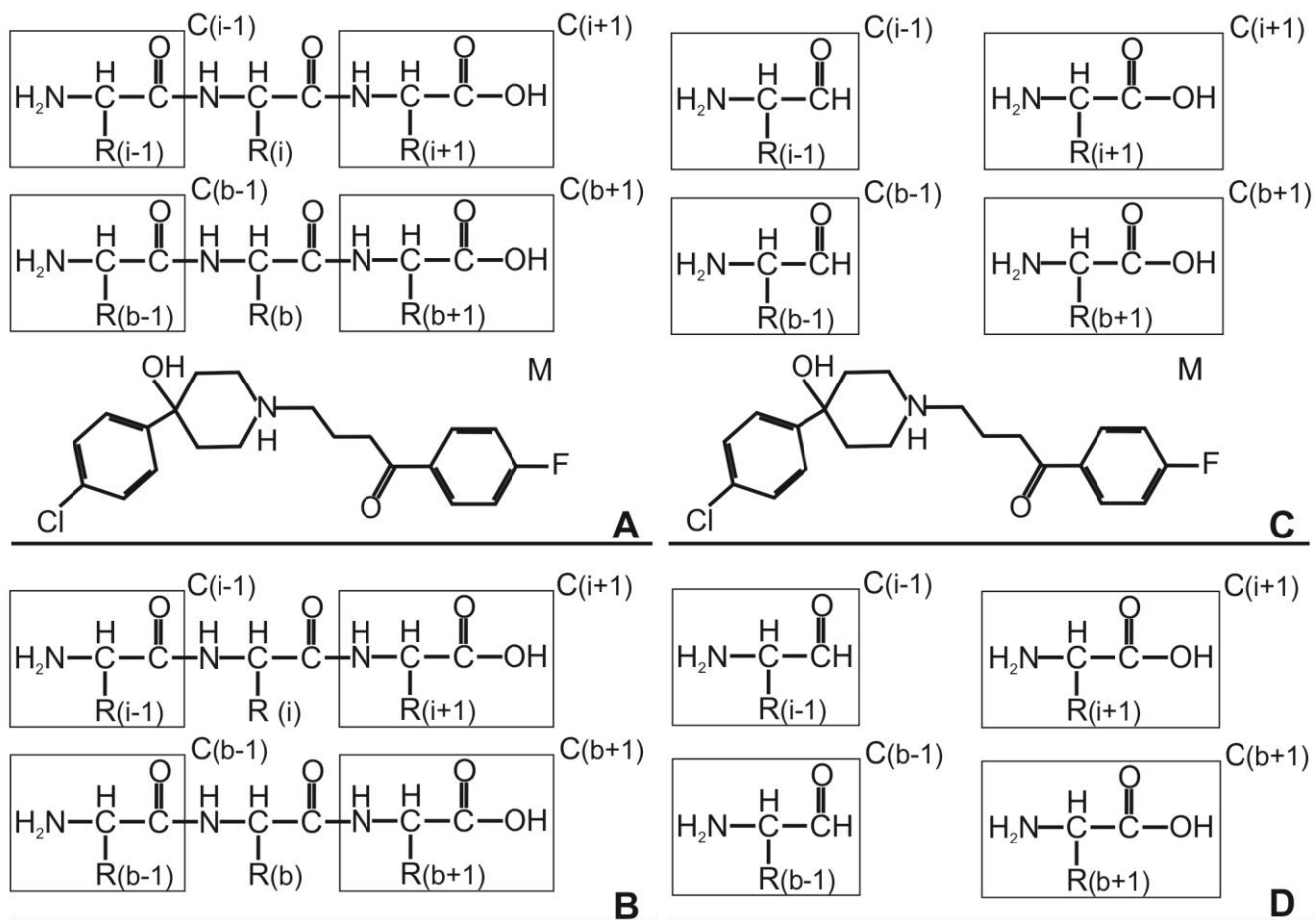


Figure S3. MFCC scheme with shielding effect: (A) haloperidol, residue of interest and shielding residue with conjugated caps; (B) residue of interest and shielding residue with conjugated caps; (C) haloperidol plus conjugated caps; (D) conjugated caps only. Haloperidol, amino acid residue of interest, shielding residues and caps are represented as M , R_i , R_b and $C_{i,b}$, respectively.

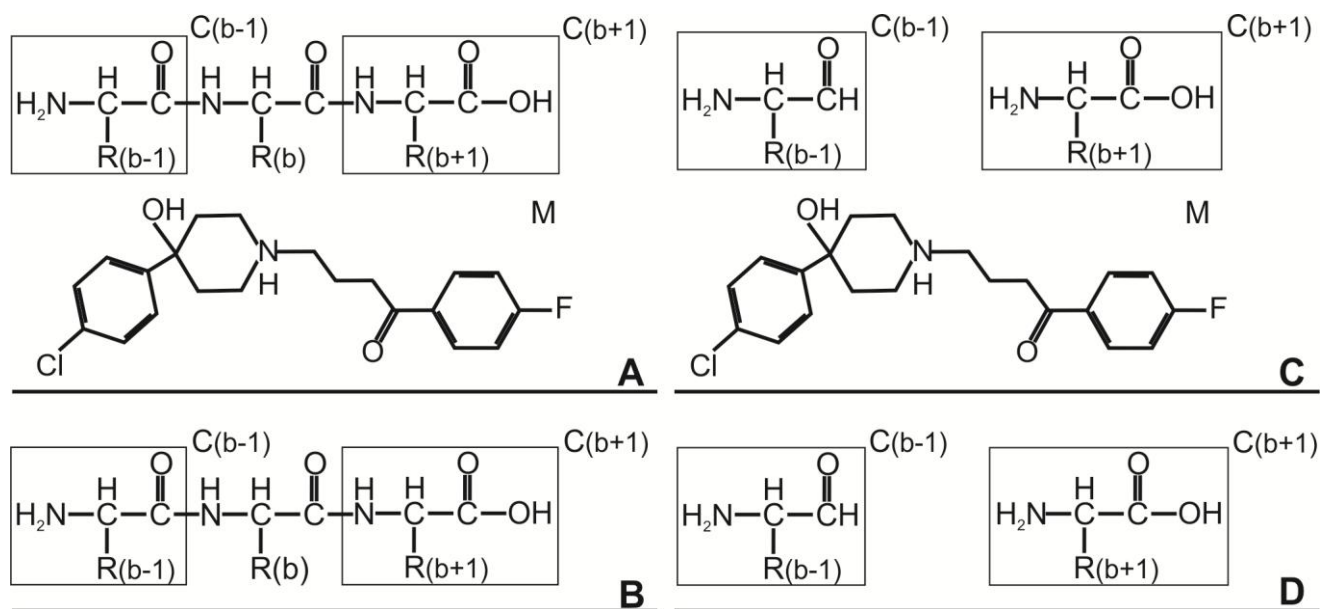


Figure S4. MFCC scheme considering only shielding residues: (A) haloperidol plus shielding amino acid residue with conjugated caps; (B) shielding residue with conjugated caps; (C) haloperidol plus conjugated caps; (D) conjugated caps only. Haloperidol, shielding residues and caps are represented as M, R_i , R_b and $C_{i,b}$, respectively.

Table S1. Description of the thirteen clusters scored better than the threshold of -10 kcal/mol. Binding energy is represented in kcal/mol, k_i in nM. Poses with similar geometry after the classical optimization (Forcite) is shaded in the same color.

Cluster	Number of poses	Binding Energy (Autodock)	Ki values (Autodock)	Binding Energy (Forcite)
1	97	-10.49	20.62	-101.80
2	40	-10.47	21.19	-76.42
3	121	-10.40	23.98	-74.59
4	97	-10.37	24.88	-78.87
5	9	-10.35	25.88	-90.68
6	21	-10.21	32.57	-77.27
7	38	-10.20	33.19	-76.73
8	16	-10.16	35.85	-95.43
9	3	-10.09	40.06	-95.43
10	3	-10.08	40.99	-99.71
11	15	-10.08	40.59	-95.93
12	25	-10.05	42.86	-76.68
13	63	-10.05	43.16	-76.92

Table S2. D3R residues interacting with haloperidol for increasing values of the binding pocket radius. Radius distances of each residue from docking pose (1), classical optimization of docking pose (2), and QM/MM optimization of docking pose (3) are shown.

		r(Å)													
		2.5	3.0	3.5	4.0		4.5								
1	F345	-	-	-	D110	I183	H349	-	-	-	-	-	-		
2	-	F345	D110	-	-	-	I183	H349	T369	-	-	-	-		
3	-	-	F345	I183	D110	-	T369	-	-	-	-	-	-		
		5.0			6.0		6.5		7.0						
1	V111	W342	Y365	T369	Y373	-	-	C114	S182	F346	-	-	-		
2	W342	Y365	-	-	-	-	S182	F106	C114	-	-	-	-		
3	W342	H349	Y365	-	F106	S182	V86	-	-	-	-	-	-		
		7.5				8.0									
1	V82	F106	L168	V189	V86	F188	G372	-	-	-	-	-	-		
2	V82	V86	V189	F346	L168	-	-	-	-	-	-	-	-		
3	V82	C114	F346	-	L168	C181	F188	V189	-	-	-	-	-		
		8.5				9.0									
1	S192	T368	-	-	T108	L109	M112	C181	S184	S196	-	-	-		
2	C181	F188	T368	G372	L89	T108	L109	M112	S184	S192	-	-	-		
3	G372	-	-	-	L89	T108	M112	S184	S192	T353	T368	W370	-		
		9.5													
1	V78	L89	M113	T115	S193	T348	V350	T353	W370	-	-	-	-		
2	V78	S196	T353	S366	W370	-	-	-	-	-	-	-	-		
3	V78	L109	T348	V350	S366	-	-	-	-	-	-	-	-		
		10.0													
1	S165	N185	F197	N352	S366	-	-	-	-	-	-	-	-		
2	Y36	M83	M113	T115	N173	S193	T348	V350	N352	-	-	-	-		
3	Y36	M113	T115	N173	N185	S196	N352	-	-	-	-	-	-		

Table S3. Atomic Hirshfeld charges of haloperidol non-hydrogen atoms.

Atom	<i>Vacumm</i>	Docking	Classical optimization	QM/MM optimization
C11	-0.001	0.002	-0.004	0.004
C2	0.03	0.033	0.034	0.031
C3	-0.036	-0.039	-0.038	-0.039
C4	-0.041	-0.041	-0.042	-0.041
C5	-0.038	-0.037	-0.037	-0.038
C6	-0.042	-0.036	-0.037	-0.038
C7	-0.012	-0.013	-0.010	-0.014
C8	0.086	0.081	0.087	0.085
O9(H)	-0.193	-0.205	-0.204	-0.190
C10	-0.054	-0.064	-0.058	-0.060
C11	0.013	0.007	0.013	0.008
C12	-0.06	-0.056	-0.054	-0.057
C13	0.011	0.009	0.013	0.010
N14(H)	0.075	0.086	0.083	0.080
C15	0.014	0.011	0.009	0.011
C16	-0.053	-0.047	-0.049	-0.045
C17	-0.056	-0.056	-0.051	-0.053
C18	0.139	0.147	0.142	0.143
O19	-0.224	-0.217	-0.209	-0.209
C20	-0.021	-0.012	-0.015	-0.020
C21	-0.013	-0.017	-0.047	-0.045
C22	-0.037	-0.037	-0.054	-0.054
C23	-0.03	-0.044	-0.012	-0.013
C24	-0.044	-0.050	-0.033	-0.036
C25	0.108	0.102	0.104	0.101
F26	-0.069	-0.075	-0.069	-0.064

Table S4. Bond lengths (in Å) of non-hydrogen atoms in haloperidol.

Bond	<i>Vacumm</i>	Docking	Classical	QM/MM
C1 – C2	1.737	1.736	1.760	1.729
C2 - C3	1.397	1.397	1.387	1.392
C3 - C4	1.390	1.390	1.396	1.386
C4 – C7	1.399	1.399	1.412	1.401
C2 – C5	1.394	1.395	1.391	1.388
C5 – C6	1.394	1.394	1.399	1.393
C6 – C7	1.396	1.397	1.418	1.394
C7 – C8	1.514	1.514	1.572	1.519
C8 – O9(H)	1.436	1.437	1.413	1.427
C8 – C12	1.541	1.540	1.552	1.533
C12 – C13	1.511	1.512	1.554	1.518
C13 – N14(H)	1.504	1.504	1.511	1.500
C8 – C10	1.534	1.533	1.552	1.534
C10 – C11	1.513	1.513	1.554	1.522
C11 – N14(H)	1.507	1.507	1.503	1.502
N14(H) – C15	1.504	1.504	1.494	1.490
C15 – C16	1.510	1.509	1.540	1.526
C16 – C17	1.518	1.518	1.522	1.544
C17 – C18	1.529	1.529	1.543	1.516
C18 – O21	1.233	1.233	1.236	1.207
C18 – C20	1.473	1.473	1.531	1.505
C20 – C21	1.404	1.404	1.408	1.396
C21 – C22	1.390	1.390	1.395	1.388
C22 – C25	1.391	1.391	1.385	1.381
C20 – C23	1.405	1.405	1.404	1.397
C23 – C24	1.388	1.388	1.403	1.387
C24 – C25	1.393	1.394	1.390	1.386
C25 – F26	1.354	1.353	1.357	1.335

Table S5. All the sequence aligned residues of D3R and D2R in the eticlopride binding pocket (*J*). Representation of the 43 residues analyzed through quantum method. The identical residues are shaded in blue, and the non-conserved positions are shaded in red.

Receptor segment	Residue D3R	Residue D2R
TMH1	Tyr36	Leu41
	Val78	Val84
TMH2	Val82	Val87
	Met83	Met88
	Val86	Val91
	Leu89	Leu94
TMH3	Phe106	Phe110
	Val107	Val111
	Thr108	Thr112
	Leu109	Leu113
	Asp110	Asp114
	Val111	Val115
	Met112	Met116
	Met113	Met117
TMH4	Cys114	Cys118
	Thr115	Thr119
TMH4	Leu168	Leu170
	Asn173	Asn175
ECL2	Cys181	Cys182
	Ser182	Ile183
	Ile183	Ile184
	Ser184	Ala185
TMH5	Asn185	Asn186
	Phe188	Phe189
	Val189	Val190
	Ser192	Ser193
	Ser193	Ser194
TMH6	Ser196	Ser197
	Trp342	Trp357
	Phe345	Phe360
	Phe346	Phe361
	Thr348	Thr363
	His349	His364
	Val350	Ile365
Asn352	Asn367	
TMH7	Thr353	Ile368
	Tyr365	Tyr379
	Ser366	Ser380
	Thr368	Phe382
	Thr369	Thr383
TMH7	Trp370	Trp384
	Gly372	Gly386
	Tyr373	Tyr387

CAPTIONS

Figure S1. Redocking of eticlopride in the binding pocket of D3R to tune the docking machinery using the crystallographic ligand conformation. Eticlopride at crystallographic coordinates is represented in yellow (dCry); redocking using crystallographic conformation is represented in red (dRdC); and redocking using ligand optimization in vacuum is represented in blue (dRdV). The distances between poses and some residues at the binding pocket are described in given in Å. The results were obtained using the software Autodock 4.0.

Figure S2. Description of a shielding effect calculation within the MFCC approach for haloperidol in D3R: (A) Shielding effect of Asp110 on the interaction of Val82 with haloperidol. (B) Shielding effect of residues Cys114 and Val111 on the interaction of Thr115 with haloperidol. Note that shielding residues do not necessarily need to be placed directly between the drug and the residue of interest. Haloperidol, amino acid residue of interest, shielding residues and caps are represented as M, R_i, R_b and C_{i,b}, respectively.

Figure S3. MFCC scheme with shielding effect: (A) haloperidol, residue of interest and shielding residue with conjugated caps; (B) residue of interest and shielding residue with conjugated caps; (C) haloperidol plus conjugated caps; (D) conjugated caps only. Haloperidol, amino acid residue of interest, shielding residues and caps are represented as M, R_i, R_b and C_{i,b}, respectively.

Figure S4. MFCC scheme considering only shielding residues: (A) haloperidol plus shielding amino acid residue with conjugated caps; (B) shielding residue with conjugated caps; (C) haloperidol plus conjugated caps; (D) conjugated caps only. Haloperidol, shielding residues and caps are represented as M, R_i, R_b and C_{i,b}, respectively.

Table S1. Description of the thirteen clusters scored better than the threshold of -10 kcal/mol. Binding energy is represented in kcal/mol, *ki* in nM. Poses with similar geometry after the classical optimization (Forcite) is shaded in the same color.

Table S2. D3R residues interacting with haloperidol for increasing values of the binding pocket radius. Radius distances of each residue from docking pose (1), classical optimization of docking pose (2), and QM/MM optimization of docking pose (3) are shown.

Table S3. Atomic Hirshfeld charges of haloperidol non-hydrogen atoms.

Table S4. Bond distances (in Å) of the non-hydrogen atoms of haloperidol.

Table S5. Representation of the sequence alignment of D3R and D2R. Representation of the 43 residues analyzed through quantum method. Position of identical residues are shaded in blue, and the non-conserved positions are in red.

Reference

1. Chien, E. Y. T., Liu, W., Zhao, Q., Katritch, V., Won Han, G., Hanson, M. A., Shi, L., Newman, A. H., Javitch, J. A., Cherezov, V., and Stevens, R. C. (2010) Structure of the Human Dopamine D3 Receptor in Complex with a D2/D3 Selective Antagonist, *Science* 330, 1091-1095.

PARTE III

4. Discussão

No presente trabalho foram utilizadas ferramentas computacionais de cálculo clássico e quântico para elucidar o mecanismo de interação de três importantes antipsicóticos - eticloprida, haloperidol e risperidona - e o sítio de ligação do receptor humano de dopamina D3. Durante as simulações foram utilizados os dados cristalográficos publicados por Chien e colaboradores em 2010, onde a estrutura tridimensional contendo o antipsicótico eticloprida ligado ao receptor humano de dopamina D3 foi elucidada (PDBID: 3PBL) (CHIEN, E. Y. T. *et al.*, 2010). O princípio da acurácia deste trabalho baseou-se na utilização de cálculos quânticos em dados cristalográficos, o que nos limitou a avaliarmos o perfil de ligação dos antipsicóticos somente no receptor D3, por ser o único cuja estrutura tridimensional foi elucidada por cristalografia até o momento. Os resultados obtidos referente a ligação de antipsicóticos no receptor D3 são de extrema importância devido aos fortes indícios de participação desse receptor como alvo terapêutico no tratamento da esquizofrenia (SOKOLOFF *et al.*, 1990; JOYCE, 2001; PARK *et al.*, 2003) e envolvimento na discinesia tardia (MAHMOUDI *et al.*, 2014).

Nas etapas iniciais de preparação das estruturas analisadas, devido ao fato da técnica de difração de raios X não elucidar as posições dos átomos de hidrogênio, fez-se necessário a inclusão e ajuste da posição desses através de métodos computacionais clássicos - devido ao tamanho da estrutura. A inclusão de átomos de hidrogênio respeitou a análise do perfil de protonação da proteína e dos antipsicóticos estudados, garantindo o máximo de semelhança entre os nossos modelos e a realidade. Para a análise do perfil de ligação dos antipsicóticos no receptor D3, foi utilizada a técnica de

Fracionamento Molecular com *Caps* Conjugados (MFCC, do inglês “Molecular Fractionation with Conjugate Caps”) (GAO *et al.*, 2004), a qual permitiu o cálculo individualizado da energia de interação de cada aminoácido presente no sítio de ligação através de cálculos quânticos, utilizando-se a Teoria do Funcional da Densidade (DFT) (HOHENBERG e KOHN, 1964; KOHN e SHAM, 1965). Desta forma, a energia total de ligação foi obtida através da soma algébrica das contribuições individuais de cada resíduo de aminoácido envolvido na ligação. Para evitarmos a escolha arbitrária e errônea de um número limitado de resíduos de aminoácidos a serem incluídos nos cálculos quânticos decidimos conduzir a análise considerando a variação da energia total de ligação em função da distância entre cada resíduo e o antipsicótico estudado, conforme descrito em trabalhos prévios do nosso grupo (BARROSO-NETO *et al.*, 2012; DA COSTA *et al.*, 2012). Desta forma, foi definido o centro geométrico de cada antipsicótico como ponto de referência espacial e a variação da energia de ligação foi analisada através da soma da energia de interação individual de todos os aminoácidos posicionados a cada meio angstrom de distância (radial) deste ponto. Tal técnica nos permitiu traçar o perfil de variação de energia em função da variação do raio de análise e foi capaz de indicar o ponto de estabilidade da interação entre cada antipsicótico e o receptor D3, ou seja, a distância de análise a partir da qual a inclusão da contribuição individual de outros resíduos mais distantes não afetaria de forma significativa a ligação do antipsicóticos no receptor D3. Após a definição da região de estudo, a análise comparativa da energia de interação individual calculada de cada resíduo de aminoácido permitiu o estabelecimento do perfil de contribuição relativa entre os resíduos envolvidos com a ligação de cada antipsicótico estudado. Para fins de comparação, durante a realização dos cálculos DFT, foram utilizados os funcionais de Aproximação da Densidade Local (LDA, sigla em inglês para “Local-Density Approximation”) com

correção de dispersão de Ortmann, Bechstedt, e Schmidt (OBS) (PERDEW e WANG, 1992; ORTMANN *et al.*, 2006) e de Aproximação do Gradiente Generalizado (GGA, do inglês “Generalized Gradient Approximation”) com correção de dispersão de Tkatchenko e Scheffler (TS) (PERDEW *et al.*, 1996; TKATCHENKO e SCHEFFLER, 2009). Ambas as aproximações apresentam grande confiabilidade nos resultados, sendo que a principal diferença entre eles está no fato de que cálculos utilizando LDA-OBS costumam superestimar interações de longa distância, enquanto que cálculos com GGA-TS permitem a melhor descrição das interações de Van der Waals e ligações de hidrogênio (RECKIEN *et al.*, 2012).

Na primeira etapa do trabalho (Capítulo 1), empregou-se os dados cristalográficos da eticloprida ligada no receptor D3 e o perfil de ligação foi calculado através da inclusão dos 42 resíduos de aminoácido posicionados dentro do raio de 10 Å. A energia de interação individual entre cada resíduo de aminoácido e a eticloprida foi calculada, de forma a obter-se um parâmetro de classificação dos resíduos mais importantes para a estabilização da ligação. A análise do perfil de interação entre a eticloprida e o receptor D3 demonstrou a estabilidade da ligação quando os 19 resíduos posicionados até o raio de 8.0 Å foram incluídos no cálculo, apresentando uma energia total de ligação de -171.48 (-259.21) kcal/mol, usando GGA-TS (LDA-OBS). Quanto todos os resíduos em 10 Å foram analisados, observou-se pequena variação na energia total de ligação, estabilizando em -182,24 (-266.57) kcal/mol, usando o funcional GGA-TS (LDA-OBS). Dentre os resíduos que apresentaram maior contribuição para a estabilização da ligação estão: Asp110, Phe345, Phe346, Ile183, Val107, Tyr373, Val189, Ser192, Trp342, Tyr365, Cys114 e Val82. Dentre estes, o Asp110 demonstrou uma interação atrativa grande, correspondendo a cerca de 61% da energia total de ligação. Conforme os cálculos de protonação realizados, o resíduo Asp110 apresenta o

grupamento carboxila desprotonado (COO^-), enquanto que a eticloprida apresenta sua amina terciária na forma protonada em pH fisiológico. Desta forma, o Asp110 interage atrativamente, através de uma ponte salina de alta energia (-112,21 kcal/mol, utilizando-se GGA-TS), com a amina terciária da eticloprida localizada a 2,8Å de distância. Esta interação tem sido apontada como estruturalmente relevante para a eficácia da ligação de moléculas contendo o grupamento amina em receptores de dopamina (CHIEN, E. Y. T. *et al.*, 2010; TSCHAMMER, N. *et al.*, 2011). Juntos, os resíduos Phe345, Phe346, Phe188, Val189, Ser192, Ser193, Val111 e Ile183 formam uma cavidade hidrofóbica no receptor D3, a qual interage atrativamente com o anel aromático substituído (figura 5a, região iii) da risperidona através de -50,53 kcal/mol (GGA-TS), o que representa cerca de 28% da energia total de ligação.

Vale salientar que, enquanto a inspeção visual dos dados cristalográficos D3-eticloprida permite somente inferirmos o grau de importância dos resíduos devido a sua proximidade com a eticloprida, nos levando a interpretar o sítio de ligação como sendo formado apenas pelos resíduos de contato com a eticloprida (CHIEN, E. Y. T. *et al.*, 2010), em nosso estudo a definição dos resíduos importantes para o sítio de ligação foi definida pela análise tanto dos resíduos de contato, quanto daqueles mais distantes da eticloprida. Desta forma, dentre os resíduos incluídos em nossos cálculos, Val107, Ser182, Phe188, Val82 e Asn185 foram pela primeira vez relacionados diretamente com o mecanismo de ligação da eticloprida no receptor D3. Para termos uma ideia da dimensão deste achado, apesar de ignorado por Chien e colaboradores (2010) durante a publicação da análise dos dados cristalográficos (CHIEN, E. Y. T. *et al.*, 2010), o resíduo Val107 (-4,08 kcal/mol) localiza-se próximo ao anel pirrolidina e apresenta energia de interação atrativa semelhante aos resíduos de contato Phe106 (-3,13 kcal/mol), Thr369 (-1,68 kcal/mol), Trp342 (-5,53 kcal/mol), Tyr365 (-5,72 kcal/mol),

Tyr373 (-5,94 kcal/mol) e superior a do resíduo Val86 (0,27 kcal/mol). O mesmo ocorre para o resíduo Ser182 (3,40 kcal/mol) que repele a porção pirrolidina (Figura 5a, região i) para o interior da cavidade do receptor, enquanto que o resíduo vizinho Ile183 (-7,57 kcal/mol), localizado em uma porção mais profunda da cavidade, atrai as demais regiões da eticloprida. Comparativamente, Ser182 apresenta energia de repulsão muito superior ao resíduo Val86 (0,27 kcal/mol), o qual também está localizado na abertura da cavidade do receptor de forma que ambos repelem colaborativamente a eticloprida para o interior do sítio de ligação. O resíduo Val82 (5,39 kcal/mol) está localizado em uma porção mais interna que Val86 e aparenta ter a mesma função de repulsão da porção pirrolidina para dentro do sítio. Conforme citado anteriormente, o resíduo Phe188 (-4.78 kcal/mol) compõe a região hidrofóbica do sítio de ligação, e sua contribuição energética consiste em cerca de 9,5% da energia de atração total desta região. Já o resíduo Asn185 (-4,43 kcal/mol) localiza-se na porção externa do receptor, próxima da porção mais profunda da cavidade do sítio. Sua contribuição atrativa sugere seu papel no reforço da atração da eticloprida em direção à porção hidrofóbica do sítio de ligação. Na figura 7 está representado a densidade eletrônica da abertura do sítio de ligação do receptor D3, onde alguns dos resíduos mais significativos para a estabilidade da ligação, bem como os resíduos Val82, Val107, Ser182 e Phe188 estão representados. Na figura 7A é exibida a densidade eletrônica calculada sem a presença da eticloprida no sítio de ligação, a qual foi inserida posteriormente na imagem para facilitar a visualização das interações. Ao lado, na figura 7B, pode-se observar a densidade eletrônica do sítio quando da interação de seus resíduos se dá com a eticloprida, destacando o papel desses resíduos na condução e manutenção da eticloprida no interior da cavidade do sítio de ligação.

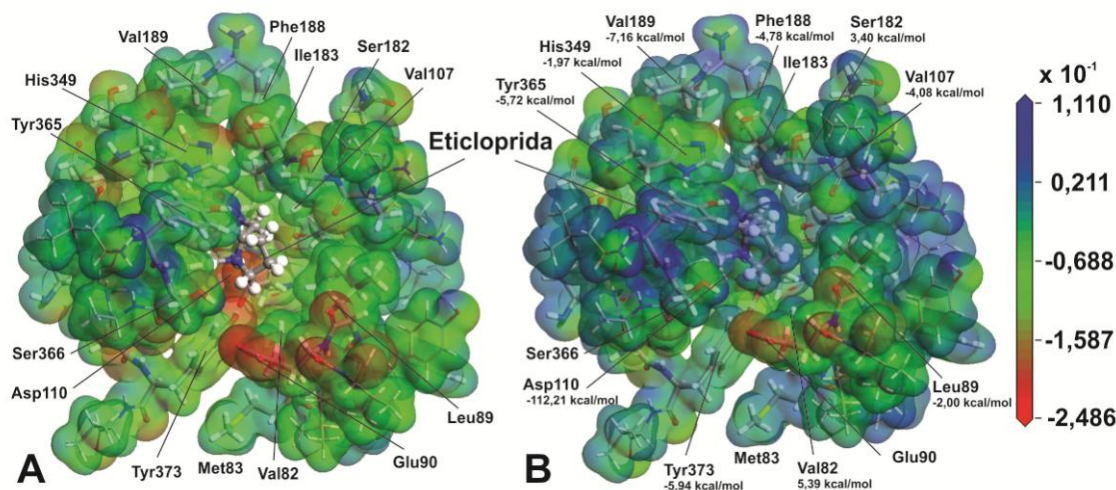


Figura 7: Superfície de potencial eletrostático do receptor D3. (A) Representação da densidade eletrônica dos resíduos de aminoácidos localizados na abertura da cavidade do sítio de ligação. Os cálculos foram realizados sem a presença do antipsicótico eticloprida, o qual foi posteriormente inserido para auxiliar a visualização das regiões de interação do sítio de ligação. (B) Representação da densidade eletrônica calculada na presença da eticloprida no sítio de ligação, conforme dados estruturais (PDBID: 3PBL). A superfície do receptor foi colorida conforme a densidade de elétrons no sistema, sendo que as regiões em vermelho (azul) representam áreas de maior (menor) densidade eletrônica. As energias de interação individual de alguns resíduos são exibidas em kcal/mol e foram calculadas utilizando-se a DFT com o funcional GGA-TS.

Conforme descrito acima, pode-se dizer que os resultados obtidos neste trabalho, além de contribuírem para a elucidação da real importância de vários resíduos de aminoácidos envolvidos na ligação da eticloprida no receptor D3, também demonstraram a relevância do uso de métodos quânticos para a descrição da interação entre receptores e ligantes.

Na segunda etapa deste trabalho (Capítulo 2), a interação do antipsicótico típico haloperidol com o receptor de dopamina D3 foi analisada. O haloperidol liga-se fortemente ao receptor de forma a reduzir o acesso a dopamina, e permanecendo ligado por um longo período. Devido a esta característica, o haloperidol facilmente ultrapassa o limiar de segurança de 80% de ocupação dos receptores, bloqueando assim a sinalização na via nigroestriatal e desencadeando eventos do tipo SEP (SEEMAN, 2002). Contudo, por seu perfil de ação prolongada, efetividade e baixo custo, o haloperidol permanece

em uso na clínica, e pesquisas buscando a compreensão do seu mecanismo de ligação justificam-se pela necessidade de desenvolvimento de novos agentes com reduzidos efeitos adversos. Nesse trabalho, por não haver dados cristalográficos do haloperidol ligado ao receptor de dopamina D3, foi utilizada a técnica de ancoramento molecular para elucidar a orientação e geometria assumidas pelo haloperidol no sítio de ligação. Uma vez que os algoritmos de ancoramento molecular normalmente apresentam problema de repetibilidade⁶ (um erro típico de $\pm 2,0$ kcal/mol), a execução do procedimento repetidas vezes permite a obtenção de um número grande de estruturas, garantindo a amostragem adequada dos possíveis resultados (COSCONATI *et al.*, 2010). Desta forma o procedimento de ancoramento foi repetido 20 vezes, de forma a obter-se 1000 resultados, os quais foram agrupados conforme critérios de semelhança geométrica e energia de ligação. Dentre os grupos, aqueles que possuíam energia de ligação mais forte ou maior número de estruturas, foram escolhidos para a análise e, dentre estes, uma estrutura representativa (a estrutura de menor energia de ligação) em cada um dos grupos selecionados foi escolhida. Estas estruturas passaram por etapas de ajuste conformacional, através de técnicas clássicas de minimização energética, seguido por nova avaliação da energia total de ligação. Por fim, a estrutura que apresentou o melhor valor de energia de ligação foi submetida a três diferentes métodos de refinamento estrutural, envolvendo o emprego de abordagem clássica e quântica. No primeiro método, somente os átomos de hidrogênio de toda a estrutura tiveram suas posições refinadas por cálculos clássicos; no segundo método, o haloperidol, todos resíduos até 10 Å e todos os hidrogênios do sistema tiveram sua geometria refinada classicamente; e, no terceiro método foi empregado o esquema QM/MM, onde o haloperidol foi refinado quanticamente e os hidrogênios do sistema e todos resíduos até

⁶ Repetibilidade refere-se a confirmação de um resultado a partir da repetição do experimento, nas mesmas condições e com o mesmo equipamento, pelo mesmo pesquisador.

10 Å foram refinados classicamente. O método híbrido QM/MM conhecido como ONIOM (do inglês, *Own N-layered Integrated Molecular Orbital and Molecular Mechanics*) foi empregado para melhor lidarmos com o tamanho do sistema durante a aplicação do terceiro protocolo de refinamento e ao mesmo tempo garantirmos a acurácia dos resultados através do uso de métodos quânticos. Através desse método, o sistema pode ser subdividido em um número infinito de camadas e diferentes níveis de teoria podem ser aplicados individualmente a cada camada (VREVEN *et al.*, 2003; CHUNG *et al.*, 2012). No caso do sistema estudado, foram utilizadas duas camadas: a primeira contendo toda a proteína, a qual foi tratada classicamente (TAO *et al.*, 2009), e a segunda contendo somente o antipsicótico e tratada quanticamente (ZHAO e TRUHLAR, 2008). Devido ao alto custo computacional deste método e as implicações referentes à distribuição eletrônica na interface das camadas quando ligações covalentes estão presentes, decidimos tratar somente o antipsicótico por método quântico e não todo o sítio de ligação. Da mesma forma, para reduzirmos custos computacionais e tornarmos o procedimento viável, somente os resíduos de aminoácidos contidos no raio de 10 Å tiveram a sua geometria ajustada. Após o refinamento, a energia individual de ligação foi calculada através do método de MFCC, seguido de cálculos quânticos no nível de teoria DFT. O cálculo da energia de ligação das estruturas resultantes dos diferentes protocolos de refinamento (clássico ou quântico) evidenciou a superioridade do método QM/MM, resultando em energia total de ligação de -137,60 kcal/mol (GGA-TS) para a estrutura refinada pelo primeiro método; -156,30 kcal/mol (GGA-TS) para a estrutura resultante do refinamento pelo segundo método; e, energia de ligação de -170,10 kcal/mol (GGA-TS) para a estrutura refinada pelo terceiro método (veja a comparação entre os métodos na figura 4 do Capítulo 2). O esquema ilustrativo do protocolo utilizado desde a ancoragem molecular até o refinamento e cálculo quântico

está representado no esquema da figura 8. Dentre os 43 resíduos analisados, 23 apresentaram maior contribuição para a ligação do haloperidol, sendo eles: Val82, Met83, Val86, Leu89, Val107, Asp110, Val111, Cys114, Cys181, Ser182, Ile183, Asn185, Phe188, Val189, Ser192, Ser193, Trp342, Phe345, Phe346, His349, Tyr365, Thr369 e Tyr373. A energia total de ligação calculada foi de -170,10 (-269,50) utilizando-se GGA-TS (LDA-OBS). Novamente, observamos que o resíduo Asp110 possui papel fundamental na ancoragem de ligantes no sítio do receptor D3, interagindo com o haloperidol através de -107,00 (-117,20) kcal/mol, equivalendo a cerca de 63% (43%) da energia total de interação, calculando-se através do funcional GGA-TS (LDA-OBS). A conformação adotada pelo haloperidol no sítio de ligação (veja a figura 2 no Artigo 2) posiciona o fragmento clorofenil em direção à hélice 2 e o fragmento fluorofenil em direção à hélice 5, favorecendo a interação do átomo de flúor com os resíduos Asn185 (-3,00 kcal/mol, utilizando-se GGA-TS) e Val189 (-4 kcal/mol, GGA-TS), e permitindo a interação da porção clorofenil com Cys181 (-6,10 kcal/mol, GGA-TS) e Tyr365 (-15,00 kcal/mol, GGA-TS). A alça extracelular 2 mostrou relevante papel na estabilização da ligação, principalmente através da interação atrativa dos resíduos Ile183 (-9,70 kcal/mol, GGA-TS) e o acima citado Cys181, enquanto que o resíduo Ser182 interage repulsivamente (2,90 kcal/mol, GGA-TS) com a porção clorofenil, direcionando o haloperidol para o interior do sítio.

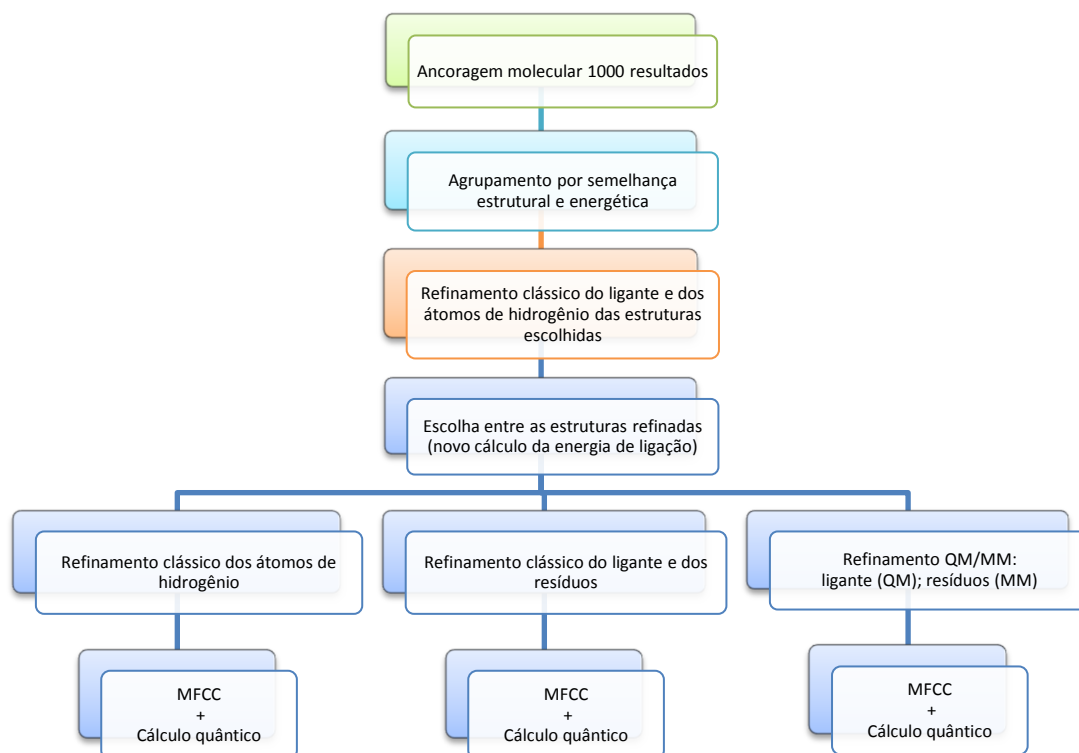


Figura 8: Fluxograma mostrando as etapas preparação e refinamento da estrutura tridimensional contendo o antipsicótico ligado ao receptor de dopamina D3.

A orientação e geometria assumidos pelo haloperidol em nosso estudo corroboram com a descrição de Sikazwe e colaboradores (2004), que evidenciaram a importância da orientação axial do grupamento hidroxila do haloperidol para a ligação no receptor de dopamina (SIKAZWE *et al.*, 2004). Os cálculos da energia de interação do grupamento hidroxila com os resíduos na sua vizinhança demonstraram que há uma interação de -16,00 kcal/mol (GGA-TS) com Tyr365 e de -2,90 kcal/mol (GGA-TS) com o resíduo Thr369. Quando analisado o perfil de interação individual com cada hélice e alça, observou-se o seguinte perfil: TM3 > TM7 > TM6 > ECL2 > TM5 >> TM2. Esses dados indicam que o forte bloqueio do receptor D3 provavelmente envolve a imobilização da hélices 3, 7 e 6, além de ECL2 através da interação total atrativa com o haloperidol. Na hélice TM3, o resíduo que mais contribui para a interação atrativa foi o Asp110, interagindo através de -107,00 kcal/mol (GGA-TS); na hélice TM7 o resíduo

que mais contribui é o Tyr365, com energia atrativa de -16,00 kcal/mol; na hélice TM6 as maiores contribuições vem de Phe345 e Phe346, com energias atrativas de -11,00 e -8,30 kcal/mol, respectivamente; enquanto que, a inspeção da ECL2 demonstra que os principais resíduos atrativos são Ile183 e Cys181, com energias de -9,70 e -6,10 kcal/mol, respectivamente. Foi observado a formação de interações do tipo pi-cátion entre Phe345 e nitrogênio do fragmento 4-hidroxipiperidinil do haloperidol, e do tipo pi-sigma entre His349 e o átomo de carbono (C22)H do fragmento fluorofenil. Na figura 9, vemos representada a distribuição de cargas na abertura da cavidade do sítio de ligação. Antipsicóticos de estrutura mais longa, como o haloperidol, ao ligarem-se no receptor D3 interagem tanto com a porção interna do sítio (região de ligação da eticloprida) quanto com uma porção mais externa, definida como sítio de ligação secundário (CHIEN, E. Y. T. *et al.*, 2010), o qual possui resíduos responsáveis por direcionar/estabilizar, através de interações atrativas e repulsivas, a ligação do haloperidol no receptor.

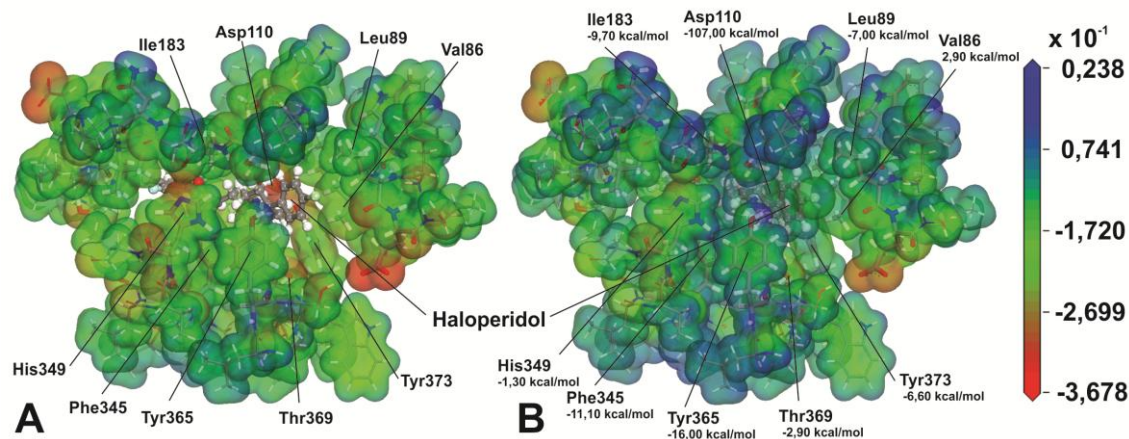


Figura 9: Superfície de potencial eletrostático do receptor D3. (A) Representação da densidade eletrônica dos resíduos de aminoácidos localizados na abertura da cavidade do sítio de ligação. Os cálculos foram realizados sem a presença do antipsicótico haloperidol, o qual foi posteriormente inserido para auxiliar a visualização das regiões de interação do sítio de ligação. (B) Representação da densidade eletrônica calculada na presença do haloperidol no sítio de ligação. A superfície do receptor foi colorida conforme a densidade de elétrons no sistema, sendo que as regiões em vermelho (azul) representam áreas de maior (menor) densidade eletrônica. As energias de interação individual de alguns resíduos são exibidas em kcal/mol e foram calculadas utilizando-se a DFT com o funcional GGA-TS.

Os dados gerados pelo cálculo da energia de interação do haloperidol com os resíduos de aminoácido do receptor D3 permitiram a determinação de possíveis regiões de modificação deste antipsicótico buscando um perfil de ligação diferenciado (veja Capítulo 2). Desta forma, o químico orgânico sintético poderá utilizar as informações aqui apresentadas para sugerir modificações estruturais, bem como testar o composto antes mesmo de sintetizá-lo, economizando tempo e recursos. Também, como veremos mais adiante, a determinação do perfil de ligação do antipsicótico haloperidol representa um importante passo para a compreensão das diferenças entre os mecanismos de ligação dos agentes típicos e atípicos.

Na terceira etapa (Capítulo 3), foi estudado o perfil de interação da risperidona com o receptor D3. A risperidona é um antipsicótico atípico utilizado no tratamento de sintomas positivos e negativos de pacientes com esquizofrenia e de crianças com sintomas de irritabilidade associada ao autismo (SHEA *et al.*, 2004; YAN, 2007; SHARMA e SHAW, 2012). Contudo, embora a administração da risperidona em substituição aos agentes típicos promova uma redução significativa do surgimento de SEP, estes efeitos adversos tem sido observados de maneira dose-dependente em cerca de 60-70% dos pacientes tomando 6 mg ou mais diariamente (CHOUINARD G *et al.*, 1998). Além do mais, apesar dos resultados promissores do uso da risperidona no tratamento de sintomas positivos e negativos da esquizofrenia e da irritabilidade associada ao autismo em crianças, alguns efeitos adversos importantes são relatados e comprometem de forma significativa a qualidade de vida dos pacientes, tais como: ganho de peso, sonolência e hiperglicemia (SCOTT e DHILLON, 2007; SHARMA e SHAW, 2012). Apesar de comportar-se como um agente atípico com reduzido risco de surgimento de SEP, quando administrado em doses moderadas, a risperidona é um antipsicótico com características intrigantes, pois apresenta afinidade a receptores de

dopamina semelhante aos agentes típicos (CHOUINARD G *et al.*, 1998; SEEMAN, 2002). Juntas, estas características motivam novas pesquisas buscando o entendimento dos mecanismos de ação desse agente, bem como o desenvolvimento de derivados com maior segurança de uso.

Para explicar o comportamento dos antipsicóticos atípicos chegou-se a propor que a rápida dissociação dos receptores dopaminérgicos deve-se à rápida elevação dos níveis de dopamina na fenda sináptica devido ao mecanismo desencadeado pelo bloqueio de receptores pré-sinápticos do tipo 5-HT_{2A} na via nigroestriatal (MELTZER *et al.*, 1989; MELTZER, 1999). Contudo, esta hipótese de mecanismo de atipicidade caiu por terra quando experimentos demonstraram que mesmo o bloqueio de receptores 5-HT_{2A} não é suficiente para evitar o surgimento de SEP quando os níveis de ocupação dos receptores de dopamina ultrapassam o limiar de 80% (SEEMAN e TALLERICO, 1999; SEEMAN, 2002). Admite-se que apesar da risperidona também ligar-se ao receptor 5-HT_{2A} e a outros receptores, a sua ação terapêutica deve-se ao bloqueio de receptores da subfamília D2. Ou seja, o que diferencia o mecanismo de ação dos antipsicóticos típicos/atípicos é o seu perfil de dissociação do receptor de dopamina, e não sua afinidade ou mesmo o perfil de bloqueio de outros receptores (SEEMAN, 2002). Desta forma, foi proposto que enquanto os antipsicóticos típicos ligam-se com maior afinidade no receptor de dopamina e nele permanecem por muito tempo, os antipsicóticos atípicos interagem mais fracamente com estes facilitando o restabelecimento da sinalização dopaminérgica através da rápida dissociação do receptor. Contudo, a separação entre agentes típicos e atípicos não é pontual, mas sim, varia gradualmente conforme o perfil dose-dependente de surgimento de SEP de cada antipsicótico. Dessa forma, antipsicóticos que se ligam muito fracamente ao receptor D2, como a clozapina, remoxiprida, quetiapina e melperona, irão apresentar um perfil

livre de SEP por se dissociarem rapidamente, enquanto que antipsicóticos atípicos como a risperidona e a olanzapina apresentarão algum risco de surgimento de SEP, por se ligarem com maior força no receptor (SEEMAN, 2002).

Buscando-se entender o perfil de interação entre a risperidona e o receptor D3, foi empregada a mesma metodologia utilizada na etapa anterior (Capítulo 2) para a preparação da estrutura tridimensional refinada. Nossos resultados demonstram que a risperidona apresenta afinidade semelhante à observada para a ligação do haloperidol (-170,10) no receptor D3 (Figura 13), corroborando com as observações de que este agente apresenta afinidade semelhante aos agentes típicos (SEEMAN, 2002). Contudo, foi observado que a risperidona liga-se através de duas orientações distintas, sendo que a energia de ligação (considerando os resíduos analisados até o raio de 10 Å) da primeira (RO1) corresponde a -204,40 kcal/mol, enquanto que da segunda (RO2) é de -181,80 kcal/mol (GGA-TS). Para melhor compreender as implicações da ligação da risperidona no receptor D3 devido à existência de duas possíveis orientações de ligação, foram empregados cálculos quânticos e simulações de dinâmica molecular para descrever as interações entre este antipsicótico e os resíduos de aminoácido do sítio de ligação do receptor D3.

Os resultados dos cálculos demonstram que, apesar de RO1 e RO2 exibirem valores de energia total de ligação semelhantes durante a análise dos resíduos localizados até o raio de 9 Å, estas estruturas apresentam diferenças significativas no padrão de interação individual com os resíduos de aminoácidos do sítio de ligação, conforme observado pela análise da tabela 2. Dentre os resíduos estudados, aqueles que apresentaram maior energia de interação atrativa com RO1 foram Leu89, Glu90, Asp110, Phe106, Tyr365, Ser366 e Thr369, enquanto que Val82, Met112, Cys114 e Gly372 apresentaram interação repulsiva. Na estrutura contendo RO2 as maiores

interações atrativas foram observadas entre RO2 e Met83, Asp110, Ile183, Val189, Phe345, Phe346, Ser366 e Tyr373, enquanto que Trp85 e Cys114 apresentaram energias repulsivas.

Observou-se que, enquanto a ponte salina entre Asp110-RO1 e Asp110-RO2, apresentam energias atrativas semelhantes de -92,80 e -106,30 kcal/mol, respectivamente, a maior energia total de interação observada para RO1 deveu-se principalmente pela inclusão do resíduo Glu90 nos cálculos da energia total de interação. Este resíduo está localizado em um raio de 9,5 Å de RO1, e interage atrativamente através de -43,00 kcal/mol (GGA-TS). Já na estrutura D3-RO2, por localizar-se além do raio de 10 Å estudado, a energia de interação de Glu90-RO2 não foi incluída na análise. Contudo, vale salientar que este resíduo interage atrativamente com RO2 através de -42,00 kcal/mol (GGA-TS), ou seja, com intensidade próxima da observada para D3-RO2. Logo, apesar de termos observado a estabilização da energia de ligação de D3-RO2 sem a inclusão de Glu90 nos cálculos, acreditamos que este resíduo também interfira (apesar da distância) na interação de RO2 com o sítio de ligação. Desta forma, para melhor avaliarmos a contribuição deste resíduo, a energia de interação individual foi calculada após 10 ns de simulação por dinâmica molecular. Os resultados exibiram a redução da energia de interação entre Glu90-RO1, ficando em -36,20 kcal/mol (GGA-TS), enquanto que, a interação com RO2 praticamente não variou, ficando em -41,42 kcal/mol (GGA-TS).

Neste estudo, a dinâmica molecular foi utilizada para melhor compreendermos o comportamento das duas distintas orientações que a risperidona assumiu no sítio de ligação, bem como a interação com os resíduos que compõem a sua vizinhança. Os resultados indicam que, apesar da risperidona ser capaz de se ligar em duas orientações distintas, RO2 aparenta ser mais suscetível à rápida dissociação do receptor, enquanto

que RO1 demonstra maior estabilidade nas interações com os resíduos do sítio, apresentando menor deslocamento durante a simulação de 10 ns. Esta susceptibilidade à dissociação do receptor pode ser observada pela análise das figuras 10 e 11 do Capítulo 3, onde nota-se que enquanto RO1 mantém a distância de interação com o resíduo Asp110, RO2 afasta-se de Asp110 durante a simulação. Sabe-se que a interação com o resíduo Asp110 é fundamental para o ancoramento de ligantes neste receptor, e que a interação calculada deste com RO1 e RO2 representou, respectivamente, cerca de 45 e 58% do valor total da energia de ligação, logo, nossos resultados sugerem que o distanciamento de RO2 durante a simulação implica na diminuição da intensidade desta interação, favorecendo a dissociação do receptor. De fato, o cálculo da energia individual de interação do resíduo Asp110 após 10 ns de simulação de dinâmica molecular, indica que enquanto a energia de interação de Asp110-RO1 não alterou ($E = -92,80$ kcal/mol antes da simulação, e $E = -92,62$ kcal/mol após 10 ns de simulação), a interação entre Asp110 e RO2 enfraqueceu, variando de $-106,30$ kcal/mol para $-49,40$ kcal/mol. Uma vez que a interação com o resíduo Asp110 é fundamental para o ancoramento e esta foi desestabilizada, sugere-se que RO2 possui uma tendência a desligar-se rapidamente do receptor. Nossas observações sugerem que enquanto uma fração representada por RO1 tende a permanecer ligada ao sítio por maior período, a outra fração, representada por RO2 é capaz de ligar-se ao sítio com intensidade semelhante, mas tende a dissociar-se mais rapidamente devido ao seu arranjo espacial e rede de contatos. Esta rápida dissociação é de extrema importância, principalmente se interpretada frente ao bloqueio de receptores de dopamina na via nigroestriatal, permitindo o restabelecimento das sinapses e evitando o surgimento de SEP, e fornece uma hipótese para explicar o perfil misto típico/atípico da risperidona, a qual exerce seu efeito terapêutico através da ocupação dos receptores em níveis clínicos (60 - 80%) sem

contudo promover o excessivo bloqueio (acima de 80%) associado ao surgimento de SEP.

A análise dos resíduos próximos a cavidade de abertura do sítio de ligação também permitiu a diferenciação entre o padrão de ligação de RO1 e RO2. Dentre estes, o resíduo Ser182, demonstra maior intensidade na interação repulsiva com RO1 (2,70 kcal/mol, GGA-TS) do que com RO2 (0,80 kcal/mol, GGA-TS). Conforme observado na análise da ligação da risperidona (Capítulo 1) e do haloperidol (Capítulo 2) no receptor D3, a função aparente deste resíduo é forçar o ligante para o interior da cavidade de ligação. Logo, a orientação alternativa assumida pela risperidona (RO2) faz com que a porção do ligante que entrar em contato com o resíduo Ser182 não apresente o mesmo perfil de repulsão que apresenta RO1, e portanto não promove o direcionamento de RO2 para o interior da cavidade com a mesma intensidade que ocorre com RO1. Este comportamento é observado pela análise da distância entre RO2 e Ser182 durante a simulação de dinâmica molecular e pode ser visualizado na figura S15, do Capítulo 3. Outro resíduo que também está localizado na abertura da cavidade de ligação e aparenta ser altamente relevante para o rápido desligamento de RO2 é a Val86. Esse resíduo, ao interagir com a eticloprida exerce uma força repulsiva de 0,27 kcal/mol (GGA-TS), implicando em uma colaboração fraca para a manutenção da eticloprida dentro da cavidade do sítio de ligação, enquanto que, ao interagir com o haloperidol, exibe uma força de repulsão de 2,90 kcal/mol (GGA-TS), contribuindo para o direcionamento/manutenção do haloperidol no interior da cavidade de ligação. Já, quando observamos a interação de Val86 com a risperidona, vemos que RO1 é repelido com força de 0,80 kcal/mol (GGA-TS), demonstrando um perfil de interação mais próximo ao da eticloprida (0,27 kcal/mol) e muito mais fraco que o observado para o haloperidol (2,90 kcal/mol). Por outro lado, ao interagir com RO2, o resíduo Val86

apresenta força atrativa de -3,40 kcal/mol. Desta forma, enquanto Val86 repele a eticloprida, haloperidol e RO1 em direção ao interior da cavidade de ligação (haloperidol com maior intensidade), RO2 recebe um tratamento inverso, interagindo de forma atrativa com Val86, de forma a facilitar seu deslocamento em direção a abertura do sítio de ligação. Também, diferenças importante nas interações com os resíduos na porção interior do sítio foram observadas, tais como His349, o qual atua retendo RO1 no sítio através de uma interação atrativa moderada de -5,10 kcal/mol (GGA-TS), enquanto interage fracamente com RO2, através de -0,60 kcal/mol (GGA-TS). O consequente distanciamento entre RO2 e His349 pôde ser observado durante a simulação por dinâmica molecular e pode ser observado na figura 12 do Capítulo 3. O resíduo Trp85 apresentou maior energia de repulsão por RO2 (5,00 kcal/mol – GGA-TS) do que por RO1 (2,00 kcal/mol - GGA-TS) e por isso foi observado o aumento da distância entre este resíduo e RO2 durante a simulação de dinâmica molecular (figura S12, Capítulo 3). Localizado na abertura do sítio de ligação, próximo à extremidade da hélice 2, o resíduo Leu89 interage atrativamente com RO1 através de -8,70 kcal/mol (GGA-TS), enquanto exibe energia de repulsão levemente positiva de 0,30 kcal/mol (GGA-TS) para com RO2. A magnitude da interação sugere que este resíduo pode exercer papel relevante no ancoramento inicial de RO1, mas não RO2, no sítio de ligação.

A interação da risperidona com alguns dos resíduos analisados pode ser visualizada nas figuras 10 e 11, onde a densidade eletrônica foi projetada sob a superfície de potencial eletrostático dos resíduos presentes no sítio de ligação. Conforme observado nas figuras, enquanto a orientação de RO1 permite um equilíbrio de interações entre regiões de maior (vermelho) e menor (azul) densidade de elétrons no sítio de ligação, RO2 aparenta favorecer o contato repulsivo com os resíduos do sítio.

As distâncias entre alguns dos principais resíduos e as estruturas RO1 e RO2, durante a simulação de 10 ns, podem ser visualizadas no material suplementar do Capítulo 3.

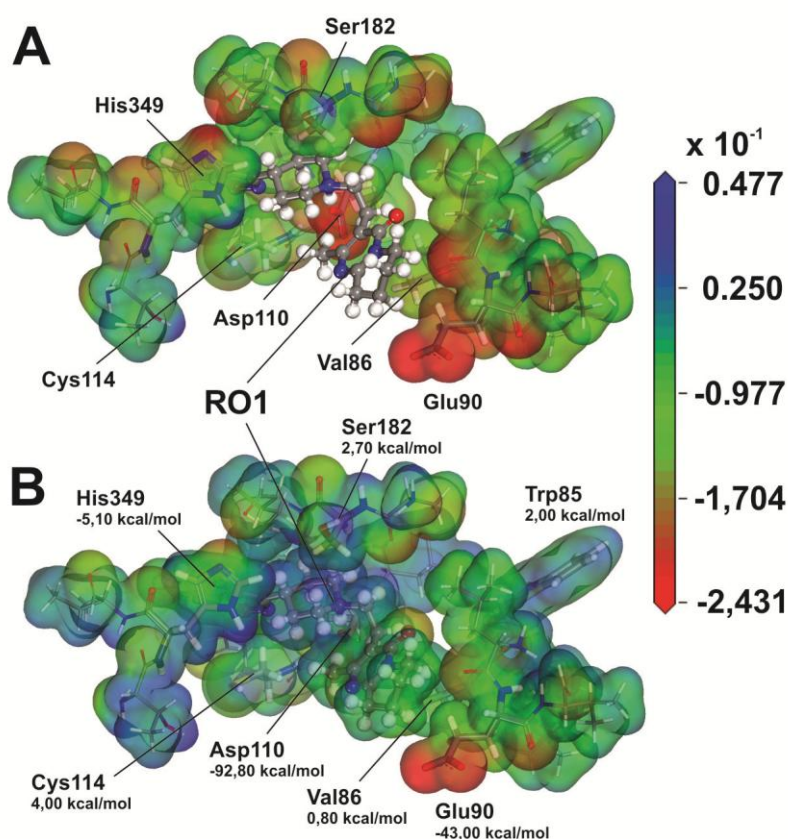


Figura 10: Superfície de potencial eletrostático da estrutura D3-RO1. (A) Representação da densidade eletrônica de resíduos de aminoácidos localizados no sítio de ligação. Os cálculos foram realizados sem a presença da risperidona, a qual foi posteriormente inserida para auxiliar a visualização das regiões de interação do sítio de ligação. (B) Representação da densidade eletrônica calculada na presença da risperidona no sítio de ligação, de forma a ressaltar as alterações na densidade eletrônica do sítio quando da ligação deste antipsicótico. A superfície do receptor foi colorida conforme a densidade de elétrons no sistema, sendo que as regiões em vermelho (azul) representam áreas de maior (menor) densidade eletrônica. As energias de interação individual de alguns resíduos são exibidas em kcal/mol e foram calculadas utilizando-se a DFT com o funcional GGA-TS.

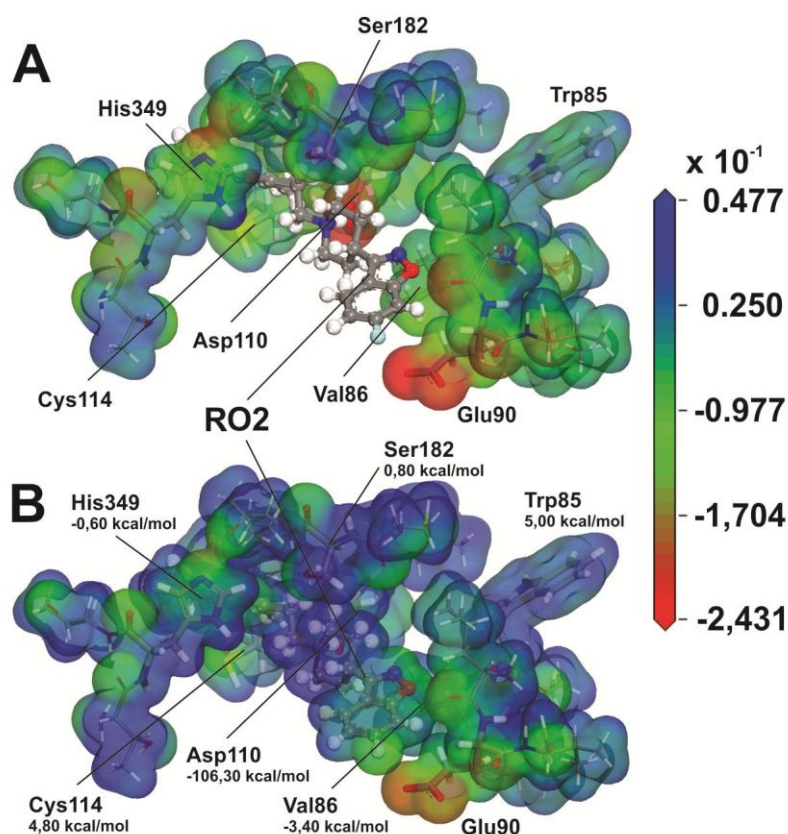


Figura 11: Superfície de potencial eletrostático da estrutura D3-RO2. (A) Representação da densidade eletrônica de resíduos de aminoácidos localizados no sítio de ligação. Os cálculos foram realizados sem a presença da risperidona, a qual foi posteriormente inserida para auxiliar a visualização das regiões de interação do sítio de ligação. (B) Representação da densidade eletrônica calculada na presença da risperidona no sítio de ligação, de forma a ressaltar as alterações na densidade eletrônica do sítio quando da ligação deste antipsicótico. A superfície do receptor foi colorida conforme a densidade de elétrons no sistema, sendo que as regiões em vermelho (azul) representam áreas de maior (menor) densidade eletrônica. As energias de interação individual de alguns resíduos são exibidas em kcal/mol e foram calculadas utilizando-se a DFT com o funcional GGA-TS.

Desta forma, nossos resultados indicam que conjuntamente, a orientação e geometria assumidas, bem como a intensidade da interação com os resíduos Trp85, Val86, Leu89, Val107, Val111, Ser182, His349, Cys114 e Tyr365 proporcionam maior grau de liberdade para RO2 no sítio de ligação, facilitando seu afastamento do resíduo Asp110 (o qual é altamente responsável pela estabilidade do ancoramento no sítio de ligação) e assim a sua rápida dissociação.

Ao compararmos a orientação dos três antipsicóticos estudados durante o desenvolvimento deste trabalho, observamos que enquanto a eticloprida está inserida no sítio de ligação primário (CHIEN, E. Y. T. *et al.*, 2010), a porção terminal do haloperidol e da risperidona estão orientados para a porção extracelular do sítio secundário (figura 12), o qual é formado pela junção de resíduos das alças ECL2 e ECL1 e hélices TM1, TM2 e TM7. A comparação entre as energias de interação calculadas entre os antipsicóticos Haloperidol e Risperidona e alguns dos resíduos que compõem o sítio de ligação secundário (TM1, TM2, ECL2 e TM7) podem ser visualizadas na tabela 1.

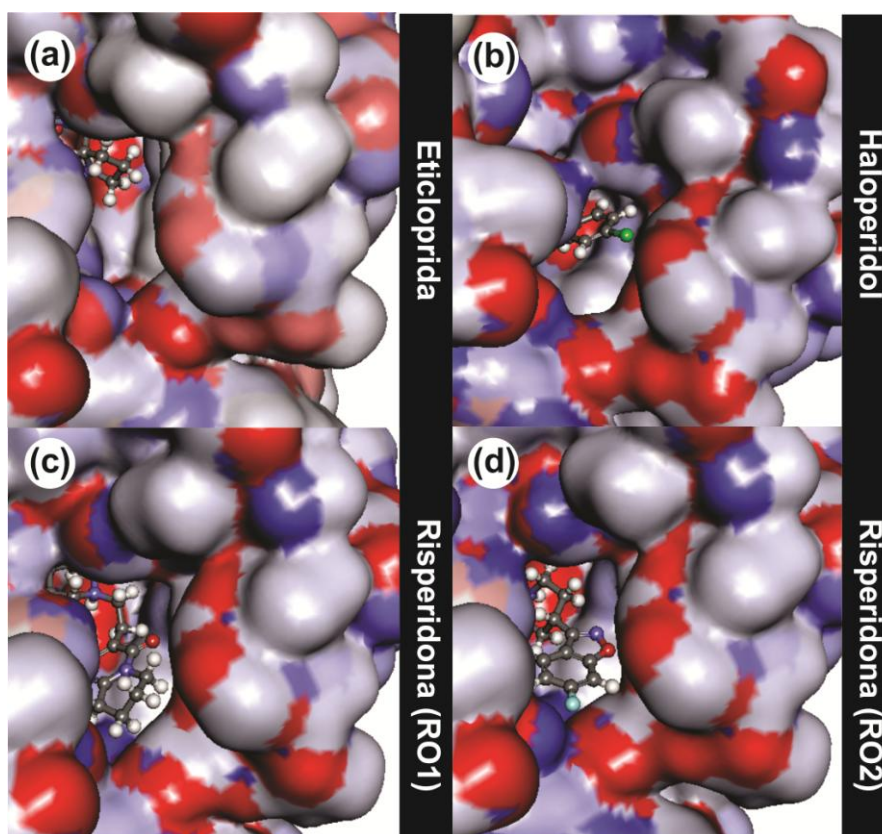


Figura 12: Abertura da cavidade do sítio de ligação do receptor D3 exibindo o antipsicótico em seu interior. (a) Eticloprida posicionada no sítio primário, com a porção pirrolidina (região 1) voltada para a abertura; (b) haloperidol posicionado ao longo do sítio primário e porção do secundário, com o fragmento clorofenil (região 1) voltada para a abertura da cavidade; (c) risperidona (RO1) posicionada no sítio primário e secundário e com a porção tetrahidropiridopirimidinona (região 4) voltada para a superfície; (d) risperidona (RO2), também posicionada no sítio primário e secundário, liga-se com a porção fluor-benzoxazol (região 1) voltada para a abertura do sítio de ligação. A superfície do receptor foi colorida conforme a carga parcial dos átomos do sistema, sendo que as regiões em vermelho (azul) representam áreas de maior (menor) densidade eletrônica.

Tabela 1: Comparação entre a energia de interação de alguns resíduos de aminoácido formadores do sítio de ligação secundário e os antipsicóticos haloperidol e risperidona – RO1 e RO2.

Segmento do receptor	Resíduo	Haloperidol (kcal/mol)	Risperidona (RO1) (kcal/mol)	Risperidona (RO2) (kcal/mol)
TM1	Tyr36	3,4	1,0	-
TM2	Val82	3,00	3,00	2,00
	Met83	5,00	-1,00	-9,00
	Val86	2,90	0,80	-3,40
	Leu89	-7,00	-8,7	0,30
ECL2	Asn173	-2,00	-3,00	-1,00
	Val180	-	0,20	-
	Cys181	-6,10	-3,50	-2,20
	Ser182	2,90	2,70	0,80
	Ile183	-9,70	-4,70	-8,00
	Ser184	-	-1,00	1,00
	Asn185	-3,00	-	-3,00
TM7	Tyr365	-16,00	-8,00	-6,00
	Tyr366	-3,00	-8,00	-6,00
	Thr369	-2,9	-7,8	-4,10
	Gly372	2,00	5,00	2,00
	Tyr373	-6,60	2,00	-6,00

Energia representada em kcal/mol e calculada através do funcional GGA-TS. TM1, TM2 e TM7 representam hélice transmembrana 1, 2 e 7, respectivamente. ECL2 representa alça extracelular 2.

Na região do sítio secundário, destaca-se o papel do resíduo Leu89, o qual interage fracamente com RO2 (0,30 kcal/mol, GGA-TS), enquanto atrai fortemente RO1 e haloperidol com uma força de -8,70 e -7,00 kcal/mol, respectivamente. Também, destaca-se o resíduo Met83, o qual interage com haloperidol repulsivamente através de 5,00 kcal/mol (GGA-TS), com RO1 através de força fracamente atrativa de -1,00 kcal/mol (GGA-TS), enquanto que com RO2 interage fortemente de forma atrativa através de -9,00 kcal/mol (GGA-TS). Outro resíduo que merece ser destacado é a Tyr365, a qual interage através de -6,00 kcal/mol com RO2, enquanto atrai RO1 e haloperidol com força de -8,00 e -16,00 kcal/mol, respectivamente. Estes dados sugerem que alguns resíduos localizados na região definida como segundo sítio de ligação desempenham um importante papel na interação com os antipsicóticos de estrutura longa, de forma a modular a ligação no receptor. Em especial, observa-se

grande diferença entre a interação do Haloperidol (3,90 kcal/mol, GGA-TS), RO1 (-5,90 kcal/mol, GGA-TS) e RO2 (-10,10 kcal/mol, GGA-TS) com os resíduos da hélice TM2 próximos da abertura da cavidade do sítio de ligação. A ECL2 tem sido relacionada com o importante papel de estabilizar a estrutura de cerca de 90% dos GPCRs através da formação de uma ponte dissulfeto com TM3, além de participar na formação do sítio de ligação destes receptores, atuando como porção flexível requerida para a ligação e ativação do receptor (MOREIRA *et al.*, 2010). Quando comparada a energia de interação total dos resíduos incluídos em nossos cálculos e pertencentes a ECL2, observa-se que esta porção do sítio interage com maior energia atrativa com o haloperidol (-17,90 kcal/mol, GGA-TS), do que com RO1 (-9,50 kcal/mol, GGA-TS) e RO2 (-12,40 kcal/mol, GGA-TS).

Conforme observado na figura 13, quando analisados conjuntamente, nossos resultados não demonstraram diferenças claras entre a energia total de ligação dos antipsicóticos estudados (eticloprida, haloperidol e risperidona). Contudo, estes dados corroboram com as observações de Seeman (2002), o qual destaca que a risperidona representa uma exceção a hipótese de atipicidade ligada à baixa afinidade dos agentes antipsicóticos pelo receptor de dopamina D2, já que esta liga-se com afinidade próxima a de agentes típicos apesar de apresentar um perfil terapêutico atípico associado a reduzidos SEP (SEEMAN, 2002).

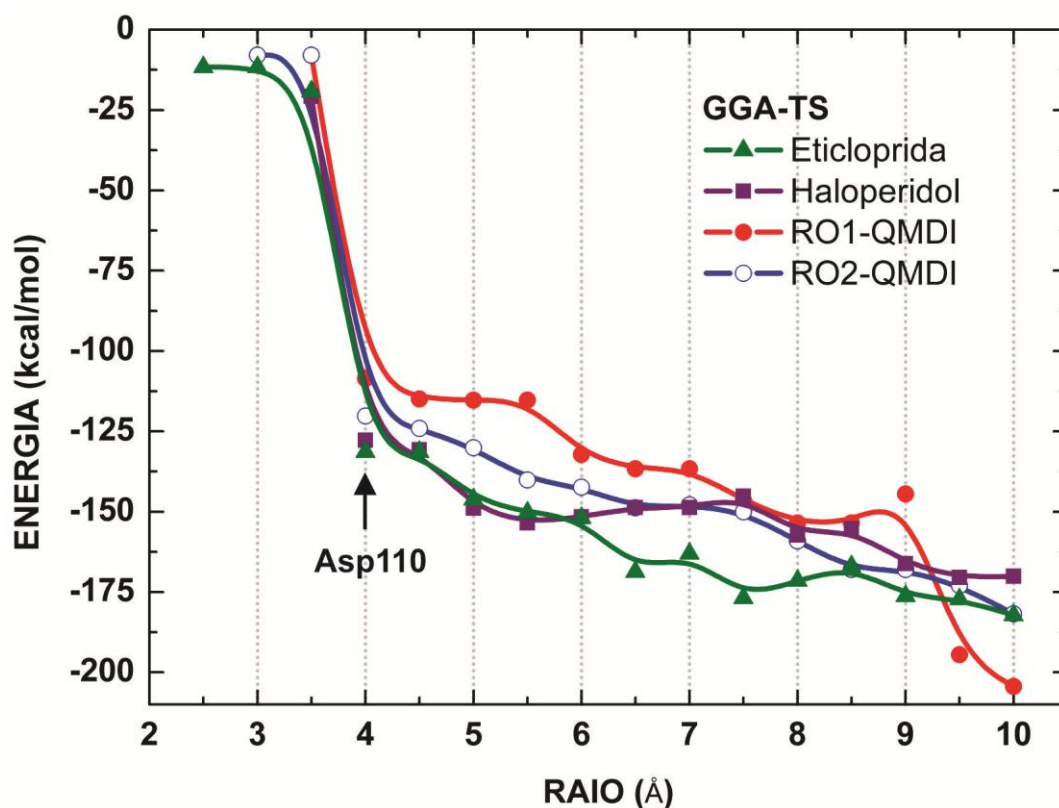


Figura 13: Perfil de variação de energia em função do raio analisado. Os valores de energia exibidos foram obtidos utilizando-se o nível de teoria DFT com o funcional GGA-TS durante os cálculos envolvendo: dados cristalográficos da estrutura Eticloprida-D3; e, ambas a estruturas refinadas (QM/MM) do Haloperidol-D3; as estruturas refinadas (QM/MM) da Risperidona-D3, RO1 e RO2.

A análise do perfil de interação energética demonstra uma grande redução (aumento da força de ligação) no valor da energia de interação até 4 Å para todos os compostos, a qual deve-se à presença do resíduo Asp110, já descrito como essencial para a ligação de compostos aminérgicos em receptores de dopamina (JAVITCH *et al.*, 1996; KALANI *et al.*, 2004; BOECKLER e GMEINER, 2006; SORIANO-URSÚA *et al.*, 2011). Conforme descrito anteriormente, este resíduo interage atrativamente com a eticloprida com a força de -112,21 kcal/mol; com o haloperidol através de -107,00 kcal/mol; e com a risperidona RO1 (RO2) através de -92,80 (-106,30) kcal/mol, utilizando-se GGA-TS. Quando observamos a variação de energia de RO1 na figura 13, constatamos que até os 9 Å esta orientação assumida pela risperidona apresenta menor

força de ligação entre todos os compostos testados, contudo ao interagir fortemente com o resíduo Glu90 (posicionado a 9,5 Å do centro geométrico do ligante) observa-se uma grande redução (aumento da força interação) no valor de -43,00 kcal/mol na energia de ligação total.

Dessa forma, observamos que enquanto o perfil energético geral de ligação não revelou informações claras que nos permitam caracterizar e individualizar o mecanismo de ligação entre agentes típicos e atípicos, a análise das interações individuais foi útil na identificação dos resíduos envolvidos na estabilidade da ligação de cada agente, trazendo informação sobre o possível mecanismo de atipicidade envolvido na ligação da risperidona. A tabela 2 exibe os valores da energia individual de interação (valores em kcal/mol, GGA-TS) de vários resíduos de aminoácidos com os antipsicóticos eticloprida, haloperidol e risperidona. Como estes antipsicóticos ocupam regiões distintas no sítio de ligação, alguns resíduos considerados importantes no processo de interação de um dado fármaco não foram incluídos no cálculo das interações para os demais por se localizarem muito distantes destes ligantes. Tal limitação deve-se ao fato de que os cálculos quânticos de interação resíduo-ligante aqui realizados levam em consideração o efeito dos resíduos de blindagem do sistema⁷, os quais normalmente aumentam em número com o aumento da distância entre o resíduo analisado e o antipsicótico. Como consequência, esse aumento no número de elétrons envolvidos no sistema torna impossível a realização do cálculo através da DFT.

⁷ Os resíduos de blindagem do sistema consistem em resíduos posicionados entre o antipsicótico e o resíduo cuja energia de interação está sendo calculada. Para uma explicação mais detalhada, consulte os anexos, na seção 8.1.4. Fracionamento Molecular com *Caps* Conjugados (MFCC).

Tabela 2: Energia de interação calculada entre os antipsicóticos Eticloprida, Haloperidol e Risperidona (RO1 e RO2).

Segmento do receptor	Resíduo	Eticloprida (kcal/mol)	Haloperidol (kcal/mol)	Risperidona (RO1) (kcal/mol)	Risperidona (RO2) (kcal/mol)
TM1	Tyr36	-	2.40	1.00	0.00
	Val78	-0.23	0.00	-2.00	-1.00
TM2	Val82	5.39	3.00	3.00	2.00
	Met83	-	5.00	-1.00	-9.00
	Trp85	-	-	2.00	5.00
	Val86	0.27	2.90	0.80	-3.40
	Leu89	-2.00	-7.00	-8.70	0.30
	Glu90	-	-	-43.00	-
TM3	Cys103	-	-	-1.00	-
	Phe106	-3.13	-1.00	-8.10	-3.00
	Val107	-4.08	-3.00	-4.90	-2.30
	Thr108	1.03	1.00	1.00	1.00
	Leu109	-0.81	-1.30	-1.00	0.00
	Asp110	-112.21	-107.00	-92.80	-106.30
	Val111	-1.56	5.10	-4.10	0.90
	Met112	1.85	0.00	4.10	-
	Met113	-0.83	1.00	-	-
TM4	Cys114	9.41	8.80	4.00	4.80
	Thr115	0.77	1.00	-	-
ECL2	Ser165	-2.05	-	-	-
	Leu168	0.28	1.00	0.00	1.00
ECL2	Asn173	-1.46	-2.00	-3.00	-1.00
	Val180	-	-	0.20	-
	Cys181	-2.97	-6.10	-3.50	-2.20
	Ser182	3.40	2.90	2.70	0.80
	Ile183	-7.57	-9.70	-4.70	-8.00
	Ser184	0.87	0.00	-1.00	1.00
TM5	Asn185	-4.43	-3.00	-	-3.00
	Phe188	-4.78	-3.00	-2.00	-3.00
	Val189	-7.16	-4.00	-2.00	-7.00
	Ser192	-6.16	-4.90	-4.10	-3.80
	Ser193	-0.83	-1.00	-1.00	-
	Ser196	-0.88	0.00	-	-
TM6	Phe197	0.44	-	-	-
	Trp342	-5.53	-1.00	-1.00	-2.00
	Phe345	-11.61	-11.10	-6.30	-7.90
	Phe346	-10.86	-8.30	-4.00	-11.00
	Thr348	-0.67	1.00	1.00	0.00
	Hys349	-1.97	-1.30	-5.10	-0.60
	Val350	-1.52	-1.00	-	-2.00
TM7	Asn352	2.84	1.00	1.60	-1.00
	Thr353	0.10	0.00	0.00	-2.00
	Tyr365	-5.72	-16.00	-8.00	-6.00
	Ser366	-	-3.00	-8.00	-6.00
	Thr368	-1.85	-2.00	0.00	-2.00
	Thr369	-1.68	-2.90	-7.80	-4.10
	Trp370	0.27	2.00	0.00	0.00
TM7	Leu371	-	-	-	0.00
	Gly372	1.33	2.00	5.00	2.00
	Tyr373	-5.94	-6.60	2.00	-6.00

Energia representada em kcal/mol e calculada através do funcional GGA-TS. TM1-7 representam hélice transmembrana 1-7, respectivamente. ECL2 representa alça extracelular 2.

A observação da tabela 2 nos permite a comparação da interação (GGA-TS) entre cada antipsicótico estudado e as porções das hélices transmembrana ou alças extracelulares, conforme representadas na figura 14. Apesar desta análise não nos trazer, de imediato, informação sobre a distinção entre o mecanismo de bloqueio de agentes típicos e atípicos, estes resultados corroboram com Hjerde e colaboradores (2005), os quais observaram que agentes com o comportamento típico apresentam o átomo halogênio orientado em direção a TM5, proporcionando menos deslocamento desta hélice em comparação a outras, enquanto que os agentes atípicos apresentaram o halogênio voltado para as hélices 2, 3 e 7 (HJERDE *et al.*, 2005). Em nosso estudo, haloperidol e RO1 posicionaram-se com o átomo de flúor orientado em direção a TM5, indicando também um caráter de ligação típica para RO1. Já RO2 apresentou o átomo de flúor orientado em direção as hélices 2, 3 e 7, conforme sugerido para agentes atípicos.

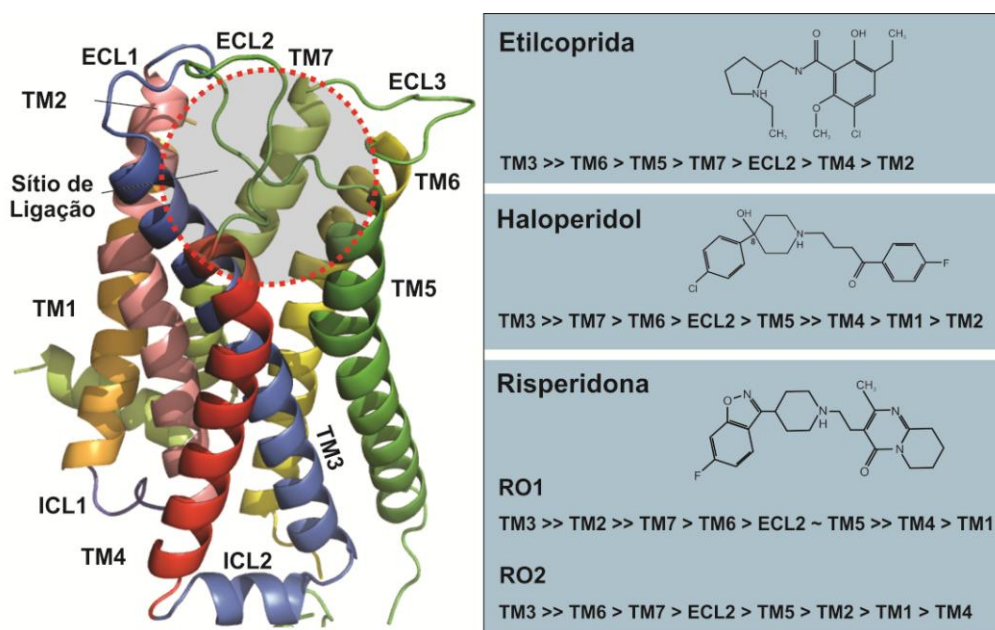


Figura 14: Interação dos antipsicóticos Etilcoprida, Haloperidol e Risperidona (RO1 e RO2) com as porções (hélices e alças) do receptor de dopamina humano D3. Relação obtida utilizando-se os dados cristalográficos contendo a etilcoprida e estruturas refinadas pelo método QM/MM contendo os antipsicóticos haloperidol e risperidona (RO1 e RO2).

Neste trabalho, observamos que a análise do perfil de interação individual dos resíduos de aminoácidos do sítio de ligação do receptor D3 e os antipsicóticos eticloprida, haloperidol e risperidona é uma ferramenta poderosa para a compreensão do mecanismo de ligação de agentes típicos e atípicos. Apesar da eticloprida não ser utilizada na clínica, a análise do seu perfil de interação com o receptor D3 nos permitiu desenvolver uma base metodológica sólida para a posterior investigação dos agentes terapêuticos haloperidol (típico) e risperidona (atípico). Nossos resultados permitiram além da descrição do perfil de ligação destes agentes, a proposição do mecanismo de ligação envolvido no comportamento atípico da risperidona. Também, os dados gerados consistem em uma base de dados rica em informação quantitativa relevante para o planejamento de novos antipsicóticos com perfil atípico.

5. Conclusões

Durante o desenvolvimento desta tese, foram utilizados métodos teóricos de análise estrutural para obter os perfis de interação energética de ligação dos antipsicóticos haloperidol, risperidona e eticloprida no receptor de dopamina D3. As análises valeram-se dos dados cristalográficos da estrutura deste receptor e de cálculos computacionais utilizando métodos clássicos e quânticos. Devido ao grande tamanho do sistema, foi adotado um protocolo de fracionamento protéico combinado com cálculos quânticos através da Teoria do Funcional da Densidade que permitiu a obtenção dos valores de interação individual de cada resíduo de aminoácido relevante para a estabilização da ligação.

Também, foi estabelecido um protocolo de construção e refinamento de estruturas contendo antipsicóticos ligados ao receptor de dopamina D3. Neste protocolo foram definidos os parâmetros ótimos para a ancoragem molecular de distintos antipsicóticos além de um método de refinamento conformacional utilizando o esquema QM/MM, onde o antipsicótico foi tratado na camada quântica e o receptor na camada clássica. Conforme comprovado pelos resultados, o método QM/MM mostrou-se superior ao refinamento por método clássico e permitiu a obtenção de estruturas mais estáveis, corroborando com descrições da literatura.

A análise dos dados cristalográficos (PDBID: 3PBL) permitiu a identificação de um número maior de resíduos envolvidos na estabilização da ligação da eticloprida no receptor D3 do que explicitado pela simples análise dos resíduos de contato visualizados na estrutura tridimensional (PDBID: 3PBL). A energia total de ligação calculada, incluindo resíduos até 10 Å, foi de -182,24 (-266,56) kcal/mol, usando o

funcional GGA-TS (LDA-OBS), sendo que observou-se a estabilização da ligação em torno de 8 Å, quando somente 19 resíduos foram incluídos nos cálculos. Dentre todos os resíduos analisados, os que apresentaram maior contribuição foram Val82, Val107, Asp110, Cys114, Ser182, Ile183, Val189, Trp342, Phe345, Phe346 e Tyr373. Conforme descrito na literatura, observou-se a fundamental contribuição do resíduo Asp110, o qual interage atrativamente através de uma ponte salina com o grupamento amina da eticloprida, contribuindo com cerca de 61% da energia total de interação. Os resíduos Val107, Ser182, Phe188, Val82 e Asn185 foram pela primeira vez relacionados diretamente com o mecanismo de ligação da eticloprida no receptor D3.

A análise da interação do haloperidol com o receptor D3 foi possível através do refinamento estrutural, por QM/MM, do resultado do ancoramento molecular. O cálculo da energia de interação utilizando DFT novamente confirmou a relevância do resíduo Asp110 interagindo com o grupamento amina do haloperidol e respondendo por cerca de 63% da energia total de ligação. Foram analisados 43 resíduos de aminoácidos ao longo de 10 Å e a estabilização da ligação foi observada em torno de 6 Å. A energia total de ligação calculada foi de -170,10 (-269,50) kcal/mol utilizando o funcional GGA-TS (LDA-OBS). Os resíduos que mais contribuíram para a ligação do haloperidol foram: Asp110, Cys114, Ile183, Phe345, Phe346, Tyr365 e Tyr373. Observou-se a formação de interação do tipo pi-cátion entre Phe345 e nitrogênio do fragmento 4-hidroxipiperidinil do haloperidol, e uma interação tipo pi-sigma entre His349 e o átomo de carbono (C22)H do fragmento fluorofenil (Figura 5b, região iv). Os resíduos Cys181 e Ile183, ambos formadores da alça extracelular 2, apresentaram significativa contribuição para a ligação do haloperidol, com energias atrativas de -6,10 (-6,60) e -9,70 (-15,80) kcal/mol, respectivamente, utilizando-se o funcional GGA-TS (LDA-

OBS). Os resultados permitiram a criação de um painel sugestivo das mudanças estruturais para gerar derivados do haloperidol.

A análise da interação da risperidona com o receptor D3 também contou com o protocolo de ancoramento molecular seguido do refinamento estrutural por QM/MM. Os resultados indicaram a possibilidade de ligação da risperidona em duas orientações distintas, RO1 e RO2, ambas com alta afinidade pelo receptor. Contudo, a análise detalhada da energia de interação destas orientações demonstrou que, enquanto RO1 liga-se com energia total levemente superior ao haloperidol, RO2 liga-se com energia semelhante ao haloperidol e tende a dissociar-se mais rápido do receptor de dopamina do que RO1. Estes dados corroboram com a interpretação de Seeman e Kapur (SEEMAN, 2002) de que a velocidade com que um antipsicótico se desloca do receptor de dopamina é o fator determinante para a sua ação atípica, e não sua energia de interação. Desta forma, nossos resultados sugerem uma explicação para o fato da risperidona, apesar de ligar-se ao receptor de dopamina com força semelhante aos agentes típicos, comporta-se de forma atípica apresentando reduzida incidência de SEP. Conforme observado, sugere-se que esse mecanismo ocorra pelo desligamento rápido da fração do antipsicótico risperidona ligado através da orientação 2 (RO2).

Os dados apresentados nesta tese destacam a importância do uso de cálculos quânticos no estudo das interações entre proteínas e seus ligantes, especificamente o receptor de dopamina humano D3 e antipsicóticos típicos e atípicos. Nossos resultados demonstram um perfil individualizado da interação dos resíduos de aminoácidos e os distintos antipsicóticos testados, os quais poderão ser utilizados no desenvolvimento de novos agentes terapêuticos ou derivados estruturais com perfil atípico, mais potentes e com menos efeitos adversos.

6. Perspectivas

Calcular o perfil energético da ligação de outros antipsicóticos no receptor D3, buscando-se melhor compreender o mecanismo de ligação destes agentes, bem como definir possíveis regiões de interação no sítio de ligação que permitam o desenvolvimento de novos agentes com perfil atípico e reduzida/inexistente propensão de desencadeamento de SEP. Também, realizar a análise da interação dos antipsicóticos com proteínas associadas a efeitos indesejáveis. Estes dados serão utilizados na criação de uma base de dados de interação ligante-proteína, a qual poderá ser utilizada no desenvolvimento racional de novos compostos, permitindo a predição *in silico* dos possíveis efeitos adversos e do perfil de ligação de candidatos antipsicóticos.

Modelar o receptor humano de dopamina D2 e realizar estudos comparativos, quando cabível, a fim de investigar possíveis interações entre antipsicóticos e os resíduos do sítio de ligação que possam auxiliar na compreensão dos mecanismos de seletividade D2/D3.

7. Referências Bibliográficas

ABAGYAN, R.; TOTROV, M. High-throughput docking for lead generation. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 5, n. 4, p. 375-382, 2001.

ABI-DARGHAM, A.; RODENHISER, J.; PRINTZ, D.; ZEA-PONCE, Y.; GIL, R.; KEGELES, L. S.; WEISS, R.; COOPER, T. B.; MANN, J. J.; VAN HEERTUM, R. L.; GORMAN, J. M.; LARUELLE, M. Increased baseline occupancy of D2 receptors by dopamine in schizophrenia. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 97, n. 14, p. 8104-8109, July 5, 2000 2000.

ABOU-SETTA AM; MOUSAVI SS; SPOONER C; SCHOUTEN JR; PASICHNYK D; ARMIJO-OLIVO S; BEAITH A; SEIDA JC; DURSUN S; NEWTON AS; L., H. First-Generation Versus Second-Generation Antipsychotics in Adults: Comparative Effectiveness. . **Comparative Effectiveness Review No. 63. (Prepared by the University of Alberta Evidence-based Practice Center under Contract No. 290-2007-10021.) AHRQ Publication No. 12-EHC054-EF. Rockville, MD: Agency for Healthcare Research and Quality; August 2012. www.effectivehealthcare.ahrq.gov/reports/final.cfm.**, 2012.

ANDREASEN, N. C. Negative V Positive Schizophrenia - Definition and Validation. **Archives of General Psychiatry**, v. 39, n. 7, p. 789-794, 1982.

_____. Positive and Negative Symptoms of Psychosis - a Citation-Classic Commentary on Negative Symptoms in Schizophrenia - Definition and Reliability by Andreasen,N.C., and on Negative V Positive Schizophrenia - Definition and Validation by Andreasen,N.C., Olsen,S. **Current Contents/Clinical Medicine**, n. 48, p. 8-8, Nov 29 1993.

ANDREASSEN, O. A.; JØRGENSEN, H. A. Neurotoxicity associated with neuroleptic-induced oral dyskinesias in rats: Implications for tardive dyskinesia? **Progress in Neurobiology**, v. 61, n. 5, p. 525-541, 2000.

AYERS, P. W.; MORRISON, R. C.; ROY, R. K. Variational principles for describing chemical reactions: Condensed reactivity indices. **The Journal of Chemical Physics**, v. 116, n. 20, p. 8731-8744, 2002.

BARROSO-NETO, I. L.; MARQUES, J. P. C.; DA COSTA, R. F.; CAETANO, E. W. S.; CAVADA, B. S.; GOTTFRIED, C.; FREIRE, V. N. Inactivation of Ovine Cyclooxygenase-1 by Bromoaspirin and Aspirin: A Quantum Chemistry Description. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 116, n. 10, p. 3270-3279, 2012/03/15 2012.

BECKE, A. D. Density-functional exchange-energy approximation with correct asymptotic behavior. **Physical Review A**, v. 38, n. 6, p. 3098-3100, 1988.

_____. Density-functional thermochemistry. III. The role of exact exchange. **The Journal of Chemical Physics**, v. 98, n. 7, p. 5648-5652, 1993.

- BEZARD, E.; FERRY, S.; MACH, U.; STARK, H.; LERICHE, L.; BORAUD, T.; GROSS, C.; SOKOLOFF, P. Attenuation of levodopa-induced dyskinesia by normalizing dopamine D3 receptor function. **Nature Medicine**, v. 9, n. 6, p. 762-767, 2003.
- BLUNDELL, T. L.; SIBANDA, B. L.; MONTALVÃO, R. W.; BREWERTON, S.; CHELLIAH, V.; WORTH, C. L.; HARMER, N. J.; DAVIES, O.; BURKE, D. Structural biology and bioinformatics in drug design: opportunities and challenges for target identification and lead discovery. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 361, n. 1467, p. 413-423, March 29, 2006 2006.
- BOECKLER, F.; GMEINER, P. The structural evolution of dopamine D3 receptor ligands: Structure-activity relationships and selected neuropharmacological aspects. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 112, n. 1, p. 281-333, 2006.
- BOHÓRQUEZ, H. J.; CÁRDENAS, C.; MATTA, C. F.; BOYD, R. J.; PATARROYO, M. E. Methods in Biocomputational Chemistry: A Lesson from the Amino Acids. In: (Ed.). **Quantum Biochemistry**: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2010. p.403-421. ISBN 9783527629213.
- BROOIJMANS, N.; KUNTZ, I. D. MOLECULAR RECOGNITION AND DOCKING ALGORITHMS. **Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure**, v. 32, n. 1, p. 335-373, 2003.
- BYRNE, S.; WALTER, G.; HUNT, G.; SOH, N.; CLEARY, M.; DUFFY, P.; CRAWFORD, G.; KRABMAN, P.; CONCANNON, P.; MALHI, G. Self-reported Side Effects in children and Adolescents Taking Risperidone. **Australasian Psychiatry**, v. 18, n. 1, p. 42-45, February 1, 2010 2010.
- CAMPIONI, G.; BUTINI, S.; FATTORUSSO, C.; CATALANOTTI, B.; GEMMA, S.; NACCI, V.; MORELLI, E.; CAGNOTTO, A.; MEREGHETTI, I.; MENNINI, T.; CARLI, M.; MINETTI, P.; DI CESARE, M. A.; MASTROIANNI, D.; SCAFETTA, N.; GALLETI, B.; STASI, M. A.; CASTORINA, M.; PACIFICI, L.; VERTECHY, M.; SERIO, S. D.; GHIRARDI, O.; TINTI, O.; CARMINATI, P. Pyrrolo[1,3]benzothiazepine-Based Serotonin and Dopamine Receptor Antagonists. Molecular Modeling, Further Structure–Activity Relationship Studies, and Identification of Novel Atypical Antipsychotic Agents. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 47, n. 1, p. 143-157, 2004/01/01 2003.
- CANITANO, R.; SCANDURRA, V. Risperidone in the treatment of behavioral disorders associated with autism in children and adolescents. **Neuropsychiatr Dis Treat**, v. 4, n. 4, p. 723-30, Aug 2008.
- CARLSSON, A.; LINDQVIST, M. Effect of Chlorpromazine or Haloperidol on Formation of 3-methoxytyramine and Normetanephrine in Mouse Brain. **Acta Pharmacologica et Toxicologica**, v. 20, p. 140-4, 1963.
- CARLSSON, A.; LINDQVIST, M.; MAGNUSSON, T. O. R. 3,4-Dihydroxyphenylalanine and 5-Hydroxytryptophan as Reserpine Antagonists. **Nature**, v. 180, n. 4596, p. 1200-1200, 1957.

- CARLSSON, J.; COLEMAN, R. G.; SETOLA, V.; IRWIN, J. J.; FAN, H.; SCHLESSINGER, A.; SALI, A.; ROTH, B. L.; SHOICHET, B. K. Ligand discovery from a dopamine D3 receptor homology model and crystal structure. **Nat Chem Biol**, v. 7, n. 11, p. 769-778, 2011.
- CHANG, Y.-A.; ARES, J.; ANDERSON, K.; SABOL, B.; WALLACE, R. A.; FAROOQUI, T.; URETSKY, N.; MILLER, D. D. Dopamine agonists: effects of charged and uncharged analogs of dopamine. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 30, n. 1, p. 214-218, 1987/01/01 1987.
- CHEN, J.; LEVANT, B.; WANG, S. High-affinity and selective dopamine D3 receptor full agonists. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 22, n. 17, p. 5612-5617, 2012.
- CHEN, X.; ZHANG, Y.; ZHANG, J. Z. H. An efficient approach for ab initio energy calculation of biopolymers. **The Journal of Chemical Physics**, v. 122, n. 18, p. 184105, 2005.
- CHIEN, E. Y.; LIU, W.; ZHAO, Q.; KATRITCH, V.; HAN, G. W.; HANSON, M. A.; SHI, L.; NEWMAN, A. H.; JAVITCH, J. A.; CHEREZOV, V.; STEVENS, R. C. Structure of the human dopamine D3 receptor in complex with a D2/D3 selective antagonist. **Science**, v. 330, n. 6007, p. 1091-5, Nov 19 2010.
- CHIEN, E. Y. T.; LIU, W.; ZHAO, Q.; KATRITCH, V.; WON HAN, G.; HANSON, M. A.; SHI, L.; NEWMAN, A. H.; JAVITCH, J. A.; CHEREZOV, V.; STEVENS, R. C. Structure of the Human Dopamine D3 Receptor in Complex with a D2/D3 Selective Antagonist. **Science**, v. 330, n. 6007, p. 1091-1095, November 19, 2010 2010.
- CHO, A. E.; CHUNG, J. Y.; KIM, M.; PARK, K. Quantum mechanical scoring for protein docking. **J Chem Phys**, v. 131, n. 13, p. 134108, 2009.
- CHOUINARD G; KOPALA L; LABELLE A; BEAUCLAIR L; JOHNSON SV; KI., S. Phase-IV multicentre clinical study of risperidone in the treatment of outpatients with schizophrenia. **The RIS-CAN-3 Study Group.Can J Psychiatry**., v. 43, p. 1018-25, 1998.
- CHRISTIAN, R.; SAAVEDRA, L.; GAYNES, B. N.; SHEITMAN, B.; WINES, R. C. M.; JONAS, D. E.; VISWANATHAN, M.; ELLIS, A. R.; WOODDELL, C.; CAREY, T. S. Future Research Needs for First- and Second-Generation Antipsychotics for Children and Young Adults. **Future Research Needs Papers, No. 13.**, Rockville (MD), 2012. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK84660/> >.
- CHUNG, L. W.; HIRAO, H.; LI, X.; MOROKUMA, K. The ONIOM method: its foundation and applications to metalloenzymes and photobiology. **Wiley Interdisciplinary Reviews: Computational Molecular Science**, v. 2, n. 2, p. 327-350, 2012.

- COSCONATI, S.; FORLI, S.; PERRYMAN, A. L.; HARRIS, R.; GOODSSELL, D. S.; OLSON, A. J. Virtual screening with AutoDock: theory and practice. **Expert Opinion on Drug Discovery**, v. 5, n. 6, p. 597-607, 2010.
- COSSIO, P.; TROVATO, A.; PIETRUCCI, F.; SENO, F.; MARITAN, A.; LAIO, A. Exploring the Universe of Protein Structures beyond the Protein Data Bank. **PLoS Comput Biol**, v. 6, n. 11, p. e1000957, 2010.
- CRAMER, C. J. **Essentials of Computational Chemistry: Theories and Models**. 2^a ed. London: Wiley, 2010.
- CREESE, I.; BURT, D.; SNYDER, S. Dopamine receptor binding predicts clinical and pharmacological potencies of antischizophrenic drugs. **Science**, v. 192, n. 4238, p. 481-483, April 30, 1976 1976.
- DA COSTA, R. F.; FREIRE, V. N.; BEZERRA, E. M.; CAVADA, B. S.; CAETANO, E. W. S.; DE LIMA FILHO, J. L.; ALBUQUERQUE, E. L. Explaining statin inhibition effectiveness of HMG-CoA reductase by quantum biochemistry computations. **Physical Chemistry Chemical Physics**, v. 14, n. 4, p. 1389-1398, 2012.
- DAVIS, K. L.; KAHN, R. S.; KO, G.; DAVIDSON, M. Dopamine in schizophrenia: A review and reconceptualization. **The American Journal of Psychiatry**, v. 148, n. 11, p. 1474-1486, 1991.
- DE LEAN, A.; STADEL, J. M.; LEFKOWITZ, R. J. A ternary complex model explains the agonist-specific binding properties of the adenylate cyclase-coupled beta-adrenergic receptor. **J Biol Chem**, v. 255, n. 15, p. 7108-17, Aug 10 1980.
- DELLEY, B. An all-electron numerical method for solving the local density functional for polyatomic molecules. **The Journal of Chemical Physics**, v. 92, n. 1, p. 508-517, 1990.
- _____. From molecules to solids with the DMol[^{sup} 3] approach. **The Journal of Chemical Physics**, v. 113, n. 18, p. 7756-7764, 2000.
- DREWS, J. Drug Discovery: A Historical Perspective. **Science**, v. 287, n. 5460, p. 1960-1964, March 17, 2000 2000.
- FARDE, L.; WIESEL, F.; STONE-ELANDER, S.; ET AL. D2 dopamine receptors in neuroleptic-naive schizophrenic patients: A positron emission tomography study with [¹¹C]raclopride. **Archives of General Psychiatry**, v. 47, n. 3, p. 213-219, 1990.
- FENG, Z.; HOU, T.; LI, Y. Selectivity and activation of dopamine D3R from molecular dynamics. **J Mol Model**, v. 18, n. 12, p. 5051-63, Dec 2012.
- FOUSSIAS, G.; REMINGTON, G. Negative symptoms in schizophrenia: avolition and Occam's razor. **Schizophrenia Bulletin**, v. 36, n. 2, p. 359-69, Mar 2010.

GAO, A. M.; ZHANG, D. W.; ZHANG, J. Z. H.; ZHANG, Y. An efficient linear scaling method for ab initio calculation of electron density of proteins. **Chemical Physics Letters**, v. 394, n. 4-6, p. 293-297, 2004.

GIRGIS, R. R.; XU, X.; MIYAKE, N.; EASWARAMOORTHY, B.; GUNN, R. N.; RABINER, E. A.; ABI-DARGHAM, A.; SLIFSTEIN, M. In Vivo Binding of Antipsychotics to D3 and D2 Receptors: A PET Study in Baboons with [¹¹C]-(+)-PHNO. **Neuropsychopharmacology**, v. 36, n. 4, p. 887-895, 2011.

GIROS, B.; SOKOLOFF, P.; MARTRES, M.-P.; RIOU, J.-F.; EMORINE, L. J.; SCHWARTZ, J.-C. Alternative splicing directs the expression of two D2 dopamine receptor isoforms. **Nature**, v. 342, n. 6252, p. 923-926, 1989.

GORDON, M. S.; FEDOROV, D. G.; PRUITT, S. R.; SLIPCHENKO, L. V. Fragmentation Methods: A Route to Accurate Calculations on Large Systems. **Chemical Reviews**, v. 112, n. 1, p. 632-672, 2012/01/11 2011.

GRAHAM, P. L. **An Introduction to Medicinal Chemistry**. 4. New York: Oxford University Press Inc., 2009. 752.

HE, X.; ZHANG, J. Z. H. A new method for direct calculation of total energy of protein. **The Journal of Chemical Physics**, v. 122, n. 3, p. 031103-4, 2005.

HEIDBREDE, C. A.; NEWMAN, A. H. Current perspectives on selective dopamine D3 receptor antagonists as pharmacotherapeutics for addictions and related disorders. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1187, n. 1, p. 4-34, 2010.

HEISS, W. D.; HOYER, J.; THALHAMMER, G. Antipsychotic drugs and dopamine-mediated responses in Aplysia neurons. **Journal of Neural Transmission**, v. 39, n. 3, p. 187-208, 1976/09/01 1976.

HENNIG, J.; SATTLER, M. The dynamic duo: Combining NMR and small angle scattering in structural biology. **Protein Science**, p. n/a-n/a, 2014.

HIPPIUS, H. The history of clozapine. **Psychopharmacology**, v. 99, n. 1, p. S3-S5, 1989/03/01 1989.

HJERDE, E.; DAHL, S. G.; SYLTE, I. Atypical and typical antipsychotic drug interactions with the dopamine D2 receptor. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 40, n. 2, p. 185-194, 2005.

HOHENBERG, P.; KOHN, W. Inhomogeneous Electron Gas. **Physical Review**, v. 136, n. 3B, p. B864, 1964.

JABER, M.; ROBINSON, S. W.; MISSALE, C.; CARON, M. G. Dopamine receptors and brain function. **Neuropharmacology**, v. 35, n. 11, p. 1503-1519, 1997.

JANSSEN, P. A.; NIEMEGEREERS, C. J.; AWOUTERS, F.; SCHELLEKENS, K. H.; MEGENS, A. A.; MEERT, T. F. Pharmacology of risperidone (R 64 766), a new

antipsychotic with serotonin-5₂ and dopamine-D₂ antagonistic properties. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 244, n. 2, p. 685-693, February 1, 1988 1988.

JANSSEN, P. J.; JAGENEAU, A. M.; SCHELLEKENS, K. L. Chemistry and pharmacology of compounds related to 4-(4-hydroxy-4-phenyl-piperidino)-butyrophene. **Psychopharmacologia**, v. 1, n. 5, p. 389-392, 1960/09/01 1960.

JASKOLSKI, M.; DAUTER, Z.; WLODAWER, A. A brief history of macromolecular crystallography, illustrated by a family tree and its Nobel fruits. **FEBS Journal**, p. n/a-n/a, 2014.

JAVITCH, J. A.; FU, D.; CHEN, J. Differentiating dopamine D₂ ligands by their sensitivities to modification of the cysteine exposed in the binding-site crevice. **Molecular Pharmacology**, v. 49, n. 4, p. 692-698, April 1, 1996 1996.

JI, M.; CHEN, J.; DING, K.; WU, X.; VARADY, J.; LEVANT, B.; WANG, S. Design, synthesis and structure–activity relationship studies of hexahydropyrazinoquinolines as a novel class of potent and selective dopamine receptor 3 (D₃) ligands. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 15, n. 6, p. 1701-1705, 2005.

JOYCE, J. N. Dopamine D₃ receptor as a therapeutic target for antipsychotic and antiparkinsonian drugs. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 90, n. 2–3, p. 231-259, 2001.

JOYCE, J. N.; MEADOR-WOODRUFF, J. H. Linking the Family of D₂ Receptors to Neuronal Circuits in Human Brain: Insights into Schizophrenia. **Neuropsychopharmacology**, v. 16, n. 6, p. 375-384, 1997.

JOYCE, J. N.; MILLAN, M. J. Dopamine D₃ receptor antagonists as therapeutic agents. **Drug Discovery Today**, v. 10, n. 13, p. 917-925, 2005.

KALANI, M. Y. S.; VAIDEHI, N.; HALL, S. E.; TRABANINO, R. J.; FREDDOLINO, P. L.; KALANI, M. A.; FLORIANO, W. B.; KAM, V. W. T.; GODDARD, W. A. The predicted 3D structure of the human D₂ dopamine receptor and the binding site and binding affinities for agonists and antagonists. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 101, n. 11, p. 3815-3820, March 16, 2004 2004.

KAPUR, S.; SEEMAN, P. Does Fast Dissociation From the Dopamine D₂ Receptor Explain the Action of Atypical Antipsychotics?: A New Hypothesis. **The American Journal of Psychiatry**, v. 158, n. 3, p. 360-369, March 1, 2001 2001.

KAPUR, S.; ZIPURSKY, R. B.; REMINGTON, G. Clinical and theoretical implications of 5-HT₂ and D₂ receptor occupancy of clozapine, risperidone, and olanzapine in schizophrenia. **American Journal of Psychiatry**, v. 156, n. 2, p. 286-93, Feb 1999.

KEBABIAN, J. W.; CALNE, D. B. Multiple receptors for dopamine. **Nature**, v. 277, n. 5692, p. 93-96, 1979.

KOHN, W.; SHAM, L. J. Self-Consistent Equations Including Exchange and Correlation Effects. **Physical Review**, v. 140, n. 4A, p. A1133, 1965.

LEE, C.; YANG, W.; PARR, R. G. Development of the Colle-Salvetti correlation-energy formula into a functional of the electron density. **Physical Review B**, v. 37, n. 2, p. 785-789, 1988.

LIEBERMAN, J. A.; KANE, J. M.; ALVIR, J. Provocative tests with psychostimulant drugs in schizophrenia. **Psychopharmacology**, v. 91, n. 4, p. 415-433, 1987/04/01 1987.

LINDSTRÖM, L. H.; GEFVERT, O.; HAGBERG, G.; LUNDBERG, T.; BERGSTRÖM, M.; HARTVIG, P.; LÅNGSTRÖM, B. Increased dopamine synthesis rate in medial prefrontal cortex and striatum in schizophrenia indicated by L-(β -11C) DOPA and PET. **Biological Psychiatry**, v. 46, n. 5, p. 681-688, 1999.

LÖBER, S.; HÜBNER, H.; TSCHAMMER, N.; GMEINER, P. Recent advances in the search for D3- and D4-selective drugs: probes, models and candidates. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 32, n. 3, p. 148-157, 2011.

LOPEZ-MUNOZ, F.; ALAMO, C.; RUBIO, G.; CUENCA, E. Half a century since the clinical introduction of chlorpromazine and the birth of modern psychopharmacology. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 28, n. 1, p. 205-208, 2004.

LUEDTKE, R. R.; MISHRA, Y.; WANG, Q.; GRIFFIN, S. A.; BELL-HORNER, C.; TAYLOR, M.; VANGVERAVONG, S.; DILLON, G. H.; HUANG, R.-Q.; REICHERT, D. E.; MACH, R. H. Comparison of the Binding and Functional Properties of Two Structurally Different D2 Dopamine Receptor Subtype Selective Compounds. **ACS Chemical Neuroscience**, v. 3, n. 12, p. 1050-1062, 2012/12/19 2012.

MAHMOUDI, S.; LÉVESQUE, D.; BLANCHET, P. J. Upregulation of Dopamine D3, not D2, receptors correlates with tardive dyskinesia in a primate model. **Movement Disorders**, p. n/a-n/a, 2014.

MALMBERG; MIKAELS; MOHELL, N. Agonist and inverse agonist activity at the dopamine D3 receptor measured by guanosine 5'-gamma-thio-triphosphate--35S-binding. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 285, n. 1, p. 119-26, Apr 1998.

MARTELLE, J. L.; NADER, M. A. A Review of the Discovery, Pharmacological Characterization, and Behavioral Effects of the Dopamine D2-Like Receptor Antagonist Eticlopride. **CNS Neuroscience & Therapeutics**, v. 14, n. 3, p. 248-262, 2008.

MARTINS, A. C. V.; DE LIMA-NETO, P.; BARROSO-NETO, I. L.; CAVADA, B. S.; FREIRE, V. N.; CAETANO, E. W. S. An ab initio explanation of the activation and antagonism strength of an AMPA-sensitive glutamate receptor. **RSC Advances**, v. 3, n. 35, p. 14988-14992, 2013.

MATTA, C. F. Quantum Biochemistry. **Wiley-VCH, Germany**, 2010.

- MCEVOY, J. The costs of schizophrenia. **J Clin Psychiatry**, v. 68 Suppl 14:4-7, 2007.
- MELTZER, H. Y. The Role of Serotonin in Antipsychotic Drug Action. **Neuropsychopharmacology**, v. 21, n. 2, Supplement 1, p. 106S-115S, 1999.
- MELTZER, H. Y.; MATSUBARA, S.; LEE, J. C. Classification of typical and atypical antipsychotic drugs on the basis of dopamine D-1, D-2 and serotonin₂ pKi values. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 251, n. 1, p. 238-246, October 1, 1989 1989.
- MELTZER, H. Y.; THOMPSON, P. A.; LEE, M. A.; RANJAN, R. Neuropsychologic deficits in schizophrenia: Relation to social function and effect of antipsychotic drug treatment. **Neuropsychopharmacology**, v. 14, n. 3, Supplement 1, p. 27S-33S, 1996.
- MESSIAS, E. L.; CHEN, C. Y.; EATON, W. W. Epidemiology of schizophrenia: review of findings and myths. **Psychiatr Clin North Am**, v. 30, n. 3, p. 323-38, Sep 2007.
- MEYER-LINDENBERG, A.; MILETICH, R. S.; KOHN, P. D.; ESPOSITO, G.; CARSON, R. E.; QUARANTELLI, M.; WEINBERGER, D. R.; BERMAN, K. F. Reduced prefrontal activity predicts exaggerated striatal dopaminergic function in schizophrenia. **Nat Neurosci**, v. 5, n. 3, p. 267-271, 2002.
- MISSALE, C.; NASH, S. R.; ROBINSON, S. W.; JABER, M.; CARON, M. G. Dopamine Receptors: From Structure to Function. **Physiological Reviews**, v. 78, n. 1, p. 189-225, January 1, 1998 1998.
- MOHAMMAD, M. K.; AL-MASRI, I. M.; TAHA, M. O.; AL-GHUSSEIN, M. A. S.; ALKHATIB, H. S.; NAJJAR, S.; BUSTANJI, Y. Olanzapine inhibits glycogen synthase kinase-3 β : An investigation by docking simulation and experimental validation. **European Journal of Pharmacology**, v. 584, n. 1, p. 185-191, 2008.
- MOREIRA, I.; SHI, L.; FREYBERG, Z.; ERICKSEN, S.; WEINSTEIN, H.; JAVITCH, J. Structural Basis of Dopamine Receptor Activation. In: NEVE, K. A. (Ed.). **The Dopamine Receptors**: Humana Press, 2010. cap. 3, p.47-73. (The Receptors). ISBN 978-1-60327-332-9.
- MUTSCHLER, E.; DERENDORF, H.; SCHAFFER-KORTING, M.; ELROD, K.; ESTER, K. S. Drug actions: basic principles and therapeutic aspects. **Medpharm Scientific Publishers, Stuttgart**, p. 116-125, 1995.
- NEWMAN-TANCREDI, A.; KLEVEN, M. Comparative pharmacology of antipsychotics possessing combined dopamine D2 and serotonin 5-HT_{1A} receptor properties. **Psychopharmacology**, p. 1-23, 2011.
- OBIOL-PARDO, C.; LÓPEZ, L.; PASTOR, M.; SELENT, J. Progress in the structural prediction of G protein-coupled receptors: D3 receptor in complex with eticlopride. **Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics**, v. 79, n. 6, p. 1695-1703, 2011.

- OKADA, O.; ODAI, K.; SUGIMOTO, T.; ITO, E. Molecular dynamics simulations for glutamate-binding and cleft-closing processes of the ligand-binding domain of GluR2. **Biophysical Chemistry**, v. 162, n. 0, p. 35-44, 2012.
- ORTMANN, F.; BECHSTEDT, F.; SCHMIDT, W. G. Semiempirical van der Waals correction to the density functional description of solids and molecular structures. **Physical Review B**, v. 73, n. 20, p. 205101, 2006.
- OSTROWSKI, J.; KJELSBERG, M. A.; CARON, M. G.; LEFKOWITZ, R. J. Mutagenesis of the beta2-Adrenergic Receptor: How Structure Elucidates Function. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 32, n. 1, p. 167-183, 1992.
- PARK, W.-K.; JEONG, D.; YUN, C.-W.; LEE, S.; CHO, H.; KIM, G.-D.; KOH, H. Y.; PAE, A. N.; CHO, Y. S.; CHOI, K. I.; JUNG, J. Y.; JUNG, S. H.; KONG, J. Y. Pharmacological actions of a novel and selective dopamine D3 receptor antagonist, KCH-1110. **Pharmacological Research**, v. 48, n. 6, p. 615-622, 2003.
- PERDEW, J. P.; BURKE, K.; ERNZERHOF, M. Generalized Gradient Approximation Made Simple. **Physical Review Letters**, v. 77, n. 18, p. 3865-3868, 1996.
- PERDEW, J. P.; WANG, Y. Accurate and simple analytic representation of the electron-gas correlation energy. **Physical Review B**, v. 45, n. 23, p. 13244-13249, 1992.
- PILLA, M.; PERACHON, S.; SAUTEL, F.; GARRIDO, F.; MANN, A.; WERMUTH, C. G.; SCHWARTZ, J.-C.; EVERITT, B. J.; SOKOLOFF, P. Selective inhibition of cocaine-seeking behaviour by a partial dopamine D3 receptor agonist. **Nature**, v. 400, n. 6742, p. 371-375, 1999.
- PLATANIA, C. B. M.; SALOMONE, S.; LEGGIO, G. M.; DRAGO, F.; BUCOLO, C. Homology Modeling of Dopamine D₂ and D₃ Receptors: Molecular Dynamics Refinement and Docking Evaluation. **PLoS ONE**, v. 7, n. 9, p. e44316, 2012.
- PRASAD, S. S.; KOJIC, L. Z.; LI, P.; MITCHELL, D. E.; HACHISUKA, A.; SAWADA, J.; GU, Q.; CYNADER, M. S. Gene expression patterns during enhanced periods of visual cortex plasticity. **Neuroscience**, v. 111, n. 1, p. 35-45, 2002.
- RAHA, K., PETERS, M. B., WANG, B., YU, N., WOLLACOTT, A. M., WESTERHOFF, L. M., AND MERZ, K. M., JR. The role of quantum mechanics in structure-based drug design. **Drug Discovery Today**, v. 12, p. 725-731, 2007.
- RASMUSSEN, S. G.; CHOI, H. J.; ROSENBAUM, D. M.; KOBILKA, T. S.; THIAN, F. S.; EDWARDS, P. C.; BURGHAMMER, M.; RATNALA, V. R.; SANISHVILLI, R.; FISCHETTI, R. F.; SCHERTLER, G. F.; WEIS, W. I.; KOBILKA, B. K. Crystal structure of the human beta2 adrenergic G-protein-coupled receptor. **Nature**, v. 450, n. 7168, p. 383-7, Nov 15 2007.
- RECKIEN, W.; JANETZKO, F.; PEINTINGER, M. F.; BREDOW, T. Implementation of empirical dispersion corrections to density functional theory for periodic systems. **Journal of Computational Chemistry**, v. 33, n. 25, p. 2023-2031, 2012.

- RODRIGUES, C. R. F.; OLIVEIRA, J. I. N.; FULCO, U. L.; ALBUQUERQUE, E. L.; MOURA, R. M.; CAETANO, E. W. S.; FREIRE, V. N. Quantum biochemistry study of the T3-785 tropocollagen triple-helical structure. **Chemical Physics Letters**, v. 559, n. 0, p. 88-93, 2013.
- ROSHNI MANGALORE, M. K. Cost of schizophrenia in England. **Journal of Mental Health Policy and Economics**, v. 10, p. 23-41, 2007.
- ROTH, B. L.; SHEFFLER, D. J.; KROEZE, W. K. Magic shotguns versus magic bullets: selectively non-selective drugs for mood disorders and schizophrenia. **Nat Rev Drug Discov**, v. 3, n. 4, p. 353-359, 2004.
- SAFER, D. J. A Comparison of Risperidone-Induced Weight Gain Across the Age Span. **Journal of Clinical Psychopharmacology**, v. 24, n. 4, p. 429-436, 2004.
- SCHOTTE, A.; JANSSEN, P. F. M.; GOMMEREN, W.; LUYTEN, W. H. M. L.; GOMPEL, P.; LESAGE, A. S.; LOORE, K.; LEYSEN, J. E. Risperidone compared with new and reference antipsychotic drugs: in vitro and in vivo receptor binding. **Psychopharmacology**, v. 124, n. 1-2, p. 57-73, 1996/03/01 1996.
- SCOTT, L. J.; DHILLON, S. Risperidone: a review of its use in the treatment of irritability associated with autistic disorder in children and adolescents. **Paediatr Drugs**, v. 9, n. 5, p. 343-54, 2007.
- SEEMAN, P. Antipsychotic drugs, dopamine receptors, and schizophrenia. **Clinical Neuroscience Research**, v. 1, n. 1-2, p. 53-60, 2001.
- _____. Atypical antipsychotics: mechanism of action. **Canadian journal of psychiatry. Revue canadienne de psychiatrie**, v. 47, n. 1, p. 27-38, 2002.
- SEEMAN, P.; LEE, T. Antipsychotic drugs: direct correlation between clinical potency and presynaptic action on dopamine neurons. **Science**, v. 188, n. 4194, p. 1217-1219, June 20, 1975 1975.
- SEEMAN, P.; LEE, T.; CHAU-WONG, M.; WONG, K. Antipsychotic drug doses and neuroleptic/dopamine receptors. **Nature**, v. 261, n. 5562, p. 717-719, 1976.
- SEEMAN, P.; TALLERICO, T. Rapid Release of Antipsychotic Drugs From Dopamine D2 Receptors: An Explanation for Low Receptor Occupancy and Early Clinical Relapse Upon Withdrawal of Clozapine or Quetiapine. **Am J Psychiatry**, v. 156, p. 876-884, 1999.
- SEEMAN, P.; VAN TOL, H. H. M. Dopamine receptor pharmacology. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 15, n. 7, p. 264-270, 1994.
- SEEMAN, P.; WILSON, A.; GMEINER, P.; KAPUR, S. Dopamine D2 and D3 receptors in human putamen, caudate nucleus, and globus pallidus. **Synapse**, v. 60, n. 3, p. 205-211, 2006.

SHARMA, A.; SHAW, S. R. Efficacy of Risperidone in Managing Maladaptive Behaviors for Children With Autistic Spectrum Disorder: A Meta-Analysis. **Journal of Pediatric Health Care**, v. 26, n. 4, p. 291-299, 2012.

SHEA, S.; TURGAY, A.; CARROLL, A.; SCHULZ, M.; ORLIK, H.; SMITH, I.; DUNBAR, F. Risperidone in the Treatment of Disruptive Behavioral Symptoms in Children With Autistic and Other Pervasive Developmental Disorders. **Pediatrics**, v. 114, n. 5, p. e634-e641, November 1, 2004 2004.

SHIMOHAMA, S.; SAWADA, H.; KITAMURA, Y.; TANIGUCHI, T. Disease model: Parkinson's disease. **Trends in Molecular Medicine**, v. 9, n. 8, p. 360-365, 2003.

SIBLEY, D. R.; MONSMA, F. J. Molecular biology of dopamine receptors. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 13, p. 61-69, 1992.

SIKAZWE, D. M. N.; LI, S.; MARDENBOROUGH, L.; CODY, V.; ROTH, B. L.; ABLORDEPPEY, S. Y. Haloperidol: towards further understanding of the structural contributions of its pharmacophoric elements at D2-like receptors. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 14, n. 23, p. 5739-5742, 2004.

SILVA, A. M.; SILVA, B. P.; SALES, F. A. M.; FREIRE, V. N.; MOREIRA, E.; FULCO, U. L.; ALBUQUERQUE, E. L.; MAIA, F. F., JR.; CAETANO, E. W. S. Optical absorption and DFT calculations in L-aspartic acid anhydrous crystals: Charge carrier effective masses point to semiconducting behavior. **Physical Review B**, v. 86, n. 19, p. 195201, 2012.

SILVANO, E.; MILLAN, M. J.; LA COUR, C. M.; HAN, Y.; DUAN, L.; GRIFFIN, S. A.; LUEDTKE, R. R.; ALOISI, G.; ROSSI, M.; ZAZZERONI, F.; JAVITCH, J. A.; MAGGIO, R. The Tetrahydroisoquinoline Derivative SB269,652 Is an Allosteric Antagonist at Dopamine D3 and D2 Receptors. **Molecular Pharmacology**, v. 78, n. 5, p. 925-934, November 1, 2010 2010.

SOKOLOFF, P.; GIROS, B.; MARTRES, M.-P.; BOUTHENET, M.-L.; SCHWARTZ, J.-C. Molecular cloning and characterization of a novel dopamine receptor (D3) as a target for neuroleptics. **Nature**, v. 347, n. 6289, p. 146-151, 1990.

SORIANO-URSÚA, M. A.; OCAMPO-LÓPEZ, J. O.; OCAMPO-MENDOZA, K.; TRUJILLO-FERRARA, J. G.; CORREA-BASURTO, J. Theoretical study of 3-D molecular similarity and ligand binding modes of orthologous human and rat D2 dopamine receptors. **Computers in Biology and Medicine**, v. 41, n. 7, p. 537-545, 2011.

SOUSA, S. F.; FERNANDES, P. A.; RAMOS, M. J. Protein–ligand docking: Current status and future challenges. **Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics**, v. 65, n. 1, p. 15-26, 2006.

STAHL, S. M. Describing an Atypical Antipsychotic: Receptor Binding and Its Role in Pathophysiology. **The Journal of Clinical Psychiatry**, v. 5, n. Suppl 3, p. 9-13, 2003.

STEMP, G.; ASHMEADE, T.; BRANCH, C. L.; HADLEY, M. S.; HUNTER, A. J.; JOHNSON, C. N.; NASH, D. J.; THEWLIS, K. M.; VONG, A. K. K.; AUSTIN, N. E.; JEFFREY, P.; AVENELL, K. Y.; BOYFIELD, I.; HAGAN, J. J.; MIDDLEMISS, D. N.; REAVILL, C.; RILEY, G. J.; ROUTLEDGE, C.; WOOD, M. Design and Synthesis of trans-N-[4-[2-(6-Cyano-1,2,3,4-tetrahydroisoquinolin-2-yl)ethyl]cyclohexyl]-4-quinolinecarboxamide (SB-277011): A Potent and Selective Dopamine D3 Receptor Antagonist with High Oral Bioavailability and CNS Penetration in the Rat. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 43, n. 9, p. 1878-1885, 2000/05/01 2000.

STEPHENS, P. J.; DEVLIN, F. J.; CHABALOWSKI, C. F.; FRISCH, M. J. Ab Initio Calculation of Vibrational Absorption and Circular Dichroism Spectra Using Density Functional Force Fields. **The Journal of Physical Chemistry**, v. 98, n. 45, p. 11623-11627, 1994/11/01 1994.

STRANGE, P. G. Antipsychotic Drugs: Importance of Dopamine Receptors for Mechanisms of Therapeutic Actions and Side Effects. **Pharmacological Reviews**, v. 53, n. 1, p. 119-134, March 1, 2001 2001.

SVENSSON, M.; HUMBEL, S.; FROESE, R. D. J.; MATSUBARA, T.; SIEBER, S.; MOROKUMA, K. ONIOM: A Multilayered Integrated MO + MM Method for Geometry Optimizations and Single Point Energy Predictions. A Test for Diels–Alder Reactions and Pt(P(t-Bu)₃)₂ + H₂ Oxidative Addition. **The Journal of Physical Chemistry**, v. 100, n. 50, p. 19357-19363, 1996/01/01 1996.

TANDON, R.; GAEBEL, W.; BARCH, D. M.; BUSTILLO, J.; GUR, R. E.; HECKERS, S.; MALASPINA, D.; OWEN, M. J.; SCHULTZ, S.; TSUANG, M.; VAN OS, J.; CARPENTER, W. Definition and description of schizophrenia in the DSM-5. **Schizophrenia Research**, v. 150, n. 1, p. 3-10,

TAO, P.; FISHER, J. F.; SHI, Q.; VREVEN, T.; MOBASHERY, S.; SCHLEGEL, H. B. Matrix Metalloproteinase 2 Inhibition: Combined Quantum Mechanics and Molecular Mechanics Studies of the Inhibition Mechanism of (4-Phenoxyphenylsulfonyl)methylthiirane and Its Oxirane Analogue. **Biochemistry**, v. 48, n. 41, p. 9839-9847, 2009/10/20 2009.

TKATCHENKO, A.; SCHEFFLER, M. Accurate Molecular Van Der Waals Interactions from Ground-State Electron Density and Free-Atom Reference Data. **Physical Review Letters**, v. 102, n. 7, p. 073005, 2009.

TSCHAMMER, N.; ELSNER, J.; GOETZ, A.; EHRLICH, K.; SCHUSTER, S.; RUBERG, M.; KÜHHORN, J.; THOMPSON, D.; WHISTLER, J.; HÜBNER, H.; GMEINER, P. Highly Potent 5-Aminotetrahydropyrazolopyridines: Enantioselective Dopamine D₃ Receptor Binding, Functional Selectivity, and Analysis of Receptor–Ligand Interactions. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 54, n. 7, p. 2477-2491, 2011/04/14 2011.

_____. Highly Potent 5-Aminotetrahydropyrazolopyridines: Enantioselective Dopamine D(3) Receptor Binding, Functional Selectivity, and Analysis of Receptor–Ligand Interactions. **Journal of Medicinal Chemistry**, 2011.

- VAN TOL, H. H. M.; BUNZOW, J. R.; GUAN, H.-C.; SUNAHARA, R. K.; SEEMAN, P.; NIZNIK, H. B.; CIVELLI, O. Cloning of the gene for a human dopamine D4 receptor with high affinity for the antipsychotic clozapine. **Nature**, v. 350, n. 6319, p. 610-614, 1991.
- VAN TOL, H. H. M.; WU, C. M.; GUAN, H.-C.; OHARA, K.; BUNZOW, J. R.; CIVELLI, O.; KENNEDY, J.; SEEMAN, P.; NIZNIK, H. B.; JOVANOVIC, V. Multiple dopamine D4 receptor variants in the human population. **Nature**, v. 358, n. 6382, p. 149-152, 1992.
- VERLI, H.; BARREIRO, E. J. Um paradigma da química medicinal: a flexibilidade dos ligantes e receptores. **Química Nova**, v. 28, p. 95-102, 2005.
- VISANJI, N. P.; FOX, S. H.; JOHNSTON, T.; REYES, G.; MILLAN, M. J.; BROTHIE, J. M. Dopamine D3 receptor stimulation underlies the development of L-DOPA-induced dyskinesia in animal models of Parkinson's disease. **Neurobiology of Disease**, v. 35, n. 2, p. 184-192, 2009.
- VISIONGAIN. **Antipsychotic market: insight and analysis**. London, p.99. 2008
- VREVEN, T.; MOROKUMA, K.; FARKAS, Ö.; SCHLEGEL, H. B.; FRISCH, M. J. Geometry optimization with QM/MM, ONIOM, and other combined methods. I. Microiterations and constraints. **Journal of Computational Chemistry**, v. 24, n. 6, p. 760-769, 2003.
- WENTHUR, C. J.; LINDSLEY, C. W. Classics in Chemical Neuroscience: Clozapine. **ACS Chemical Neuroscience**, v. 4, n. 7, p. 1018-1025, 2013/07/17 2013.
- WHO, W. H. O. Nations for Mental Health - Schizophrenia and public health. **Geneva**, 2001.
- YAN, J. Risperidone approved to treat schizophrenia in children. **American Psychiatric News**, v. 42, n. 18, 2007.
- ZAKZANIS, K. K.; HANSEN, K. T. Dopamine D2 densities and the schizophrenic brain. **Schizophrenia Research**, v. 32, n. 3, p. 201-206, 1998.
- ZANATTA, G.; BARROSO-NETO, I. L.; BAMBINI-JUNIOR, V.; DUTRA, M. F.; BEZERRA, E. M.; DA COSTA, R. F.; CAETANO, E. W. S.; CAVADA, B. S.; FREIRE, V. N.; GOTTFRIED, C. Quantum Biochemistry Description of the Human Dopamine D3 Receptor in Complex with the Selective Antagonist Eticlopride. **Proteomics & Bioinformatics**, v. 5, n. 7, p. 155-162, 2012.
- ZANATTA, G.; GOTTFRIED, C.; SILVA, A. M.; CAETANO, E. W. S.; SALES, F. A. M.; FREIRE, V. N. L-asparagine crystals with wide gap semiconductor features: Optical absorption measurements and density functional theory computations. **The Journal of Chemical Physics**, v. 140, n. 12, p. -, 2014.

ZHANG, D. W.; ZHANG, J. Z. H. Molecular fractionation with conjugate caps for full quantum mechanical calculation of protein--molecule interaction energy. **The Journal of Chemical Physics**, v. 119, n. 7, p. 3599-3605, 2003.

ZHAO, Y.; TRUHLAR, D. The M06 suite of density functionals for main group thermochemistry, thermochemical kinetics, noncovalent interactions, excited states, and transition elements: two new functionals and systematic testing of four M06-class functionals and 12 other functionals. **Theoretical Chemistry Accounts**, v. 120, n. 1-3, p. 215-241, 2008/05/01 2008.

ZHOU, T., HUANG, D., AND CAFLISCH, A. Quantum Mechanical Methods for Drug Design. **Current Topics in Medicinal Chemistry** v. 10, p. 33-45, 2010.

Anexos

8. Bioquímica Computacional

8.1. Introdução

A bioquímica computacional abrange um conjunto de ferramentas, que se valem de conhecimentos físicos, químicos, biológicos, matemáticos, estatísticos, e cujo objetivo é simular, avaliar e interpretar informações de sistemas biológicos complexos necessárias para a resolução de problemas bioquímicos. Através de *softwares* que processam cálculos baseados nas equações da física clássica e quântica, busca-se a representação das estruturas moleculares, bem como a simulação de seu comportamento em ambiente fisiológico, de forma a obter-se informações sobre sua geometria (comprimentos de ligação, ângulos de ligação, ângulos de torção), energia (calor de formação, energia de ativação, etc.), propriedades eletrônicas (momento de dipolo, potencial de ionização, afinidade eletrônica), e propriedades espectroscópicas (modos de vibração), entre outras (volume, área de superfície, difusão, viscosidade, etc.).

Uma importante abordagem da bioquímica computacional é o estudo da interação entre proteínas e seus ligantes. Neste sentido, identificar possíveis sítios e quantificar a energia de interação entre fármacos e suas proteínas-alvo, além de determinar orientações e conformações de moléculas de interesse farmacológico são algumas das áreas nas quais a bioquímica computacional pode contribuir para a compreensão de fenômenos biológicos e o planejamento de novos fármacos (VERLI e BARREIRO, 2005). Neste contexto, a análise estrutural permite acelerar o processo de descobrimento de fármacos através da utilização de estruturas tridimensionais obtidas por técnicas de difração de raios-X, RMN ou geradas por modelagem molecular

(BLUNDELL *et al.*, 2006; RAHA, 2007; MATTA, 2010; ZHOU, 2010; HENNIG e SATTLER, 2014; JASKOLSKI *et al.*, 2014).

O método a ser utilizado durante uma análise através da bioquímica computacional dependerá complexidade do sistema biológico (quantidade e tipo de átomos, tipo de ligações envolvidas, etc.), do tipo de informação que se deseja obter, além da avaliação do custo e poder computacional. Quanto maior o rigor teórico, maior a acurácia do resultado e maior o custo computacional. Como consequência, simulações de sistemas contendo um grande número de átomos normalmente empregam métodos clássicos de análise, os quais permitem maior velocidade de cálculo, contudo perdendo em acurácia. Exemplos destas aplicações são encontrados em algoritmos de ancoramento molecular (docking, em inglês), onde a geometria de ligação de peptídeos ou pequenas moléculas em proteínas são obtidas em um curto espaço de tempo (ABAGYAN e TOTROV, 2001; BROOIJMANS e KUNTZ, 2003; SOUSA *et al.*, 2006)(ABAGYAN e TOTROV, 2001; BROOIJMANS e KUNTZ, 2003; SOUSA *et al.*, 2006), e de dinâmica molecular clássica (FENG *et al.*, 2012; OKADA *et al.*, 2012; PLATANIA *et al.*, 2012), onde são realizadas simulações, desde grandes proteínas a pequenas moléculas, em meio líquido explícito durante uma curta fração de tempo. Por outro lado, apesar de limitados a sistemas com reduzido número de átomos (devido, na verdade ao número de elétrons no sistema), os métodos quânticos, por incluírem a informação eletrônica em seus cálculos, possuem a capacidade de apresentar grande acurácia em seus resultados (CHO *et al.*, 2009) e tem sido de grande importância para o desenvolvimento *in silico* de fármacos (RAHA, 2007; BOHÓRQUEZ *et al.*, 2010), além de mostrar-se úteis na estimativa (relativa) das energias de interação/ligação entre proteína e ligantes (CHO *et al.*, 2009; ZHOU, 2010) e na análise estrutural, óptica e

eletrônica de pequenos cristais (SILVA *et al.*, 2012; ZANATTA *et al.*, 2014), entre outras aplicações.

Conforme descrito abaixo, os métodos empregados nas análises computacionais podem ser de três tipos: clássicos, semi-empíricos e quânticos (aqui destaca-se a DFT, por ter sido utilizada neste trabalho). Dentre as técnicas utilizadas neste trabalho algumas valeram-se de métodos clássicos e outras quânticos, sendo elas: ancoramento molecular (*docking*, em inglês), dinâmica molecular e ONIOM.

8.1.1. Métodos Clássicos (Mecânica Molecular)

Os métodos clássicos, também referidos como métodos de mecânica molecular fazem uso de uma expressão algébrica simplificada durante o cálculo das propriedades de um sistema, dispensando o formalismo da mecânica quântica e o cálculo da função de onda ou da densidade total dos elétrons. Este tem sido um dos principais métodos utilizados pelos bioquímicos computacionais devido a sua capacidade de simular grandes moléculas, como proteínas, membrana, DNA, entre outras.

Neste método, a expressão da energia consiste em uma equação clássica, capaz de descrever o sistema em termos de energia associada ao alongamento, flexão e rotação de ligações, e forças intermoleculares, como as interações de van der Waals e ligações de hidrogênio. Para a resolução dessas equações, são utilizadas bases de dados conhecidas como campo de força, cujo conjunto de parâmetros foi obtido através de dados experimentais ou de cálculos *ab initio*. A energia potencial (U) de um sistema, é determinada segundo as equações:

$$U = E_{\text{covalente}} + E_{\text{não-covalente}}$$

$$E_{\text{covalente}} = E_{\text{ligação}} + E_{\text{angular}} + E_{\text{diedral}}$$

$$E_{\text{n\~{a}o-covalente}} = E_{\text{eletrost\~{a}tica}} + E_{\text{van-der-Waals}}$$

Em que $E_{\text{covalente}}$ é a energia envolvida nas ligações covalentes e a formação da estrutura espacial das moléculas, $E_{\text{ligação}}$ é a energia de ligação, E_{angular} é a energia envolvida na definição do ângulo entre três átomos sequenciais, E_{diedral} energia envolvida na formação de diedros, $E_{\text{n\~{a}o-covalente}}$ é a energia de interação intermolecular, $E_{\text{eletrost\~{a}tica}}$ é a energia referente as interação eletrostáticas (entre moléculas polares ou carregadas) e, por fim, $E_{\text{van-der-waals}}$ é a energia de interações de van der Waals (CRAMER, 2010).

Contudo, apesar destes métodos serem úteis para sistemas complexos, calculando geometrias e energias, eles não fornecem informações sobre a estrutura eletrônica das moléculas estudadas, limitando assim a informação obtida.

8.1.2. Métodos Semi-empíricos

Os métodos semi-empíricos foram criados com a mesma estrutura geral dos métodos Hartree Fock (HF). Neles, algumas informações são aproximadas ou completamente omitidas do Hamiltoniano que descreve o sistema, enquanto que algumas parametrizações são feitas para corrigir os erros introduzidos pela omissão de alguns termos, e assim gerar o melhor resultado possível quando comparado com dados experimentais. A vantagem destes métodos é que eles são muito mais rápidos que os cálculos *ab initio*, e se a molécula a ser calculada for semelhante às moléculas da base de dados utilizada para parametrizar o método, os resultados podem ser muito bons. Contudo, se a molécula a ser calculada for significativamente diferente daquelas presentes no conjunto de parametrização, as respostas poderão não ser adequadas. Apesar de terem sido projetados especificamente para a descrição de moléculas

inorgânicas, estes métodos tem sido bem sucedidos também na descrição de moléculas orgânicas.

8.1.3. Métodos de Mecânica Quântica

Também conhecidos como métodos *ab initio* (em latim: “desde o início”), consistem em um grupo de métodos que trabalham sem o uso de parametrizações empíricas e as estruturas moleculares podem ser calculadas usando-se nada além da equação de Schrödinger, os valores das constantes fundamentais e os números atômicos presentes; derivam diretamente dos princípios teóricos. As aproximações geralmente são utilizadas na forma de funcional com a função de obter uma solução aproximada da equação diferencial de Schrödinger, facilitando o cálculo. O método de cálculo *ab initio* mais comum é conhecido como Hartree Fock (HF), o qual fornece uma boa aproximação para a solução da equação de Schrodinger independente do tempo para um sistema de muitos elétrons. Neste método não se considera a repulsão elétron-elétron associada (correlação eletrônica), sendo seu efeito líquido incluído no cálculo como uma interação média do sistema. Também, a função de onda é formada a partir de combinações lineares de orbitais atômicos ou mais frequentemente a partir de combinações lineares de funções de base. Estas aproximações levam a obtenção de energias maiores do que a energia exata, tendendo a reproduzir valores próximos ou superiores a um limite denominado limite Hartree Fock. A resolução de sistemas multi-elétrônicos a partir da equação de Schrödinger consiste, basicamente, em resolver um problema de N partículas em N problemas de uma partícula, resultando em $4N$ equações a serem resolvidas, onde $3N$ se referiam às variáveis espaciais e N , à variável de spin, para o caso não-restrito. Por este motivo, a resolução de problemas através do método de HF possui um alto custo computacional, tornando praticamente proibitiva a análise de grandes sistemas (com grande número de elétrons), tais como proteínas inteiras. Por

outro lado, com o desenvolvimento de métodos baseados na densidade eletrônica, como a Teoria do Funcional da Densidade (DFT) (HOHENBERG e KOHN, 1964; KOHN e SHAM, 1965), associado ao aumento do poder computacional nas últimas décadas, a análise de sistemas biológicos de alta complexidade passou a ser viável pelo emprego de cálculos quânticos, ou pela combinação destes com métodos de mecânica molecular para formar métodos híbridos, conhecidos como Quantum Mechanics/Molecular Mechanics (QM/MM) (VREVEN *et al.*, 2003).

8.1.3.1. Teoria do Funcional da Densidade (DFT)

Através da Teoria do Funcional da Densidade a energia é expressa em termos da densidade total de elétrons, ao invés da função de onda de N-elétrons, que é muito mais complexa. Diferindo de outros métodos, como os semi-empíricos, que tentam se aproximar do método HF, a DFT relaciona-se com a solução exata do problema de muitos elétrons.

Assim, para superar as dificuldades impostas pelo alto custo computacional do emprego de métodos quânticos quando um grande número de elétrons está envolvido é possível descrever um sistema multi-eletrônico em termos de densidade eletrônica $\rho(r)$, a qual depende somente de três coordenadas espaciais para cada elétrons envolvido no cálculo ao invés da função de onda eletrônica (HOHENBERG e KOHN, 1964; KOHN e SHAM, 1965). A energia de troca-correlação é definida a partir de um funcional da densidade eletrônica e geralmente é dividida em dois termos, estando o primeiro (troca) normalmente associado a interações entre elétrons de mesmo spin e o segundo (correlação) associado aos elétrons de spin opostos. Os funcionais de troca-correlação podem ser classificados em funcionais de densidade local (Local Density Approximation, LDA), e funcionais de gradiente generalizado (Generalized Gradient Approximation, GGA), conforme descrito abaixo:

Aproximação da Densidade Local (LDA): Considera a energia de troca-correlação para um sistema de densidade (r) como sendo a energia de troca-correlação para um gás de elétrons uniformes com a mesma densidade, que é conhecida de forma precisa. Presupõe-se que a densidade (r) varia suavemente nas proximidades de r , de forma que a energia de troca-correlação de um elétron em um dado ponto depende da densidade eletrônica nesse ponto e não da densidade eletrônica em todos os pontos do espaço. Infelizmente, em muitos casos envolvendo sistemas biológicos, esse funcional não oferece a precisão desejada, levando a erros de forma não sistemática, por exemplo, no comprimento e nas energias de ligação.

Aproximação do Gradiente Generalizado (GGA): Representa um avanço em relação ao funcional anterior por introduzir a dependência do gradiente da densidade (r) na expressão do funcional. Abaixo estão relacionados alguns funcionais pertencentes a essa classe:

- PBE - baseado nos trabalhos de Perdew, Burke e Erzenhof (PERDEW *et al.*, 1996);
- BLYP - combinação do termo de troca desenvolvido por Becke (BECKE, 1988) com o de correlação, por Lee-Yang-Parr (LEE *et al.*, 1988);
- B3LYP - termo de troca exato desenvolvido por Becke (BECKE, 1993; STEPHENS *et al.*, 1994)
- PW91 - aproximação do gradiente generalizado desenvolvido por Perdew-Wang (PERDEW e WANG, 1992)
- M06-2X – funcional GGA meta-híbrido (ZHAO e TRUHLAR, 2008).

Quando comparado com funcionais LDA, o uso de funcionais GGA apresenta melhoras consideráveis na descrição de ligações (principalmente ligações de

hidrogênio) sem representar em um aumento proibitivo no custo computacional. Contudo, a descrição das ligações fracas (e.g. interações de van der Waals) permanecem problemáticas, sendo necessária a utilização de métodos de correção da dispersão, como o Método TS (TKATCHENKO e SCHEFFLER, 2009), o qual já fazem parte de programas computacionais modernos.

8.1.4. Fracionamento Molecular com *Caps* Conjugados (MFCC)

A técnica de Fracionamento Molecular com *Caps* Conjugados é uma poderosa ferramenta que permite a utilização de cálculos quânticos em sistemas protéicos complexos. Através dela pode-se fracionar o sistema estudado em subsistemas de tamanho menor, conservando as propriedades eletrônicas e estruturais do sistema, os quais podem então ser tratados com métodos quânticos de alta acurácia (ZHANG e ZHANG, 2003; GAO *et al.*, 2004; CHEN *et al.*, 2005; HE e ZHANG, 2005; GORDON *et al.*, 2011). Em nosso grupo, através da combinação deste método com o cálculo quântico no nível de DFT, foi estudado o perfil de interação entre fármacos e distintas proteínas (BARROSO-NETO *et al.*, 2012; DA COSTA *et al.*, 2012; ZANATTA *et al.*, 2012; MARTINS *et al.*, 2013), o perfil de interação entre proteínas, e entre resíduos da mesma proteína (RODRIGUES *et al.*, 2013).

Ao se estudar proteínas através do emprego do MFCC pode-se calcular o perfil de contribuição energética individual de todos os resíduos avaliados. Durante o fracionamento, a fim de garantir as propriedades eletrônicas dos resíduos analisados, os resíduos vizinhos (estes resíduos serão chamados de *caps*) e as respectivas ligações peptídicas são mantidos no sistema (o *cap* anterior será chamado de C_{i-1} , enquanto que o posterior de C_{i+1}), bem como pontes dissulfeto, quando necessário. Durante o

fracionamento, átomos de hidrogênio são adicionados para completar a valência dos átomos envolvidos na quebra da ligação peptídica, nas extremidades dos *caps*.

Um esquema de MFCC utilizando blindagem pode ser visualizado na figura 15, onde são representados o ligante (M), o resíduo de interesse (Ri) e seus *caps* (Ci-1 e Ci+1), e os resíduos de blindagem (Rb) e seus *caps* (Cb-1 e Cb+1). A energia de interação (ligação) EI[M-Ri] é então calculada utilizando-se o nível de teoria DFT (DELLEY, 1990; 2000) em dois passos.

No primeiro, a energia calculada EI[M-RbRi] contém a contribuição tanto do resíduo de interesse (Ri), quanto dos de blindagem (Rb) e é obtida conforme descrito abaixo:

$$EI[M-RbRi]=E[M+Cb-1RbCb+1+Ci-1RiCi+1]-E[Cb-1RbCb+1+Ci-1RiCi+1]-E[M+Cb-1Cb+1+Ci-1Ci+1]+E[Cb-1Cb+1+Ci-1Ci+1].$$

Nesta equação, o termo $E[M+Cb-1RbCb+1+Ci-1RiCi+1]$ representa a energia total do sistema formado pelo ligante, resíduos de interesse, resíduos de blindagem e seus *caps*; o termo $E[Cb-1RbCb+1+Ci-1RiCi+1]$ descreve a energia total do sistema formado pelos resíduos de interesse, resíduos de blindagem e seus *caps*; o terceiro termo $E[M+Cb-1Cb+1+Ci-1Ci+1]$ representa a energia total do sistema formado pelo ligante e somente os *caps* dos resíduos de interesse e de blindagem; enquanto que, o último termo $E[Cb-1Cb+1+Ci-1Ci+1]$ descreve a energia total do sistema formado somente pelos *caps*.

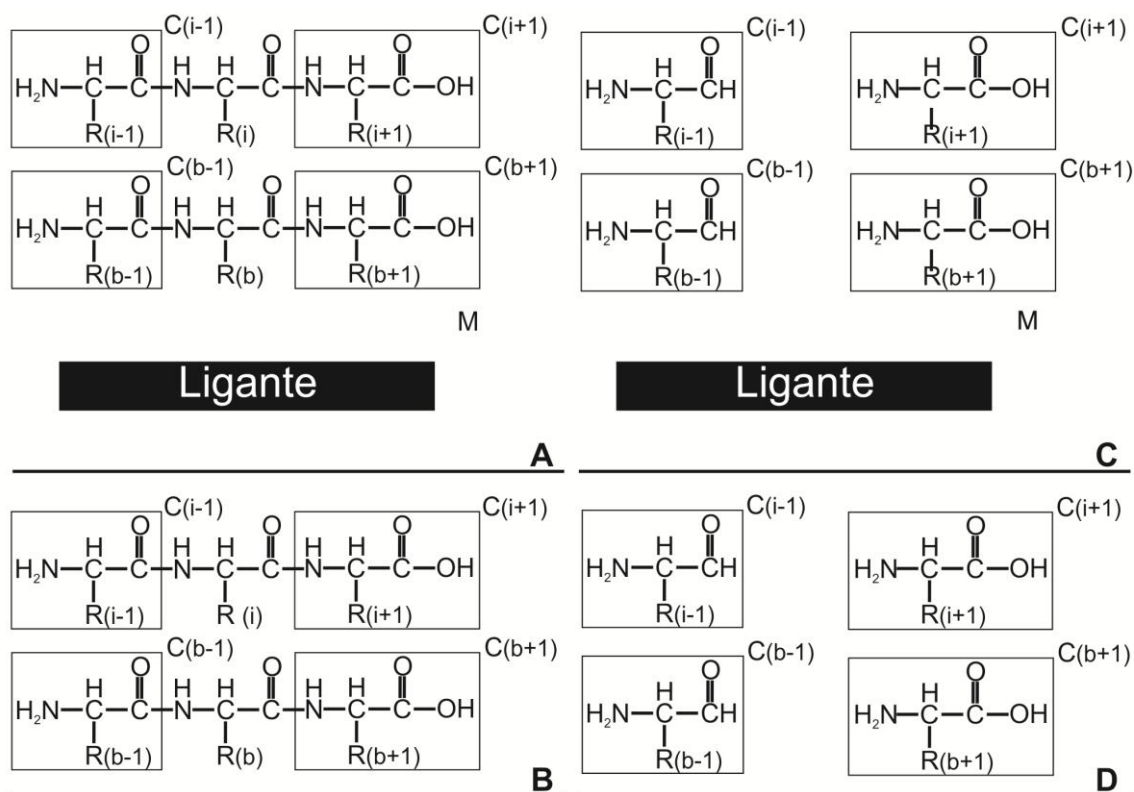


Figura 15: Esquema de MFCC com o efeito de blindagem: (A) Ligante, resíduo de interesse e resíduos de blindagem com seus respectivos caps conjugados; (B) resíduo de interesse e resíduos de blindagem com seus respectivos caps conjugados; (C) Ligante e caps conjugados; (D) caps conjugados. Ligante, resíduos de aminoácidos de interesse, resíduos de blindagem e caps estão representados por M , R_i , R_b e $C_{i,b}$, respectivamente.

No segundo passo, a energia total do sistema devido a presença dos resíduos de blindagem deve ser removida, e para tal, deve ser calculada sem a presença dos resíduos de interesse e seus *caps*. Os resíduos de blindagem consistem em resíduos (R_b) localizados entre o resíduo de interesse (R_i) e o ligante (M). Sua presença interfere na interação final entre R_i - M e por isso a sua contribuição energética não pode ser desprezada. A figura 16 representa um esquema dos fragmentos utilizados durante o cálculo da contribuição energética dos resíduos de blindagem $EI[M-R_b]$, o qual é realizado segundo a fórmula abaixo:

$$EI[M-R_b]=E[M+C_{b-1}R_bC_{b+1}]-E[C_{b-1}R_bC_{b+1}]-E[M+C_{b-1}C_{b+1}]+E[C_{b-1}C_{b+1}]$$

No primeiro termo $E[M+Cb-1RbCb+1]$ a energia total do sistema contendo o ligante, os resíduos de blindagem e seus *caps* é calculada; o segundo termo $E[Cb-1RbCb+1]$ representa a energia de interação entre os resíduos de blindagem e seus *caps*; o terceiro termo $E[M+Cb-1Cb+1]$ obtém a energia total do sistema formado pelo ligante e os *caps*; enquanto que o último termo $E[Cb-1Cb+1]$ representa a energia total do sistema formado pelos *caps*.

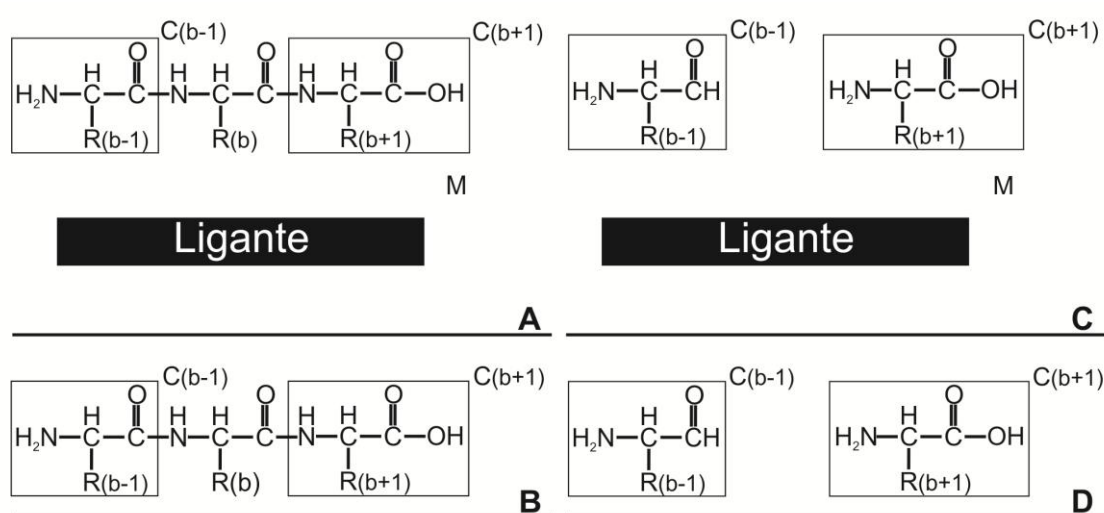


Figura 16: Esquema de MFCC abrangendo somente os resíduos de blindagem: (A) ligante e resíduos de blindagem com caps conjugados; (B) resíduos de blindagem com caps conjugados; (C) ligante e caps conjugados; (D) caps conjugados. Ligante, resíduos de blindagem e caps estão representados por M, Rb e Cb, respectivamente.

Por fim, a energia total de interação $EI[M-Ri]$ entre o resíduo de interesse Ri e o ligante M é obtida pela subtração da energia de interação total do sistema pela energia total de interação dos resíduos de blindagem com o ligante, conforme descrito na fórmula abaixo:

$$EI[M-Ri]=EI[M-RbRi]- EI[M-Rb]$$

8.1.5. Ancoramento Molecular (*Docking*)

Protocolos de ancoramento molecular tem por objetivo a busca rápida pelos possíveis resultados de ligação/interação entre proteínas e peptídeos ou pequenas moléculas com potencial terapêutico (ABAGYAN e TOTROV, 2001). Durante o procedimento utiliza-se estruturas tridimensionais de proteínas, obtidas por técnicas de cristalografia ou mesmo por modelagem baseada em homologia, e ligantes modelados ou obtidos de bibliotecas de compostos. A aplicação desta técnica tem se mostrado útil, por exemplo, na elucidação do modo de ligação de diversos ativadores e inibidores enzimáticos (BROOIJMANS e KUNTZ, 2003), auxiliando na identificação de compostos de interesse farmacológico (DREWS, 2000).

Existem variações nos protocolos de docking mas todos consistem basicamente na combinação de algoritmo de busca e funções de avaliação de energia de ligação e classificação dos resultados. A acurácia deste método fica comprometida devido a necessidade de um processamento veloz (o que permite a análise de grandes bibliotecas) capaz de avaliar todo o espaço conformacional e calcular as energias de interação sem prejudicar o componente termodinâmico na interação fármaco-receptor (SOUSA *et al.*, 2006). Para corrigir possíveis distorções nos cálculos de ancoragem, algumas abordagens de refinamento de resultados tem sido propostas, entre elas, o emprego de métodos quânticos, os quais permitem maior confiabilidade ao processo (CHO *et al.*, 2009).

8.1.6. Dinâmica Molecular

A dinâmica molecular consiste em uma das principais ferramentas para o estudo de grandes sistemas ($\sim 10^{23}$ partículas), onde os efeitos da temperatura não podem ser desconsiderados. Neste método é permitido que os átomos do sistema interajam por

determinado período de tempo e assim gerando uma representação do movimento destas partículas. Durante a dinâmica molecular são empregadas as equações de movimento de Newton, de forma que as forças entre as partículas e a energia potencial são definidas por princípios de mecânica molecular. Assim, as partículas integrantes do sistema movimentam-se sob a influência de potenciais intermoleculares, permitindo a observação da evolução temporal das interações. A grande maioria dos pacotes de dinâmica molecular utiliza métodos clássicos, contudo, algumas abordagens tem surgido nos últimos anos que permitem a implementação do cálculo quântico para a análise de sistemas onde as transições eletrônicas e processos reativos não podem ser desprezados. Contudo, por se tratarem de sistemas com um grande número de átomos, tais abordagens apresentam um alto custo computacional e ainda são pouco utilizadas.

8.1.7. ONIOM

A abordagem conhecida como ONIOM (do inglês, *Own N-layered Integrated Molecular Orbital and Molecular Mechanics*) consiste em um método híbrido do tipo Mecânica Quântica/Mecânica Clássica (QM/MM), no qual o sistema pode ser dividido em n-camadas, e cada uma tratada por um método ou quântico ou clássico (SVENSSON *et al.*, 1996; CHUNG *et al.*, 2012). Comumente, ao utilizar-se somente o método quântico na análise de grandes sistemas como proteínas, determina-se arbitrariamente uma pequena região a ser incluída no cálculo e despreza-se a contribuição do restante da proteína. Contudo, se aplicarmos o método ONIOM, enquanto a parte principal do sistema poderá ser tratada por um método quântico, garantindo a acurácia, o restante receberá um tratamento clássico, e um algoritmo permitirá a troca de informação entre ambas as camadas, permitindo o ajuste de coordenadas no sistema, sem desprezar nenhuma contribuição significativa.

8.1.8. Banco de Dados de Estrutura de Proteínas

O acesso a informações estrutural de proteínas é uma peça chave no estudo de biomacromoléculas e os bancos de dados estruturais são a base desse conhecimento. Dentre os bancos de dados de estruturas tridimensionais de proteínas, o mais conhecido é o *Protein Data Bank* (PDB) (COSSIO *et al.*, 2010), o qual tem como principal propósito armazenar, organizar e distribuir estruturas de macromoléculas. São exemplos de outros bancos de dados de informações estruturais de proteínas: EMBL (banco de dados de estruturas de proteínas localizado na Europa) e o PDBj (banco de dados de estruturas localizado no Japão).

9. Artigo em Outro Tema Desenvolvido durante a Tese

L-asparagine crystals with wide gap semiconductor features: Optical absorption measurements and density functional theory computations.

Publicado em 31 de março de 2014 em The Journal of Chemical Physics

<http://dx.doi.org/10.1063/1.4869179>

L-asparagine crystals with wide gap semiconductor features: Optical absorption measurements and density functional theory computations

G. Zanatta,¹ C. Gottfried,¹ A. M. Silva,² E. W. S. Caetano,^{3,a)} F. A. M. Sales,⁴ and V. N. Freire⁴

¹*Departamento de Bioquímica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 90035-003 Porto Alegre-RS, Brazil*

²*Universidade Estadual do Piauí, 64260-000 Piriapiri-Pi, Brazil*

³*Instituto de Educação, Ciência e Tecnologia do Ceará, 60040-531 Fortaleza-CE, Brazil*

⁴*Departamento de Física, Universidade Federal do Ceará, Caixa Postal 6030, 60455-760 Fortaleza-CE, Brazil*

(Received 14 November 2013; accepted 27 February 2014; published online 31 March 2014)

Results of optical absorption measurements are presented together with calculated structural, electronic, and optical properties for the anhydrous monoclinic L-asparagine crystal. Density functional theory (DFT) within the generalized gradient approximation (GGA) including dispersion effects (TS, Grimme) was employed to perform the calculations. The optical absorption measurements revealed that the anhydrous monoclinic L-asparagine crystal is a wide band gap material with 4.95 eV main gap energy. DFT-GGA+TS simulations, on the other hand, produced structural parameters in very good agreement with X-ray data. The lattice parameter differences Δa , Δb , Δc between theory and experiment were as small as 0.020, 0.051, and 0.022 Å, respectively. The calculated band gap energy is smaller than the experimental data by about 15%, with a 4.23 eV indirect band gap corresponding to $Z \rightarrow \Gamma$ and $Z \rightarrow \beta$ transitions. Three other indirect band gaps of 4.30 eV, 4.32 eV, and 4.36 eV are assigned to $\alpha 3 \rightarrow \Gamma$, $\alpha 1 \rightarrow \Gamma$, and $\alpha 2 \rightarrow \Gamma$ transitions, respectively. Δ -sol computations, on the other hand, predict a main band gap of 5.00 eV, just 50 meV above the experimental value. Electronic wavefunctions mainly originating from O 2*p*-carboxyl, C 2*p*-side chain, and C 2*p*-carboxyl orbitals contribute most significantly to the highest valence and lowest conduction energy bands, respectively. By varying the lattice parameters from their converged equilibrium values, we show that the unit cell is less stiff along the *b* direction than for the *a* and *c* directions. Effective mass calculations suggest that hole transport behavior is more anisotropic than electron transport, but the mass values allow for some charge mobility except along a direction perpendicular to the molecular layers of L-asparagine which form the crystal, so anhydrous monoclinic L-asparagine crystals could behave as wide gap semiconductors. Finally, the calculations point to a high degree of optical anisotropy for the absorption and complex dielectric function, with more structured curves for incident light polarized along the 100 and 101 directions. © 2014 AIP Publishing LLC. [<http://dx.doi.org/10.1063/1.4869179>]

I. INTRODUCTION

Asparagine (Asn, N), with chemical formula $C_4H_8N_2O_3$, is one of the 20 amino acids which form proteins in living beings. It has an essential role on the biosynthesis of glycoproteins and, under physiological conditions, destabilizes and spontaneously deamidates into aspartic acid (Asp), which limits the lifetime of proteins through a degradation process that affects biological functions,^{1,2} leading to diseases (for example, deamidation accelerates amyloid formation³), and deteriorating therapeutic proteins.⁴ The reaction pathways of Asn deamidation were investigated within the density functional theory (DFT) framework, being unveiled their pH-dependent mechanism,⁵ the effect of solvent molecules,⁶ and their role in nonenzymatic peptide bond cleavage at asparagine sites.⁷ Besides, Asn deamidation is a key aspect related to the stability of protein pharmaceuticals⁴ and proteomic sample preparation.⁸ The Asn deamidation reaction path and its multitude of subproducts is related to the ring

formation tendency of the asparagine molecular structure (see top right side and middle of Fig. 1). Thus, it would be very helpful to achieve a deeper understanding of the structural features of asparagine in vacuum, aqueous media, and in the solid state.

A systematic and extensive conformational search has been performed by Chen *et al.*⁹ for gas phase asparagine using the B3LYP/6-311G* functional/basis set combination. By allowing for all combinations of internal single-bond rotamers, they have obtained as much as 972 unique trial structures; after further optimization, a total of 62 conformers were found, with the global energy minimum being stabilized by four hydrogen bonds $COOH \cdots NH_2$, $NH_2 \cdots CO(NH_2)$, $C=O \cdots NH_2$, and $(CO)NH_2 \cdots CO(OH)$, forming a network of intramolecular interactions, as shown at the top and middle of Fig. 1. Recently, a theoretical/experimental matrix-isolation FT-IR study of the conformational behavior and H-bond structure of asparagine was undertaken by Boeckx and Maes,¹⁰ which found ten stable low energy asparagine conformations (total energy variation smaller than 10 kJ mol^{-1}), the most stable containing only 3 intramolecular H-bonds:

^{a)}Electronic mail: ewcaetano@gmail.com

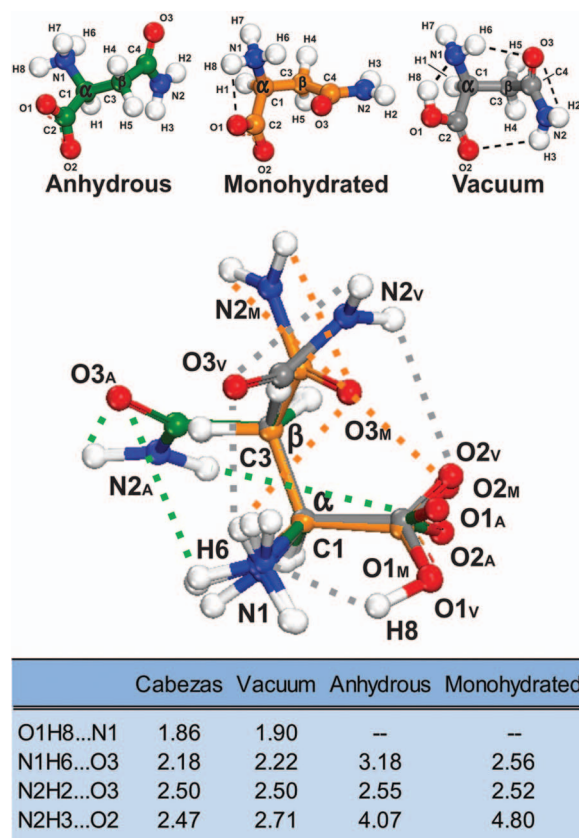


FIG. 1. Top: Asparagine molecules in anhydrous monoclinic (A, green backbone) and monohydrated orthorhombic (M, orange backbone) asparagine crystals, according to the X-ray data of Yamada *et al.*¹³ and Verbist *et al.*,¹⁶ respectively. The DFT-calculated Asn molecular structure in vacuum (V, gray backbone) by Chen *et al.*⁹ is also shown; middle: superposition of the molecular configurations depicted at the top obtained through the alignment of the C_{α} - C_{β} bond; bottom: intramolecular distances (in Å) for the atoms involved in the formation of hydrogen bonds present in the anhydrous and monohydrated Asn crystals, as well as in the vacuum lowest energy conformer. The hydrogen bond lengths obtained by Cabezas *et al.*¹¹ are also shown for the sake of comparison.

$C=O^{sc} \cdots HN^{bb}$, $C=O^{bb} \cdots HN^{sc}$, and $OH^{bb} \cdots N^{bb}$. On the other hand, Cabezas *et al.*¹¹ by employing a combination of laser ablation (LA) with molecular beam (MB) and Fourier transform microwave (FTMW) spectroscopy, together with *ab initio* theoretical computations to predict spectroscopic parameters for direct comparison with the experimental ones, investigated the conformation locking of asparagine, concluding that the lowest energy Asn conformer exists in the gas phase as a result of a network of four cooperative contacts $N_{\alpha} \cdots HO$, $O_{\beta} \cdots H-N_{\alpha}$, $N_{\beta}H \cdots O_{\beta}$, and $O_{\alpha} \cdots HN_{\beta}$ with hydrogen bond lengths of 1.86 Å, 2.18 Å, 2.50 Å, and 2.47 Å, respectively. Such hydrogen bond network was also observed by Chen *et al.*,⁹ as depicted in the top part of Fig. 1, vacuum geometry.

With the purpose of investigating the causes behind such conformational preference of asparagine in the gas phase and the interaction between asparagine and solvent molecules in terms of cage effects, Selvaraj *et al.*¹² carried out classical and Car-Parrinello molecular dynamics simulations to study the solvent effect on the Asn conformational space. A solvent polarization-induced conformational unlocking of asparagine

in aqueous solutions was discerned, as the solvent polarity induced a break up of $NH \cdots O=C$ bonding between the side chain and the terminal groups of asparagine, but without affecting the hydrogen bonds within the side chain and the terminal groups.

In the solid state, intermolecular hydrogen bonds unlock asparagine as well, according to X-ray diffraction data of both anhydrous monoclinic $P2_1$ ($Z = 2$)¹³ and monohydrated orthorhombic $P2_12_12_1$ ($Z = 4$)¹⁴⁻¹⁶ crystalline structures (see again the top and middle parts of Fig. 1). The $N_2H_3 \cdots O_2$ and $N_1H_6 \cdots O_3$ hydrogen bond lengths increase significantly, which implies in an unlocking effect, as one can see at the bottom table of Fig. 1. Actually, the $N_2H_3 \cdots O_2$ ($N_1H_6 \cdots O_3$) hydrogen bond is strongly (moderately) weakened, while the $N_2H_2 \cdots O_3$ is kept by the lattice intermolecular interaction. The molecular unlocking leads to Asn molecular structures in crystals that are remarkably different from those observed in vacuum and water solutions. Consequently, one cannot use the smallest energy isolated conformer (even in solution) to calculate the crystalline properties accurately.

For this reason, efforts to describe theoretically the role of intermolecular bonds on the properties of molecular crystals were made in the last few years.¹⁷⁻²⁴ As members of the class of molecular crystals, anhydrous monoclinic and monohydrated orthorhombic asparagine crystals are stabilized by hydrogen bonds and van der Waals interactions which determine their structural, electronic, optical, and vibrational properties. Research on molecular crystals has been somewhat restricted to experimental characterization of their polymorphs through infrared, Raman, nuclear magnetic resonance (NMR), and electron paramagnetic resonance (EPR) spectroscopies, which are very useful in the pharmaceutical domain, for example. On the theoretical side, the computational cost required to study such systems within the DFT formalism has restrained advances in the field, as stated by Tulip and Clark.¹⁷ Even the numerous spectroscopic measurements on molecular crystals are usually explained by appealing to the properties of the individual molecules, i.e., lattice effects being disregarded. However, the increase of computational power and the development of new DFT codes have allowed the application of these simulation methods to systems with up to hundreds of atoms.¹⁷

As our research group has pointed out in previous works,^{18,19} some attempts to employ amino acid films in biosensors and optoelectronic devices are being made. For example, a study of the adhesion of amino acids on a series of inorganic surfaces including insulators and semiconductors was performed by Willett *et al.*,²⁵ the adsorption footprints of proline on Cu(110) was studied,²⁶ and a reactive dynamics simulation of monolayer and multilayer adsorption of glycine on Cu(110) was carried out;²⁷ the adsorption and ordering of L-tyrosine and L-cysteine on the Ag(111) surface was studied through several techniques by Reichert *et al.*²⁸ and Fischer *et al.*,²⁹ respectively, and the adsorption of glutamic acid on Ag(100) was surveyed by Smerieri *et al.*,³⁰ self-assemblies of D- and L-methionine on Au(111) surfaces were studied by Naitabdi and Humblot,³¹ and the hydrogen-bonded network of histidine on Ge(100) was examined as well.³² On the other hand, Oda and Nakayama^{33,34} have proposed to

control electrically the amino acid ionization and the conformation of proteins arranged on semiconductor surfaces, which might produce new types of biodevices. Besides, Strosio and Dutta³⁵ described advances in man-made nanostructures integrated with biological molecules and systems, their properties, characteristics, and functions. Thus, the understanding of fundamental aspects (electronic and optical characteristics, particularly) of amino acid crystals and films is of paramount importance for the future development of biooptoelectronic devices.

Among the few reports already published concerning the field of amino acid crystal simulations, some of them have presented results suggesting that alanine, leucine, isoleucine, and glycine^{17–19} are wide band gap semiconductors, while valine and cysteine could be small band gap isolators,^{17,20} on the other hand, it was suggested that anhydrous L-aspartic crystals behave as wide-gap semiconductors with higher carrier mobilities for directions parallel to the L-aspartic acid molecular layers,²¹ while anhydrous L-serine crystals behave like n-type wide gap semiconductors.²² Besides, it was also pointed out that anhydrous crystals of DNA bases are wide gap semiconductors.²³ The characterization of the band gap of these molecular materials and their charge transport properties, which depends on their band structures, are relevant for the development of bioorganic electronic and optoelectronic devices,³⁶ as well as bionanoelectronics,³⁷ which could advance the development of sustainable, biodegradable, biocompatible, low-cost, and mass production electronic components.

The purpose of this work is to present the results of DFT calculations of the structural, electronic, and optical properties of anhydrous monoclinic L-asparagine crystals. Optical absorption measurements in these crystals were also performed, from which a wide indirect band gap of 4.95 eV was obtained, which is close to the DFT-estimated 4.23 eV value assigned to $Z \rightarrow \Gamma$ and $Z \rightarrow \beta$ transitions between the uppermost valence band and the lowermost conduction band. Carrier effective masses estimated from parabolic fittings of the band curves indicate that holes in anhydrous monoclinic L-asparagine crystals can behave as in a semiconductor, while the electrons behave as in an insulator. Finally, the calculated optical absorption and dielectric function along some symmetry directions display a noticeable anisotropy for polarized incident light.

II. OPTICAL ABSORPTION MEASUREMENT

Anhydrous monoclinic L-asparagine powder with purity >99% was purchased from Sigma-Aldrich. X-ray diffraction measurements were accomplished to confirm the monoclinic crystal structure (data not presented here). The powder was mixed with KBr to form anhydrous L-Asn-KBr pellets. Light absorption measurements were carried out in these pellets using a Varian Cary 5000 UV-visible NIR spectrophotometer equipped with solid sample holders. The absorption spectra of the samples were recorded in the 200–800 nm wavelength range (6.21–1.55 eV), with background removal and baseline corrections made when necessary.

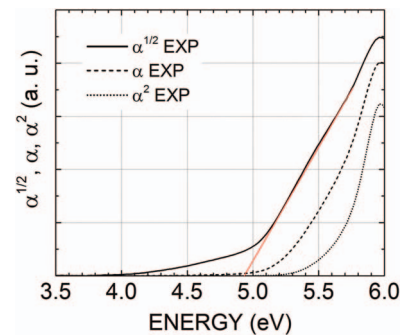


FIG. 2. Optical absorption (α), optical absorption squared (α^2), and square root ($\alpha^{1/2}$) of L-Asn-KBr pellets measured at 300 K with nonpolarized incident radiation. The red straight line is used to estimate the indirect band gap.

The onset of the optical absorption $\alpha(\varepsilon)$ as a function of the incident photon energy ε in an indirect gap crystal varies with ε^2 , while for a direct gap material it increases with $\varepsilon^{1/2}$.^{38,39} Hence, if the square root (square) of the optical absorption displays a linear behavior as a function of the energy, the material must have an indirect (direct) electronic main band gap. With these characteristics in mind and looking now to Fig. 2, one can see plots for $\alpha^{1/2}$, α , and α^2 for the anhydrous L-Asn-KBr pellets. One can observe that α^2 has a curved onset shape beginning at about 5.2 eV, while the α curve onset starts at about 4.5 eV. The curve for $\alpha^{1/2}$, in contrast, exhibits an onset at about 4.0 eV with a smooth linear increase up to 5.0 eV (which we believe is an artifact of the square rooting process, as the optical absorption in this energy range is very small) and a sharp linear increase between 5.0 eV and 5.7 eV. Taking into account these curves, we estimate that the L-Asn crystal has an indirect band gap of 4.95 eV, which corresponds to the energy at the point where the red straight line tangent to the $\alpha^{1/2}$ curve intercepts the energy axis.

As we will see later, a main indirect band gap is also predicted from our DFT computations. Indeed, previous optical absorption measurements in amino acid crystals indicate that these systems tend to exhibit indirect band gaps.^{19–22} A comparison of the energy gap of anhydrous monoclinic L-asparagine crystal with the values obtained for other amino acid crystals shows that it is smaller than the estimated for monoclinic ($P2_1/n$, $Z = 4$) α -glycine crystals, 5.11 eV,¹⁹ and larger than the values for orthorhombic ($P2_12_12_1$, $Z = 4$) L-cysteine crystals, 4.62 eV;²⁰ it is also close to the 5.02 eV gap measured for anhydrous monoclinic ($P2_1$, $Z = 2$)²¹ L-aspartic acid crystals, and much smaller than the 5.90 eV measured gap for anhydrous monoclinic ($P2_12_12_1$, $Z = 4$) L-serine crystals.²² The L-asparagine monoclinic crystal has a wide gap, anyway, but the values of the effective masses of its charge carriers are also necessary to know its charge transport properties (see Sec. V).

III. DFT COMPUTATIONAL DETAILS

The density functional computations were carried out using the CASTEP code.⁴⁰ Lattice parameters and atomic

positions of anhydrous monoclinic L-asparagine crystals as measured by Yamada *et al.*¹³ were used to produce the input unit cell structure, which belongs to the $P2_1$ space group and has $Z = 2$. Experimental lattice parameters are $a = 5.0622(4)$ Å, $b = 6.7001(5)$ Å, $c = 8.0543(5)$ Å, $V = 273.06(3)$ Å³, $\beta = 91.706(5)^\circ$. It was necessary to perform a DFT geometry optimization to evaluate both the unit cell parameters and atomic coordinates for the sake of consistency, and to improve the accuracy of experimental data with respect to the hydrogen atom positioning. For example, in the case of the vaterite CaCO₃ crystal significant differences were observed in the spatial pattern of the carbonate groups inside of the unit cell between experiment and DFT calculations.^{41,42} Besides, an adequate geometry optimization is essential to calculate the vibrational properties, from which one can derive the infrared and Raman spectra which are dependent on the crystal geometry, amino acid side chain type, hydrogen bonding pattern, and van der Waals interactions. Optoelectronic properties are also sensitive to geometry optimization, as the electronic band structure varies appreciably when the lattice parameters and the internal atomic coordinates are changed.

The carbon backbone of the L-asparagine molecules in the crystalline phase is practically planar, with average deviation from planarity being smaller than 0.01 Å. Experimental values for the unit cell parameters from Yamada *et al.*¹³ are given in Table I. The L-asparagine zwitterionic molecule is depicted in Fig. 3(a), while the monoclinic unit cell of anhydrous monoclinic L-asparagine crystals is shown in Fig. 3(b). Parallel layers of L-asparagine molecules form planes along the 101 direction as depicted in Fig. 3(c); adjacent layers interact through hydrogen bonds occurring between charged groups (CO⁻, NH₃⁺, and COO⁻). Within a single layer, the molecules are linked forming zigzag chains created by hydrogen bonds involving the NH₃⁺ group. Finally, intermolecular “tunnels” are present in the L-asparagine lattice structure (see Fig. 3(d)).

The DFT calculations^{43,44} were carried using two distinct approaches for the exchange-correlation functional: the local density approximation (LDA) using the Cerpeley-Alder-

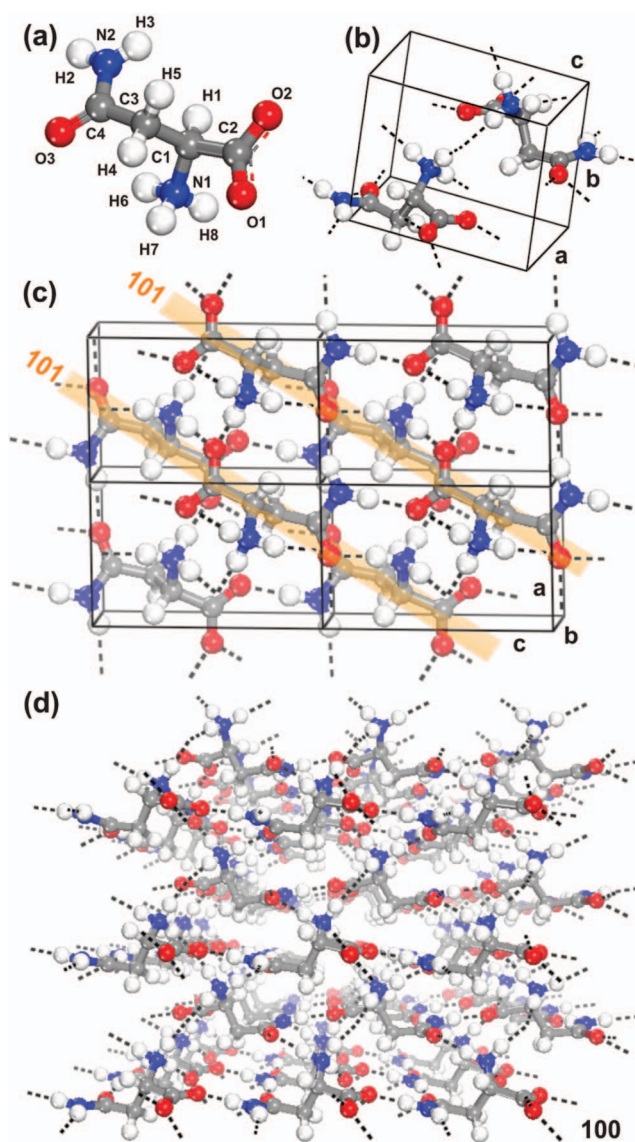


FIG. 3. (a) L-asparagine zwitterionic molecule; (b) anhydrous L-asparagine monoclinic unit cell; (c) view of two superposed 101 (ac) planes of L-asparagine zwitterionic molecules; (d) intermolecular tunnels in anhydrous L-asparagine monoclinic crystals.

TABLE I. Lattice parameters (LP) in (Å), unit cell volume in (Å³), and unit cell angle β (deg) for the anhydrous monoclinic L-asparagine crystal. The LDA and GGA+TS calculation results were obtained using 500, 830, and 1100 eV cutoff energies. Their deviations Δ in comparison with experimental data¹³ are also shown.

LP	L ₅₀₀	L ₈₃₀	GTS ₅₀₀	GTS ₈₃₀	GTS ₁₁₀₀	Exp.
a (Å)	5.222	4.941	5.454	5.082	5.081	5.062
Δa (Å)	0.160	-0.121	0.392	0.020	0.019	...
b (Å)	6.929	6.507	7.144	6.751	6.750	6.700
Δb (Å)	0.229	-0.193	0.444	0.051	0.050	...
c (Å)	7.984	7.883	8.177	8.076	8.074	8.054
Δc (Å)	-0.070	-0.172	0.123	0.022	0.020	...
V (Å ³)	288.7	253.3	318.3	277.0	276.8	273.1
ΔV (Å ³)	15.68	-19.78	45.22	3.980	3.770	...
β (deg)	88.20	92.06	87.30	91.30	91.3	91.71
$\Delta\beta$ (deg)	-3.502	0.349	-4.402	-0.407	-0.420	...

Perdew-Zunger^{45,46} parameters (CAPZ), and the generalized gradient approximation (GGA) employed the Perdew-Burke-Ernzerhof (PBE)⁴⁷ functional. We have also performed GGA-PBE simulations modified with the extra dispersion correction scheme (GGA+TS) proposed by Tkatchenko and Scheffler⁴⁸ and, for the sake of comparison, the GGA-PBE functional including the dispersion semiempirical construct of Grimme.⁴⁹ While the PBE functional leads to results close to the ones obtained by using the PW91 functional,⁵⁰ dispersion corrections avoid the need to use high-level quantum methods to describe van der Waals interactions. Norm-conserving pseudopotentials⁵¹ were used to replace the core electrons in each atomic species, with valence electronic configurations C-2s²2p², N-2s²2p³, and O-2s²2p⁴. Each unit cell has 140 electrons (36 core and 104 valence). A Monkhorst-Pack⁵² 4 × 4 × 4 sampling was employed to evaluate integrals in the reciprocal space, which was more than enough to give a well

converged electronic structure. For the optical properties calculations, this sampling was increased to $10 \times 10 \times 10$, as it is necessary to use more k-points in the Brillouin zone (BZ) when running optical matrix element calculations (the matrix elements are more sensitive to the Brillouin zone sampling than electronic energies).

Lattice parameters, angles, and atomic positions were optimized by searching for a total energy minimum. In order to perform the geometry optimization, the following convergence thresholds were considered along successive self-consistent field computation steps: total energy change smaller than 0.5×10^{-5} eV/atom, maximum force per atom below 0.01 eV/Å, pressure smaller than 0.02 GPa, and maximum atomic displacement below 0.5×10^{-3} Å. The BFGS minimizer⁵³ was employed to carry out the unit cell optimization. In the BFGS scheme, a starting Hessian is recursively updated. Self-consistent field convergence thresholds were: total energy/atom varying by less than 0.5×10^{-6} eV, electronic eigenenergy varying by less than 0.1250×10^{-6} eV at most, with a convergence window of 3 cycles. A plane-wave basis set represents the Kohn-Sham orbitals, with cutoff energies of 500 and 830 eV (500, 830, and 1000 eV) for the LDA (GGA+TS) exchange-correlation functional, with the final value selected after performing a convergence study to ensure the absence of imaginary vibrational frequencies. The quality of this basis set is kept fixed as the unit cell volume evolves during the geometry optimization process.

The Kohn-Sham electronic band structure and the electronic density of states (total and partial per orbital and per atom) were evaluated for both the optimized LDA and GGA+TS crystals (the LDA results are omitted since the GGA+TS ones are considerably better), as well as the dielectric function and optical absorption for polarized light along a set of chosen crystalline planes and in the case of a polycrystalline sample. Effective masses at the extrema of the valence and conduction bands were estimated by quadratic interpolation of the corresponding band curves. It is well known that Kohn-Sham calculations tend to severely underestimate solid state band gaps.⁵⁴ In order to amend for that, we have employed the Δ -sol method proposed by Chan and Ceder,⁵⁵ which extended the Delta self-consistent-field (Δ SCF) approach for molecules to crystals taking into account total energy differences and electronic dielectric screening to obtain much better gap estimates (their proposal achieves a 70% decrease of mean absolute errors in comparison with Kohn-Sham gaps for over 100 compounds) with cheap computational cost. The complex dielectric function $\epsilon(\omega) = \text{Re}(\epsilon) + i \text{Im}(\epsilon)$ and the optical absorption $\alpha(\omega)$ of anhydrous monoclinic L-asparagine crystals were calculated following the same scheme described in a previous work.¹⁹

IV. STRUCTURAL PROPERTIES

A convergence study of the monoclinic L-asparagine unit cell structure was performed by increasing the plane-wave cutoff energy from 500 eV to 830 eV, and then to 1100 eV. The optimized unit cell parameters obtained using the GGA+TS exchange-correlation energy are shown in the columns GTS₅₀₀, GTS₈₃₀, and GTS₁₁₀₀ of Table I, respec-

tively. For the sake of comparison, the results obtained using the LDA exchange-correlation functional for cutoff energies of 500 eV and 830 eV are shown in columns L₅₀₀ and L₈₃₀, respectively, together with the experimental values from Yamada *et al.*¹³ One can observe that the DFT-LDA calculated unit cell parameters at 830 eV ($a = 4.941$ Å, $b = 6.5072$ Å, and $c = 7.883$ Å) are smaller than the X-ray values (see the deviations Δa , Δb , Δc relative to the measurements), which is due to the LDA functional trend to overestimate interatomic forces. Nevertheless, this is also the reason by which the LDA approximation can be useful to study systems where weak intermolecular interactions are relevant.^{23,24,56,57}

In contrast, pure GGA functionals are able to provide a good description of hydrogen bonds, but tend to underestimate the strength of interatomic interactions, and some test simulations we accomplished (not shown here) suggested a lack of accuracy in predicting the structural parameters of L-asparagine crystals. After adding the extra dispersion correction scheme proposed by Tkatchenko and Scheffler⁴⁸ (GGA+TS), however, we have improved the estimated values for the unit cell parameters, compensating for the GGA underbinding effect. From Table I, one can see that the lattice parameters and unit cell volume are remarkably nice for 830 eV, practically remaining the same for the 1100 eV cutoff energy. The deviations relative to the X-ray measurements are nearly 0.02 Å (0.05) for Δa and Δc (Δb), and smaller than 4.0 Å³ for the unit cell volume variation ΔV . Using the Grimme dispersion corrected GGA-PBE functional,⁴⁹ we also obtained good estimates for the lattice parameters, with $a = 5.05$ Å, $b = 6.66$ Å, and $c = 8.03$ Å, with deviations relative to experiment of 0.01 Å (Δa), 0.04 Å (Δb), and 0.02 Å (Δc). The GGA+TS (GGA+Grimme) estimate for the β angle was 91.3° (92.3°), very close to the experimental value (91.71°).

All vibrational normal modes obtained for the crystal geometry with a cutoff energy of 830 eV exhibited positive frequencies, indicating that geometry optimization to a total energy minimum was reached (in a work to be published soon we intend to present the results of the vibrational analysis for the infrared and Raman spectra of asparagine anhydrous crystals). Thus, we have used this cutoff energy to calculate the electronic and optical properties of the anhydrous monoclinic asparagine crystal to avoid extra computational costs. Fractional atomic coordinates, selected bond lengths, bond angles, and torsion angles, as well as hydrogen bond related lengths and angles for the calculated (GGA+TS and LDA) and the experimental data are included in the supplementary material (Tables I–IV),⁵⁸ showing that the GGA+TS results are in better agreement with experiment than those of LDA.

In order to approximately evaluate the stiffness of the anhydrous monoclinic asparagine crystal, the lattice parameters were slightly varied about their converged values. Total energy values $E(\Delta a/a_0)$, $E(\Delta b/b_0)$, and $E(\Delta c/c_0)$ are depicted in Fig. 4, being obtained by performing single point energy calculations after rescaling one lattice parameter and keeping the other two constant as well as the atomic fractional coordinates. One can note that the total energy change for $E(\Delta b/b_0)$ is much smaller than those of $E(\Delta a/a_0)$ and $E(\Delta c/c_0)$, which is probably due to the dominance of intramolecular

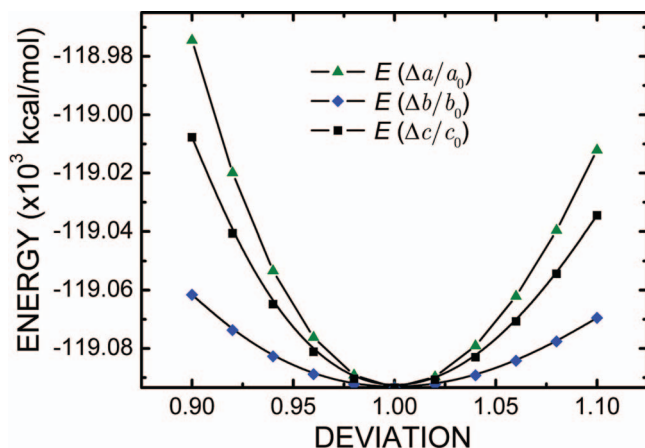


FIG. 4. GGA+TS total energy E of the anhydrous monoclinic L-asparagine crystal unit cell as a function of the lattice parameter relative deviations $\Delta a/a_0$, $\Delta b/b_0$, $\Delta c/c_0$ relative to the optimal parameters a_0 , b_0 , and c_0 , respectively, for a plane-wave cutoff energy of 1100 eV.

covalent bonds disposed along the a and c directions (see Fig. 3(c)), while along b hydrogen bonds and just a few covalent bonds (mainly C1–C3) seem to be deformed in a remarkable way. The arrangement of hydrogen bonds suggest that, if the monoclinic asparagine crystal were dismantled by removing one molecular layer each time, it would be easier to remove molecular planes along the b direction in comparison with planes along a and c .

V. ELECTRONIC PROPERTIES

The Kohn-Sham band structure describes the electron eigenenergies $E_n(\mathbf{k})$ as a function of a set of quantum numbers that form the components of a wave vector $\mathbf{k} = (\mathbf{k}_1, \mathbf{k}_2, \mathbf{k}_3)$ (n is the band number). Usually the first BZ is sampled by calculating these eigenenergies along a path containing a selected set of high-symmetry points. For the anhydrous monoclinic L-asparagine crystal, the path in the BZ used for the band structure computations is shown in Fig. 5. The following set of high-symmetry points of interest was chosen: $\Gamma(0,0,0)$, $Z(0,0,1/2)$, $Y(0,1/2,0)$, $A(-1/2,1/2,0)$, $B(-1/2,0,0)$, $C(0,1/2,1/2)$, $D(-1/2,0,1/2)$, and $E(-1/2,1/2,1/2)$. Other non-symmetry points as $\alpha_1 = (-0.24, 0.00, 0.24)$, $\alpha_2 = (-0.22, 0.22, 0.22)$, $\alpha_3 = (0.00, 0.42, 0.42)$, and $\beta = (-0.10, 0.00, 0.00)$ are also shown. They were included since three (one) valence band maxima (conduction band minimum) occurs at α_i (β), as one can see from the GGA+TS band structure closeup depicted at the bottom part of Fig. 6. The two 101 planes shown in Fig. 3(c) are also displayed in Fig. 5.

The GGA+TS electronic band structure of the anhydrous monoclinic L-asparagine crystal is shown in Fig. 6, together with its associated partial density of states (PDOS, see right side panels). Electron energies were gauged to ensure that the highest energy valence band has its maximum at 0 eV. At the top of Fig. 6, one can see the full energy range of the calculated electron energies, from -22.50 eV to 12.00 eV, with the right panel depicting the contribution from the side chain and carboxyl group to each band. At the bottom, a closeup near the

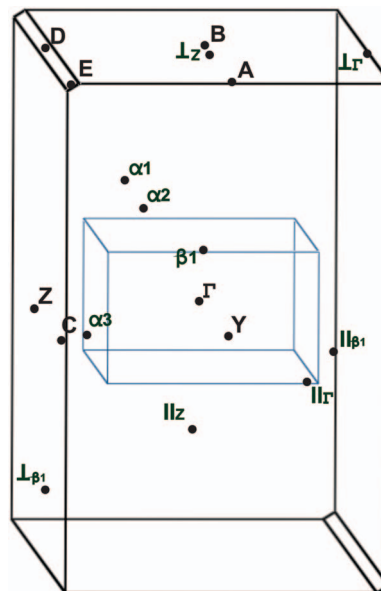


FIG. 5. First Brillouin zone of anhydrous monoclinic asparagine crystals. High symmetry points (latin type, except for Γ) and low symmetry points (greek type symbols, except for Γ) are indicated.

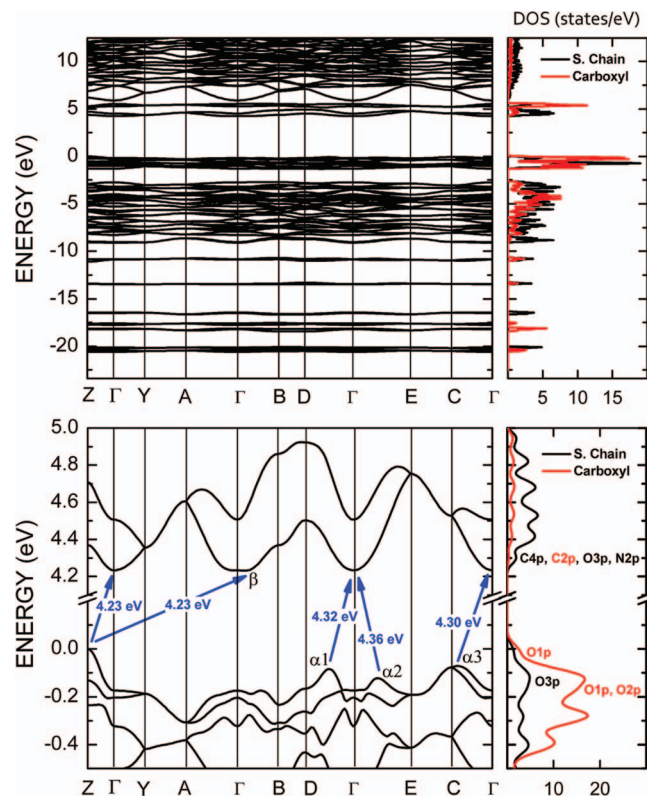


FIG. 6. The GGA+TS calculated band structure of anhydrous monoclinic asparagine crystals. Top: all bands in the -22.5 to 12.5 eV range; bottom: closeup of the band structure around the region of the main energy band gap. The partial density of states displaying the contributions of the side chain (black lines) and carboxyl group (red lines) is shown at the right side panels. The most important atomic orbitals contributing to the highest valence and lowest conduction bands are also specified at some PDOS maxima.

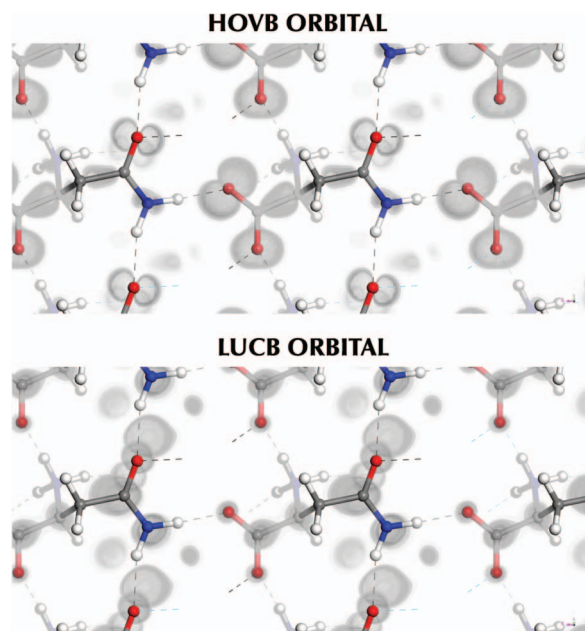


FIG. 7. GGA+TS calculated highest occupied valence band (HOVB) and lowest unoccupied conduction band (LUCB) orbitals.

main band gap reveals the most relevant electronic transitions between the top of the valence band and the bottom of the conduction band, while the partial density of states plot displays the main atomic contributions to each band near the main energy gap. From the band structure curves and DOS plots, we infer that the conduction bands with minima at about 4.30, 5.18, and 6.00 eV are mainly related to C4/O3/N2, C2/O1/O2, and C4/C3/C1 p orbitals, respectively, in decreasing order of contribution.

On the other hand, the highest energy valence bands are within the energy range between -1.22 eV and 0 eV, the two top valence band curves originating mainly from O1/O3/O2 p orbitals. The plots of the highest occupied valence band and the lowest unoccupied conduction band electronic states (HOVB and LUCB orbitals, respectively) shown in Fig. 7 are useful to visualize these contributions. One can see that the HOVB orbital is really p -like and located mainly at the oxygen atoms O1, O2, O3 and along the C1–C2 and C3–C4 bonds (not very pronounced in the PDOS curve), having also small orbital localizations near the N2 and N1 atoms. The LUCB orbital, on the other hand, is mainly localized around the C2, C1, and C4 atoms (sp -like orbital shapes), but also with significant orbital lobes at N2 and O3 (sp -like orbital shapes), and a small contribution from oxygen atoms O1 and O2 (s -like character).

Returning now to the top part of Fig. 6, one can see that, in the -8.30 to -2.35 eV energy range there is a wide set of bands which is due to C3/O3/O1 p orbitals, while near -9.00 eV there are two bands with strong contribution from the side chain; between -20.8 and -11.0 eV there are seven sets of flat bands, with those close to -11.0 eV being due to C3/C1/C4 s and C2/N1/C4 p orbitals. The bands at about -13.4 eV originate from C3/C1/N1 s orbitals, while the bands at -16.50 eV are due to N2/O3/C4 s states. The band sets at -17.7 eV and -18.2 eV, on the other hand, originate

mainly from N1/C1/O1/O2 s orbitals and O2/O1 s and C2 p orbitals, respectively. Finally, the band sets near -20.20 eV and -20.50 eV have strong contributions from O3/C4 s levels and O1/O2/C2 s levels, in this order. Overall, the top valence bands are dominated by p states, while the valence bands with lowest energies are mainly originated from s states. The bottom of the conduction bands is strongly p -like in character, but the band curves above result from the hybridization of s and p states.

The closeup of the GGA+TS calculated Kohn-Sham band structure near the main band gaps (bottom part of Fig. 6) shows five indirect energy gaps. The smallest gap values are both equal to 4.23 eV, corresponding to the valence band-conduction band transitions $Z \rightarrow \Gamma$ and $Z \rightarrow \beta$. Secondary indirect band gaps of 4.30 eV, 4.32 eV, and 4.36 eV are related to the transitions $\alpha 3 \rightarrow \Gamma$, $\alpha 1 \rightarrow \Gamma$, and $\alpha 2 \rightarrow \Gamma$, respectively (the α_i and β points are depicted in the first Brillouin zone shown in Fig. 5). All the GGA+TS estimated indirect band gap energies, which are in the 4.23–4.36 eV range, are well below the experimental gap of 4.95 eV estimated from our optical absorption measurements. This difference was already expected as pure DFT functionals are not able to predict excitation energies.^{59–63} Similar underestimations of the main band gap by DFT computations were previously reported for several molecular crystals, including amino acid^{19–22} and DNA nucleobases²³ crystals. Recently, however, a nonempirical scaling correction method for molecules and solids was proposed to correct this gap error.⁶⁴ After applying the Δ -sol correction,⁵⁵ however, the band gap value we obtained was 5.00 eV, in much better agreement with the experimental estimate from the optical absorption data (only 50 meV larger).

It is interesting to compare the optical absorption estimated gap $E_g^{exp} = 4.95$ eV, as well as the theoretically calculated indirect gap energy $E_g^{GGA+TS}(Z \rightarrow \Gamma, \beta) = 4.23$ eV of the anhydrous monoclinic L-asparagine crystal obtained in this work with similar data for other amino acid crystals. The pioneer work of Tulip and Clark¹⁷ estimated that alanine orthorhombic crystals and leucine, isoleucine, and valine monoclinic crystals have energy gaps $E_g \sim 5.0$ eV, but details about the types of gap (direct or indirect) and the electronic transitions involved were not provided. A DFT simulation study of monoclinic α -glycine crystals¹⁹ revealed the presence of three close indirect energy gaps, with $E_g^{GGA} = 4.95$ eV.¹⁹ On the other hand, both monoclinic and orthorhombic cysteine crystals were predicted to have indirect energy gaps,²⁰ the former with an electronic transition $D \rightarrow E$ corresponding to an energy gap $E_g^{GGA} = 4.06$ eV and a secondary transition $A \rightarrow B$ with $E_g^{GGA} = 4.08$ eV, while the latter has three electronic transitions $Z \rightarrow T$, $T \rightarrow Y$, and $\Gamma \rightarrow Z$ with practically the same energy $E_g^{GGA} = 4.52$ eV. The lowest energy gap of the anhydrous monoclinic L-aspartic acid crystal was estimated to be $E_g^{GGA+TS} = 4.49$ eV,²¹ being assigned to the indirect transition $B \rightarrow \alpha_1$. The energy gap of the anhydrous monoclinic L-serine crystal calculated using the GGA+TS methodology²² was $E_g^{GGA+TS} = 4.75$ eV due to a $S \rightarrow \Gamma$ indirect transition.

The experimental gaps for the following amino acid crystals can be found in the literature from optical absorption measurements: L-alanine orthorhombic, $E_g^{exp} = 5.27$ eV;⁶⁵

leucine, $E_g^{exp} = 5.29$ eV;⁶⁶ valine, $E_g^{exp} = 5.04$ eV;⁶⁷ glycine, 5.11 ± 0.02 eV;¹⁹ cysteine orthorhombic, $E_g^{exp} = 4.68$ eV (the gap of monoclinic cysteine was not measured yet);²⁰ L-aspartic acid monoclinic, $E_g^{exp} = 5.02$ eV;²¹ and L-serine monoclinic, $E_g^{exp} = 5.90$ eV.²² The theoretically calculated energy gaps of these amino acids can be ordered by increasing values (in eV) as follows: Cys (4.06, 4.52) < Asn (4.23) < Asp (4.49) < Ser (4.75) < Gly (4.95) < Ala, Leu, Ile, Val (5.0), while the experimental gaps obey the sequence (energies in eV) Cys (4.68) < Asn (4.95) < Asp (5.02) < Val (5.04) < Gly (5.11) < Ala (5.27) < Leu (5.29) < Ser (5.90). There are two disagreements between these sequences involving the L-serine crystal (largest experimental gap, calculated gap smaller than those for Gly, Ala, Leu, Ile, and Val), followed by valine (experimental gap larger than the gap for Gly, while the theoretical gap is smaller).

With the purpose to better understand the relationship between the band gaps of these amino acid crystals and the electronic structure of each amino acid molecule, we have also performed DFT calculations for the isolated molecules asparagine, aspartic acid, histidine, proline, and tryptophan using the GGA+TS exchange-correlation functional. These molecules were chosen in such a way to produce a sample representing the different types of side chains observed in essential amino acids. Two molecular states were assessed: the neutral state in vacuum and the zwitterionic state in water (except for proline, which has its amine bound to two alkyl groups and does not form a zwitterion when solvated), the latter using a continuous solvation scheme. After carrying out a geometry optimization procedure similar to the one used for the L-asparagine crystal, we have obtained the highest occupied molecular orbital (HOMO) and the lowest unoccupied molecular orbital (LUMO) for each molecular configuration, both shown in Fig. 8. Each optimized geometry has, in general, a set of stabilizing internal hydrogen bonds: asparagine has two, aspartic acid has two in vacuum and one in the zwitterion state, histidine has two, proline has none, and tryptophan has a single internal hydrogen bond.

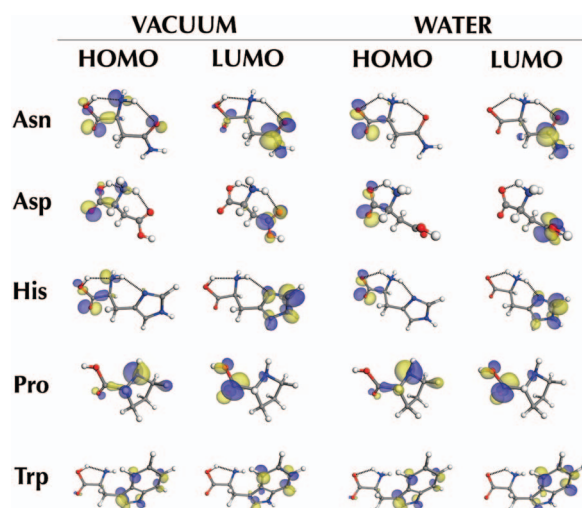


FIG. 8. GGA+TS calculated HOMO and LUMO orbitals for asparagine (Asn), aspartic acid (Asp), histidine (His), proline (Pro), and tryptophan (Trp) in vacuum (left) and solvated in water (right).

The HOMO and LUMO orbitals for asparagine in vacuum are remarkably similar to the HOVB and LUCB orbitals presented in Fig. 7, notwithstanding the fact that the crystal is formed from molecules in the zwitterionic state. This seems to indicate that the insertion of water molecules in the crystalline phase will affect significantly the electronic structure in comparison with the anhydrous crystal. The HOMO and LUMO for zwitterionic aspartic acid differ from the vacuum case mainly by the absence of a significant contribution from the ammonium group (amine protonated) to the HOMO and from the carboxyl group to the LUMO. For the aspartic acid molecule in vacuum, the HOMO orbital is mainly located at the carboxyl group, while the LUMO is concentrated at the side chain. As for the zwitterion aspartic acid (as in the case of asparagine), the ammonium contribution to the HOMO disappears (and the same occurs for histidine), while the carboxyl side chain is twisted relative to the vacuum geometry. Histidine has its two LUMO orbitals (in vacuum and solvated in water) located at its side chain, and its two HOMO orbitals located mainly at the carboxyl and deprotonated carboxyl regions. Proline, on the other hand, barely changes its HOMO and LUMO shapes as we switch from vacuum to water; tryptophan has both its HOMO and LUMO states located at the indole side chain.

The HOMO-LUMO energy gaps calculated for the amino acid molecules in vacuum were, in crescent order: 3.67 eV for tryptophan, 4.03 eV for proline, 4.24 eV for aspartic acid, 4.61 eV for asparagine, and 4.76 eV for histidine. When they are solvated in water, their gap figures change to 3.63 eV for tryptophan, 3.97 eV for proline, 4.33 eV for aspartic acid, 4.55 eV for asparagine, and 5.00 eV for histidine. In the case of tryptophan, which has the smallest band gap, both the HOMO and LUMO orbitals are located at the side chain (Fig. 8), which must, in principle, lead to larger band dispersion in tryptophan crystals. The highest HOMO-LUMO gap for histidine, by the way, seems to be related with the small degree of overlap between the HOMO and LUMO orbitals for this amino acid, which also occurs to asparagine and aspartic acid. Proline, on the other hand, exhibits HOMO and LUMO orbitals with some degree of overlap, leading to the second smallest HOMO-LUMO band gap. Besides, it also has a very small variation in the HOMO-LUMO gap as we switch from vacuum to water, as their frontier orbitals do not change significantly with solvation. It is also worth to note that asparagine and aspartic acid crystals have very close experimental band gaps, while their DFT-calculated estimates predict that aspartic acid crystals have an energy gap 0.26 eV larger than the value for asparagine crystals, a trend which reverses the order of molecular HOMO-LUMO gaps. Thus, as a description based only in the analysis of the isolated molecules is clearly not enough to explain the experimentally observed gap differences, one must conclude that intermolecular interaction effects cannot be ignored in order to explain the electronic properties of amino acid crystals.

Effective masses for electrons and holes can be estimated from band curvatures at valence band maxima and conduction band minima, being useful to estimate the mobility of the charge carriers in a given direction and also to evaluate if the intermolecular interactions in the crystal are strong enough to

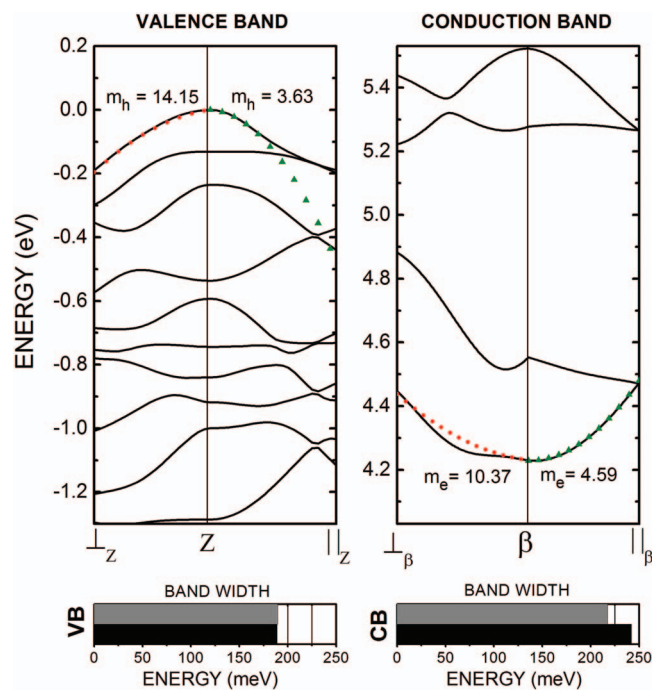


FIG. 9. GGA+TS estimated electron and hole effective masses (in free electron mass units, m_0) for the anhydrous monoclinic asparagine crystal (above), and valence VB and conduction band CB widths (below). The fittings were performed at the valence maximum and conduction band minimum along directions parallel and perpendicular to the molecular layers of asparagine, as shown in Fig. 5. Gray (black) band widths correspond to the band along the parallel (perpendicular) direction.

affect the electronic structure and produce a significant difference with respect to pure molecular states. The effective mass calculation procedure is easy to implement: one must take the inverse of the second derivative of the energy with respect to the wavevector at a critical point in the first Brillouin zone and project it along a chosen path. As a rule of thumb, one can say that the larger (smaller) the band width near the critical point, the smaller (larger) the effective mass will be. For the anhydrous asparagine crystal, we have first evaluated the effective masses for the uppermost valence band, centered at the Z point (hole effective masses) and for the lowermost conduction band, centered at the β point, which is situated along the linear path connecting the Γ and B points (see bottom of Fig. 6). Two directions were selected for each point: parallel (\parallel) and perpendicular (\perp) to the molecular planes of asparagine along the 101 direction (see Fig. 3(c)). The values obtained, together with the band widths in the neighborhood of these points, are shown in Fig. 9. For the perpendicular directions, we see that the hole and electron effective masses are larger than $10 m_0$, where m_0 is the free electron masses, which points to the difficulty of moving the charge carriers from one molecular layer to the next. For electrons, on the other hand, the band curves have larger dispersion, leading to effective masses of about $3.63 m_0$ ($Z - \parallel_Z$) and $4.59 m_0$ ($\beta - \parallel_\beta$), which suggests that a wide gap semiconductor behavior can be achieved for charge carriers moving within these 101 molecular layers. Looking just to the band widths, one cannot predict this result, however, as the bands for both

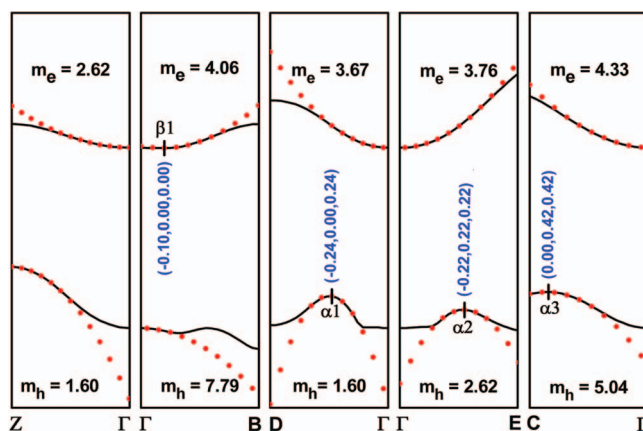


FIG. 10. GGA+TS estimated electron and hole effective masses (free electron mass units) for the anhydrous monoclinic asparagine crystal. Parabolic fittings are also shown.

parallel and perpendicular effective masses have nearly the same range of energy variation.

Figure 10 presents five panels with the uppermost (lowermost) valence (conduction) bands, each one starting or ending at the Γ point along the k -axis, with corresponding hole (electron) effective masses. The valence band maxima α_i and the conduction band minimum β are indicated, and effective masses were obtained for them along a selected set of directions. For holes, there is a very strong anisotropy in effective mass values, ranging from $1.60 m_0$ (along the $Z - \Gamma$ and $D - \alpha_1 - \Gamma$ paths) to $7.79 m_0$ (along $\Gamma - B$). In the case of electrons, however, there is a smaller degree of variation, with the largest effective mass ($4.33 m_0$) being observed at Γ for the $\Gamma - C$ direction and the smallest one ($2.62 m_0$) at Γ along $\Gamma - Z$. Notwithstanding the fact that the calculated effective masses are somewhat large (always larger than the free electron mass), they are always measurable, and some dispersion of the band curves, although not as large as it occurs for covalent inorganic crystals, indicates that the interaction between asparagine molecules in the monoclinic phase is strong enough to allow for the usefulness of the electronic band structure picture.

Additional details on the atomic and functional group contributions to the density of electronic states can be seen in Figs. 11 and 12. The per orbital per atom partial density of states, depicting the relative contributions of all carbon, oxygen, nitrogen, and hydrogen atoms to the total DOS of the anhydrous asparagine crystals is shown in Fig. 11. As one can see from it, O $2p$ gives the most significant contribution to the top of the valence band, while the C $2p$ levels originate most part of the bottom of the conduction band. H $1s$ states, on the other hand, contribute significantly to the conduction bands above 6.2 eV, as well as the C $2s$, C $2p$, and N $2p$ ones. Valence bands between -5.0 eV and -2.4 eV are dominated by C $2p$ states above -3.7 eV and by O $2p$ states below, while the bands between -9.0 eV and -5.0 eV are mainly due to the N $2p$ orbitals.

Looking now to Fig. 12, one can see that the top valence band has a strong contribution from both the oxygens at the carboxyl group and side chain, while the H $1s$

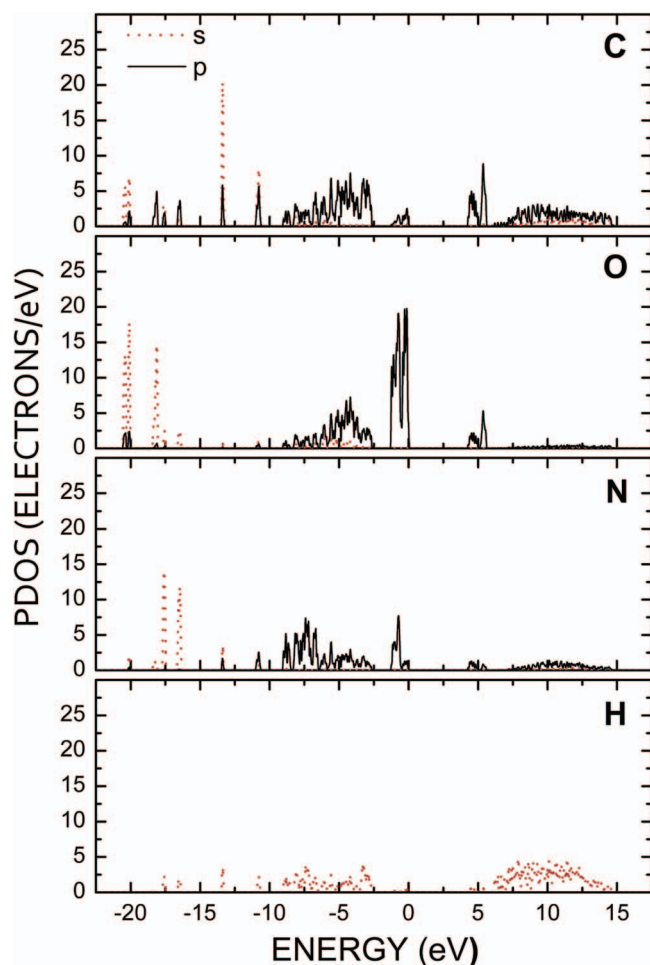


FIG. 11. Anhydrous asparagine monoclinic crystal GGA+TS partial densities of states for C, O, N, and H: *s* (dotted, red) and *p* (solid, black) orbitals.

contribution for the conduction bands above 6.0 eV comes from the side chain, followed by the amine group. The bottom of the conduction band, on the other hand, originates from the carbon atoms at the side chain and, for energies a bit larger (about 5.0 eV), from the carbon atoms at the carboxyl group. A set of O 2*s*, N 2*s*, and H 1*s* deep valence levels can be assigned to the carboxyl group near -20.4 eV and -18.0 eV (mainly oxygen), to the amine group at -17.5 eV (mainly nitrogen), and to the side chain at -20.1 eV (mainly oxygen), -16.4 eV (nitrogen), and -13.3 eV (carbon).

One can infer from these results that the main indirect gap transition occurs between a valence electronic state with localization at the carboxyl and side chain and a conduction state located mostly at the side chain, with a smaller contribution from the carboxyl region, as can also be seen from Fig. 7. More details on the specific contributions of each atom of asparagine can be found in the supplementary material (Figs. 1–8 therein).⁵⁸

Intermolecular interactions, charged states, and charge transfer in amino acid crystals can play a role in the unlocking of amino acid molecules from internal hydrogen bonds. Consequently, it is interesting to estimate how changes in the hydrogen bond patterns can influence the electrical charge of each atom. Among several methods of charge partition-

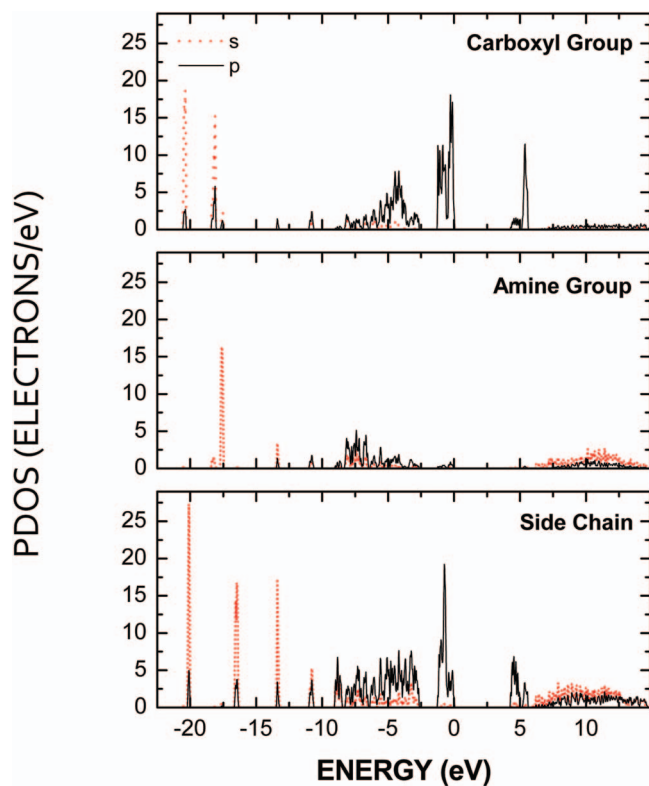


FIG. 12. Anhydrous asparagine monoclinic crystal GGA+TS partial densities of states for the carboxyl, COOH lateral chain, and amine groups: *s* (dotted, red) and *p* (solid, black) orbitals.

ing available in the literature, Hirshfeld population analysis (HPA)⁶⁸ provides one of the most promising approaches, as we have pointed out in another paper.²¹ HPA produces improved Fukui function indices^{69–71} capable of predicting reactivity trends within a molecule better than Mulliken population analysis,⁷² natural bond orbital analysis,⁷³ and fitted electrostatic potentials.⁷⁴ Besides, HPA minimizes the loss of information related to the formation of chemical bonds between atoms in a molecule.^{75,76} However, its values tend to be too small,^{77,78} as Hirshfeld atoms in general resemble the neutral atoms.^{79,80} This limitation, however, can be amended using the iterative Hirshfeld charge technique,⁷⁸ which has been successfully applied to the solid state⁸¹ and the discussion of Fukui functions.⁸²

In Table II, we present the GGA+TS Hirshfeld charges (in units of the fundamental charge *e*) of the individual atoms

TABLE II. Hirshfeld atomic charges (in *e* units) for the L-asparagine molecule in the anhydrous monoclinic Asn crystal as calculated at the GGA+TS level.

Atom	H_{GGA+TS}	Atom	H_{GGA+TS}	Atom	H_{GGA+TS}
C1	0.02	N1	-0.07	H6	0.11
C2	0.16	N2	-0.15	H7	0.10
C3	-0.08	H1	0.03	H8	0.10
C4	0.17	H2	0.09	Carb.	-0.29
O1	-0.23	H3	0.10	Am.	0.24
O2	-0.22	H4	0.04	S.C.	-0.01
O3	-0.22	H5	0.04

and functional groups (carboxyl, amine, side chain) in a single asparagine molecule belonging to the anhydrous Asn monoclinic crystalline phase. They were calculated using the HPA scheme available in the CASTEP code.⁴⁰ One can see that O1, O2, O3 are the most negatively charged atomic species (Hirshfeld charges of -0.23 , -0.22 , and $-0.22 e$, respectively). The N2 nitrogen atom belonging to the side chain is negatively charged ($-0.15 e$), as well as the N1 at the amine group, which exhibits a small negative Hirshfeld atomic charge ($-0.07 e$, like the C3 atom of the side chain, with $-0.08 e$). The carboxyl, amine, and side chain groups have Hirshfeld GGA+TS calculated charges of $-0.29 e$, $0.24 e$, and $-0.01 e$, respectively, which reveals the dipolar character of the zwitterionic L-asparagine molecules in the anhydrous monoclinic crystal.

One can argue that intermolecular interactions involving hydrogen bonds are somehow responsible for the small negative charge of the side chain of L-asparagine molecules in anhydrous monoclinic crystals. As a matter of fact, if we suppose that charged side chains are also present in all amino acid crystals as it occurs for the isolated amino acid species and for polypeptides interacting in aqueous environment, then it seems reasonable to consider that the folded state of proteins (or their structure-activity relationship) is related to charge transfer processes occurring at their side chains, which are affected by the particular combination of hydrogen bonds and van der Waals forces related to their peptidic backbone. Besides, there is a relationship between charge redistribution processes due to intermolecular interactions and the complex pattern of the spatially dependent complex function of proteins.^{83–86} It is not less important to associate changes in the local pK_a of amino acids in proteins to the charge transfer, affected by the hydrogen bond pattern, at their side chains. Within this picture, the crystal field connection with the asparagine hydrogen bond unlocking process (see Fig. 1), together with the charge transfer to the asparagine side chain as obtained by the GGA+TS calculations (see Table II), suggest the important role of hydrogen bonds on the protein folding route and on the inhomogeneous dielectric function. However, further studies are necessary to fully unveil the role of hydrogen bond unlocking in proteins. Under such viewpoint, the study of the structural and electronic properties of amino acid crystals is the first step to be taken.^{18–22}

VI. OPTICAL PROPERTIES

In previous works, the DFT calculated energy band gaps for monoclinic α -glycine¹⁹ and orthorhombic cysteine²⁰ were close to the values obtained from optical absorption measurements. For the α -glycine crystal, we have found $E_{\text{exp}} = 5.11$ eV and an indirect DFT gap $E_{\text{DFT}} = 4.89$ eV, a difference of 0.22 eV (about -4%). For cysteine, $E_{\text{exp}} = 4.68$ eV and the smallest calculated gap was indirect, $E_{\text{DFT}} = 4.52$ eV, the theoretical estimate being smaller than experiment by only 0.16 eV (about -3%). On the other hand, for monoclinic anhydrous L-aspartic acid crystals we have obtained $E_{\text{exp}} = 5.02$ eV and an indirect gap $E_{\text{DFT}} = 4.49$ eV (0.53 eV or -11% smaller than experiment), while for anhydrous monoclinic L-serine crystals, $E_{\text{exp}} = 5.11$ eV, with

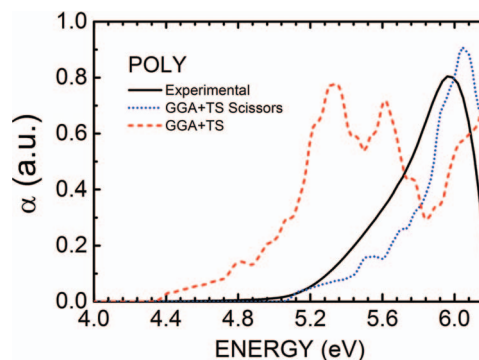


FIG. 13. Comparison between the optical absorption of the anhydrous monoclinic asparagine measured with nonpolarized incident radiation at 300 K (solid line) and the GGA+TS calculated optical absorption for a polycrystalline sample with scissor shift (blue dotted line) and without scissor shift (red dashed line).

DFT predicting a direct gap $E_{\text{DFT}} = 4.74$ eV (0.37 eV or -7% smaller than experiment). Considering that DFT calculations typically underestimate band gaps by 50%, our calculated figures are surprisingly close to the experimental data. For the L-asparagine crystal, this trend is also verified as the optical measurements pointed to a band gap of 4.95 eV while the GGA+TS computations predicted a minimal indirect band gap of 4.23 eV, a difference of 0.72 eV or -15% . Taking into account this difference, we have calculated the optical properties (absorption, dielectric function) for the case of incident light with polarization and for a polycrystalline sample using a scissors operator to shift up the theoretical band gap by 0.72 eV (the shift for the Δ -sol estimate would be almost the same, 0.77 eV). The optical absorption curves with and without the scissor operator in the case of a polycrystal are shown in Fig. 13, together with the experimental result. As one can see, the GGA+TS scissor curve is in good agreement with the measured data.

Figure 14 depicts the optical absorption obtained from the GGA+TS scissors electronic structure in the case of in-

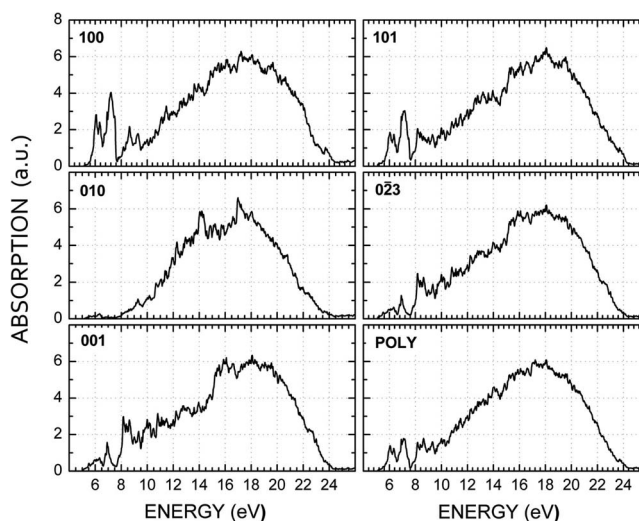


FIG. 14. GGA+TS calculated optical absorption of the anhydrous monoclinic asparagine crystal for light polarized along the directions 100, 010, 001, 101, and 023. The optical absorption for the polycrystal is also shown.

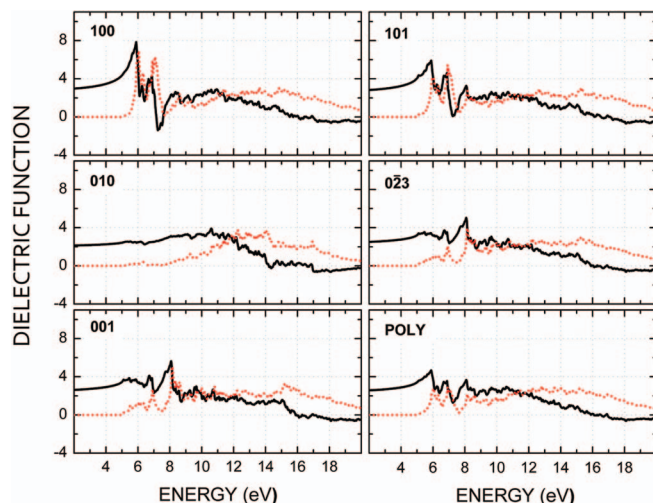


FIG. 15. Real (solid black line) and imaginary (dotted red line) components of the GGA+TS calculated dielectric function of the anhydrous monoclinic asparagine crystal for light polarized along the directions 100, 010, 001, 101, and 023. The dielectric function components for the polycrystal are also shown.

cident light polarized along a chosen set of directions (100, 010, 001, 101, and 023). The absorption curves reveal that anhydrous monoclinic L-asparagine crystals are remarkably anisotropic optically. For example, the optical absorption spectrum for polarization along 100 (which is parallel to the crystalline intramolecular tunnels, see Fig. 3(d)), for energies below 8.0 eV, displays a set of very pronounced peaks at 6.0 eV and 7.1 eV, while for the 001 polarization there is a single absorption peak at nearly 6.9 eV, and for 010 polarization the optical absorption is very small in the same energy range. For the 101 direction, which is parallel to the molecular layers of L-asparagine, the optical absorption for smaller energies resembles the 100 curve with some degree of attenuation. In the case of 023 polarization, which corresponds to the direction of the hydrogen bond $O_2 \cdots N_1 H_7$ between the amine and carboxyl groups of neighbor asparagine molecules inside the unit cell, the absorption curve below 8.0 eV has a pronounced peak at about 7.0 eV and looks very similar to the absorption curve for the 001 polarization.

Finally, in Fig. 15 we see the GGA+TS calculated real and imaginary parts of the dielectric function, $\epsilon(\omega) = \epsilon_1(\omega) + i\epsilon_2(\omega)$, following the same scheme of polarization directions of Fig. 14. The imaginary part ϵ_2 of the dielectric function is proportional to the optical absorption we have discussed in the previous paragraph, so we focus now on the analysis of the real part ϵ_1 . As expected, the real part of dielectric function is very polarization sensitive, as occurred for the optical absorption. The dielectric function curves for the 100 and 101 polarization directions are considerably more structured, with a larger number of pronounced maxima and minima in comparison with the 010 case. For the 100 polarization we have a pronounced maximum for ϵ_1 at 5.9 eV and a secondary maximum at 6.7 eV, followed by a minimum at 7.3 eV. One can note that ϵ_1 becomes negative in the 7.1 eV–7.6 eV energy range, and above 16.0 eV (the negative sign means that the molecular induced dipoles are oscillating out of phase with respect to the electric field). In the case of 010 polar-

ization, ϵ_1 is practically constant (approximately 2.15) in the 2.0–6.5 eV energy range, increases slightly to 3.30 for energies between 6.5 eV and 9.1 eV, and then falls off, becoming negative at 14.3 eV and above 16.9 eV. The real part of the dielectric function for 001 polarization has its main maximum at 8.1 eV, assuming negative values for energies larger than 16.0 eV only. The ϵ_1 curve in the 101 polarization plot has a maximum at 5.9 eV and a minimum at 7.3 eV, as for the 100 case. Finally, for light polarized along 023, ϵ_1 looks very similar to the 001 curve, as well as ϵ_1 for a polycrystalline sample.

VII. CONCLUSIONS

The anhydrous monoclinic L-asparagine crystal was studied in this work as a new contribution to obtain a complete picture of the properties of amino acids in the solid state. The optical absorption of its powder was measured and its structural, electronic, and optical properties were computed using the DFT-GGA+TS dispersion corrected exchange-correlation functional. An indirect band gap of 4.95 eV was estimated from the optical absorption data, suggesting that L-asparagine crystals can behave as a wide band gap semiconductor or insulator depending on the effective mass-related electrical mobility of their charge carriers.

As for the DFT-GGA+TS calculations, a convergence study was carried out to ensure the quality of the geometry optimization procedure. The calculated unit cell parameters showed very small deviations in comparison with X-ray diffraction data: $\Delta a = 0.020 \text{ \AA}$, $\Delta b = 0.051 \text{ \AA}$, $\Delta c = 0.022 \text{ \AA}$, $\Delta \beta = -0.420^\circ$, when a 830 eV cutoff energy for the plane wave basis set was employed. Unit cell parameters calculated using the Grimme dispersion correction scheme were as good as the values obtained using the GGA+TS approach. The unit cell total energy variation as a function of the lattice parameter revealed that the unit cell is less stiff along the *b* direction.

The electronic band structure, partial density of states, carrier effective masses, Hirshfeld charges, and optical properties (absorption and dielectric function) for the L-asparagine crystal were obtained after the unit cell with minimal total energy was achieved. Its electronic band structure exhibited a 4.23 eV indirect band gap for both the $Z \rightarrow \Gamma$, β transitions, and three close indirect band gaps of 4.30 eV ($\alpha_3 \rightarrow \Gamma$), 4.32 eV ($\alpha_1 \rightarrow \Gamma$), and 4.36 eV ($\alpha_2 \rightarrow \Gamma$). After applying the Δ -sol gap correction scheme, the main gap increases to 5.00 eV, almost matching the experimental gap estimate. The O 2*p* carboxyl and the C4 side chain, C2 *p* carboxyl orbitals contributed most significantly to the highest valence and lowest conduction energy bands, in this order. A comparison between the HOMO-LUMO gaps between molecular asparagine and other four amino acids (aspartic acid, histidine, proline, and tryptophan) reinforced the need to take into account intermolecular interactions to describe adequately the observed band gap differences among amino acid crystals. In particular, the HOVB and LUCB orbitals in L-asparagine crystals exhibit a structure which resembles more closely the HOMO and LUMO states of L-asparagine in vacuum than those of L-asparagine in water, notwithstanding the fact that only the water solvated form is zwitterionic as in the crystal.

On the other hand, effective mass values pointed to anisotropic hole effective masses ranging from 1.60 m_0 (at the α_1 point along the D – Γ path) to 14.1 m_0 (at Z along a direction perpendicular to the planes of L-asparagine approximately aligned to the 101 direction) free electron masses. For electrons, the effective mass is more isotropic, varying from 2.62 m_0 (at Γ , along Γ – Z) up to 10.4 m_0 (at β , along the perpendicular to the L-asparagine 101 planes). From the calculated carrier effective masses, it seems that for most directions the anhydrous monoclinic L-asparagine crystals can behave as a semiconductor, the exception being the transport between parallel molecular planes, which has large effective masses and then suggests an insulator character. From the charge population analysis, it was inferred that the O1, O2 (carboxyl), and O3 (side chain) atoms are the most negatively charged, followed by the N2 atom and the C3 atom, while the largest positive charge was observed for the C4 and C2 atoms (side chain and carboxyl groups), followed by H6, H7, H8 (amine group hydrogens), and H3. Finally, the optical properties (absorption and dielectric function) displayed a very strong anisotropy to the incidence of polarized light, with more structured curves for the 100 and 001 polarization directions.

ACKNOWLEDGMENTS

V.N.F. and C.G. are senior researchers from the Brazilian National Research Council (CNPq), and would like to acknowledge the financial support received during the development of this work from the Brazilian Research Agency CNPq-INCT-Nano(Bio)Simes Project No. 573925/2008-9. E.W.S.C. received financial support from CNPq Projects Nos. 304283/2010-0 and 474734/2011-0.

- ¹J. H. McKerrow and A. B. Robinson, *Science* **183**, 85 (1974).
- ²N. E. Robinson and A. B. Robinson, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **98**, 12409 (2001).
- ³E. B. Dunkelberger, L. E. Buchanan, P. Marek, P. Cao, D. P. Raleigh, and M. T. Zanni, *J. Am. Chem. Soc.* **134**, 12658 (2012).
- ⁴M. Manning, D. Chou, B. Murphy, R. Payne, and D. Katayama, *Pharm. Res.* **27**, 544 (2010).
- ⁵B. Peters and B. L. Trout, *Biochemistry* **45**, 5384 (2006).
- ⁶S. Catak, G. Monard, V. Aviyente, and M. F. Ruiz-López, *J. Phys. Chem. A* **110**, 8354 (2006).
- ⁷S. Catak, G. Monard, V. Aviyente, and M. F. Ruiz-López, *J. Phys. Chem. A* **112**, 8752 (2008).
- ⁸P. Hao, Y. Ren, A. J. Alpert, and S. K. Sze, *Mol. Cellular Proteom.* **10**, O111.009381 (2011).
- ⁹M. Chen, Z. Huang, and Z. Lin, *J. Mol. Struct.: THEOCHEM* **719**, 153 (2005).
- ¹⁰B. Boeckx and G. Maes, *Biophys. Chem.* **165–166**, 62 (2012).
- ¹¹C. Cabezas, M. Varela, I. Pena, S. Mata, J. C. Lopez, and J. L. Alonso, *Chem. Commun.* **48**, 5934 (2012).
- ¹²A. R. K. Selvaraj, N. A. Murugan, and H. Ågren, *J. Phys. Chem. A* **116**, 11702 (2012).
- ¹³K. Yamada, D. Hashizume, T. Shimizu, and S. Yokoyama, *Acta Crystallogr. Sec. E* **63**, o3802 (2007).
- ¹⁴G. Kartha and A. De Vries, *Nature (London)* **192**, 862 (1961).
- ¹⁵M. Ramanadham, S. K. Sikka, and R. Chidambaram, *Acta Crystallogr. Sec. B* **28**, 3000 (1972).
- ¹⁶J. J. Verbist, M. S. Lehmann, T. F. Koetzle, and W. C. Hamilton, *Acta Crystallogr. Sec. B* **28**, 3006 (1972).
- ¹⁷P. R. Tulip and S. J. Clark, *Phys. Rev. B* **71**, 195117 (2005).
- ¹⁸E. W. S. Caetano, M. Z. S. Flores, G. A. Bezerra, J. R. Pinheiro, V. N. Freire, G. A. Farias, J. R. L. Fernandez, J. R. Leite, M. C. F. De Oliveira, J. A. Pinheiro, B. S. Cavada, and D. L. De Lima Filho, *AIP Conf. Proc.* **772**, 1095 (2005).
- ¹⁹M. Z. S. Flores, V. N. Freire, R. P. dos Santos, G. A. Farias, E. W. S. Caetano, M. C. F. de Oliveira, J. R. L. Fernandez, L. M. R. Scolfaro, M. J. B. Bezerra, T. M. Oliveira, G. A. Bezerra, B. S. Cavada, and H. W. Leite Alves, *Phys. Rev. B* **77**, 115104 (2008).
- ²⁰J. R. Cândido-Júnior, F. A. M. Sales, S. N. Costa, P. De Lima-Neto, D. L. Azevedo, and E. W. S. Caetano, *Chem. Phys. Lett.* **512**, 208 (2011).
- ²¹A. M. Silva, B. P. Silva, F. A. M. Sales, V. N. Freire, E. Moreira, U. L. Fulco, E. L. Albuquerque, F. F. Maia, and E. W. S. Caetano, *Phys. Rev. B* **86**, 195201 (2012).
- ²²S. N. Costa, F. A. M. Sales, V. N. Freire, F. F. Maia, E. W. S. Caetano, L. O. Ladeira, E. L. Albuquerque, and U. L. Fulco, *Cryst. Growth Des.* **13**, 2793 (2013).
- ²³J. F. F. Maia, V. N. Freire, E. W. S. Caetano, D. L. Azevedo, F. A. M. Sales, and E. L. Albuquerque, *J. Chem. Phys.* **134**, 175101 (2011).
- ²⁴F. Ortman, K. Hannewald, and F. Bechstedt, *J. Phys. Chem. B* **112**, 1540 (2008).
- ²⁵R. L. Willett, K. W. Baldwin, K. W. West, and L. N. Pfeiffer, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **102**, 7817 (2005).
- ²⁶M. Forster, M. S. Dyer, M. Persson, and R. Raval, *J. Am. Chem. Soc.* **131**, 10173 (2009).
- ²⁷S. Monti, C. Li, and V. Carravetta, *J. Phys. Chem. C* **117**, 5221 (2013).
- ²⁸J. Reichert, A. Schiffrin, W. Auwärter, A. Weber-Bargioni, M. Marschall, M. Dell'Angela, D. Cvetko, G. Bavdek, A. Cossaro, A. Morgante, and J. V. Barth, *ACS Nano* **4**, 1218 (2010).
- ²⁹S. Fischer, A. C. Papageorgiou, M. Marschall, J. Reichert, K. Diller, F. Klappenberger, F. Allegretti, A. Nefedov, C. Wöll, and J. V. Barth, *J. Phys. Chem. C* **116**, 20356 (2012).
- ³⁰M. Smerieri, L. Vattuone, T. Kravchuk, D. Costa, and L. Savio, *Langmuir* **27**, 2393 (2011).
- ³¹A. Naitabdi and V. Humblot, *Appl. Phys. Lett.* **97**, 223112 (2010).
- ³²S. J. Jung, D. H. Kim, S. M. Jeon, S. Hong, and S. Kim, *J. Phys. Chem. C* **115**, 4636 (2011).
- ³³M. Oda and T. Nakayama, *Jpn. J. Appl. Phys.* **45**, 8939 (2006).
- ³⁴M. Oda and T. Nakayama, *Appl. Surf. Sci.* **244**, 627 (2005).
- ³⁵M. A. Stroschio and M. Dutta, *Proc. IEEE* **93**, 1772 (2005).
- ³⁶M. Irimia-Vladu, N. S. Sariciftci, and S. Bauer, *J. Mater. Chem.* **21**, 1350 (2011).
- ³⁷V. Parpura, *Nat. Nano* **7**, 143 (2012).
- ³⁸H. Y. Fan, *Rep. Prog. Phys.* **19**, 107 (1956).
- ³⁹A. Fox, *Optical Properties of Solids*, Oxford Master Series in Condensed Matter Physics (Oxford University Press, 2001).
- ⁴⁰D. Segall, P. J. D. Lindan, M. J. Probert, C. J. Pickard, P. J. Hasnip, S. J. Clark, and M. C. Payne, *J. Phys.: Condens. Matter* **14**, 2717 (2002).
- ⁴¹S. K. Medeiros, E. L. Albuquerque, F. F. Maia, Jr., E. W. S. Caetano, and V. N. Freire, *Chem. Phys. Lett.* **435**, 59 (2007).
- ⁴²R. Demichelis, P. Raiteri, J. D. Gale, and R. Dovesi, *CrystEngComm* **14**, 44 (2012).
- ⁴³P. Hohenberg and W. Kohn, *Phys. Rev.* **136**, B864 (1964).
- ⁴⁴W. Kohn and L. J. Sham, *Phys. Rev.* **140**, A1133 (1965).
- ⁴⁵D. M. Ceperley and B. J. Alder, *Phys. Rev. Lett.* **45**, 566 (1980).
- ⁴⁶J. P. Perdew and A. Zunger, *Phys. Rev. B* **23**, 5048 (1981).
- ⁴⁷J. P. Perdew, K. Burke, and M. Ernzerhof, *Phys. Rev. Lett.* **77**, 3865 (1996).
- ⁴⁸A. Tkatchenko and M. Scheffler, *Phys. Rev. Lett.* **102**, 073005 (2009).
- ⁴⁹S. Grimme, *J. Comput. Chem.* **27**, 1787 (2006).
- ⁵⁰J. P. Perdew and Y. Wang, *Phys. Rev. B* **45**, 13244 (1992).
- ⁵¹J. S. Lin, A. Qteish, M. C. Payne, and V. Heine, *Phys. Rev. B* **47**, 4174 (1993).
- ⁵²H. J. Monkhorst and J. D. Pack, *Phys. Rev. B* **13**, 5188 (1976).
- ⁵³B. G. Pfrommer, M. Côté, S. G. Louie, and M. L. Cohen, *J. Comput. Phys.* **131**, 233 (1997).
- ⁵⁴C. S. Wang and W. E. Pickett, *Phys. Rev. Lett.* **51**, 597 (1983).
- ⁵⁵M. K. Y. Chan and G. Ceder, *Phys. Rev. Lett.* **105**, 196403 (2010).
- ⁵⁶F. Ortman, W. G. Schmidt, and F. Bechstedt, *Phys. Rev. Lett.* **95**, 186101 (2005).
- ⁵⁷F. Ortman, F. Bechstedt, and W. G. Schmidt, *Phys. Rev. B* **73**, 205101 (2006).
- ⁵⁸See supplementary material at <http://dx.doi.org/10.1063/1.4869179> for tables depicting the atomic fractional coordinates, bond lengths, torsion angles, and hydrogen bond lengths for L-asparagine crystals in both the LDA and GGA+TS approaches, as well as figures displaying the partial densities of states calculated using the GGA+TS exchange-correlation functional.

- ⁵⁹A. Seidl, A. Görling, P. Vogl, J. A. Majewski, and M. Levy, *Phys. Rev. B* **53**, 3764 (1996).
- ⁶⁰J. P. Perdew and M. Levy, *Phys. Rev. Lett.* **51**, 1884 (1983).
- ⁶¹L. J. Sham and M. Schlüter, *Phys. Rev. B* **32**, 3883 (1985).
- ⁶²L. J. Sham and M. Schlüter, *Phys. Rev. Lett.* **51**, 1888 (1983).
- ⁶³A. J. Cohen, P. Mori-Sánchez, and W. Yang, *Phys. Rev. B* **77**, 115123 (2008).
- ⁶⁴X. Zheng, A. J. Cohen, P. Mori-Sánchez, X. Hu, and W. Yang, *Phys. Rev. Lett.* **107**, 026403 (2011).
- ⁶⁵N. Vijayan, S. Rajasekaran, G. Bhagavannarayana, R. Ramesh Babu, R. Gopalakrishnan, M. Palanichamy, and P. Ramasamy, *Cryst. Growth Des.* **6**, 2441 (2006).
- ⁶⁶S. Adhikari and T. Kar, *Mater. Chem. Phys.* **133**, 1055 (2012).
- ⁶⁷S. Moitra and T. Kar, *Cryst. Res. Technol.* **45**, 70 (2010).
- ⁶⁸F. Hirshfeld, *Theor. Chim. Acta* **44**, 129 (1977).
- ⁶⁹R. Kinkar Roy, K. Hirao, S. Krishnamurty, and S. Pal, *J. Chem. Phys.* **115**, 2901 (2001).
- ⁷⁰R. K. Roy, S. Pal, and K. Hirao, *J. Chem. Phys.* **110**, 8236 (1999).
- ⁷¹R. G. Parr and W. Yang, *J. Am. Chem. Soc.* **106**, 4049 (1984).
- ⁷²R. S. Mulliken, *J. Chem. Phys.* **23**, 1833 (1955).
- ⁷³J. P. Foster and F. Weinhold, *J. Am. Chem. Soc.* **102**, 7211 (1980).
- ⁷⁴R. Bonaccorsi, E. Scrocco, and J. Tomasi, *J. Chem. Phys.* **52**, 5270 (1970).
- ⁷⁵P. W. Ayers, R. C. Morrison, and R. K. Roy, *J. Chem. Phys.* **116**, 8731 (2002).
- ⁷⁶R. F. Nalewajski and R. G. Parr, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **97**, 8879 (2000).
- ⁷⁷E. Davidson and S. Chakravorty, *Theor. Chim. Acta* **83**, 319 (1992).
- ⁷⁸P. Bultinck, C. Van Alsenoy, P. W. Ayers, and R. Carbó-Dorca, *J. Chem. Phys.* **126**, 144111 (2007).
- ⁷⁹P. Ayers, *Theor. Chem. Acc.* **115**, 370 (2006).
- ⁸⁰R. G. Parr, P. W. Ayers, and R. F. Nalewajski, *J. Phys. Chem. A* **109**, 3957 (2005).
- ⁸¹T. Verstraelen, S. V. Sukhomlinov, V. Van Speybroeck, M. Waroquier, and K. S. Smirnov, *J. Phys. Chem. C* **116**, 490 (2012).
- ⁸²P. Bultinck, S. Fias, C. Van Alsenoy, P. W. Ayers, and R. Carbó-Dorca, *J. Chem. Phys.* **127**, 034102 (2007).
- ⁸³W. C. Guest, N. R. Cashman, and S. S. Plotkin, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **13**, 6286 (2011).
- ⁸⁴G. N. Patargias, S. A. Harris, and J. H. Harding, *J. Chem. Phys.* **132**, 235103 (2010).
- ⁸⁵A. V. Morozov, T. Kortemme, and D. Baker, *J. Phys. Chem. B* **107**, 2075 (2003).
- ⁸⁶X. Song, *J. Chem. Phys.* **116**, 9359 (2002).

L-asparagine Crystals with Wide Gap Semiconductor Features: Optical Absorption Measurements and Density Functional Theory Computations

SUPPLEMENTARY MATERIAL

G. Zanatta, C. Gottfried

Departamento de Bioquímica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 90035-003 Porto Alegre-RS, Brazil

A. M. Silva

Universidade Estadual do Piauí, 64260-000 Piri-piri-Pi, Brazil

E. W. S. Caetano

Instituto de Educação, Ciência e Tecnologia do Ceará, 60040-531 Fortaleza-CE, Brazil

F. A. M. Sales, V. N. Freire

*Departamento de Física, Universidade Federal do Ceará,
Caixa Postal 6030, 60455-760 Fortaleza-CE, Brazil*

PACS numbers:

Electronic Density of States plots and tables presenting the fractional atomic coordinates, some selected bond lengths, bond angles and torsion angles, as well as hydrogen bond related lengths and angles for the calculated (GGA+TS and LDA) and the experimental data for L-asparagine crystals are included here as supporting information.

TABLE I: Atomic fractional coordinates (x,y,z) obtained using the GGA+TS, LDA exchange-correlation functional and a plane wave basis cutoff energy of 830 eV for the L-asparagine crystal. The experimental values of Yamada *et al.* [1] are also shown for comparison.

Atom	GGA+TS			LDA			EXP		
	x	y	z	x	y	z	x	y	z
C1	0.1697	0.2064	0.3074	0.1723	0.2083	0.3072	0.1734	0.2065	0.3083
C2	0.0514	0.1613	0.4779	0.0586	0.1670	0.4805	0.0645	0.1617	0.4803
C3	0.2546	0.0127	0.2228	0.2558	0.0066	0.2262	0.2553	0.0114	0.2244
C4	0.3139	0.0403	0.0405	0.3159	0.0351	0.0425	0.3218	0.0440	0.0438
H1	0.0168	0.2793	0.2315	0.0104	0.2805	0.2275	0.0340	0.2730	0.2370
H2	0.1343	0.1070	-0.1862	0.1385	0.1079	-0.1921	0.1510	0.1120	-0.1710
H3	-0.0821	0.0710	-0.0182	-0.0904	0.0658	-0.0200	-0.0510	0.0790	-0.0220
H4	0.4279	-0.0514	0.2858	0.4350	-0.0595	0.2938	0.4200	-0.0490	0.2830
H5	0.0908	-0.0925	0.2334	0.0853	-0.1025	0.2365	0.1020	-0.0840	0.2310
H6	0.3367	0.4702	0.4003	0.3434	0.4808	0.3981	0.3530	0.4510	0.3910
H7	0.5606	0.2798	0.3792	0.5745	0.2794	0.3781	0.5630	0.2870	0.3800
H8	0.4404	0.4105	0.2098	0.4428	0.4169	0.2002	0.4580	0.3930	0.2120
N1	0.3943	0.3492	0.3249	0.4009	0.3530	0.3210	0.4009	0.3459	0.3248
N2	0.1061	0.0760	-0.0614	0.1057	0.0720	-0.0632	0.1172	0.0801	-0.0601
O1	0.2042	0.1483	0.6014	0.2183	0.1570	0.6062	0.2240	0.1487	0.5998
O2	-0.1969	0.1362	0.4757	-0.1950	0.1407	0.4812	-0.1823	0.1359	0.4823
O3	0.5445	0.0303	-0.0109	0.5533	0.0257	-0.0077	0.5526	0.0384	-0.0034

TABLE II: L-asparagine crystal bond lengths (BLs) and angles (ANGs) in the unit cell: GGA+TS, LDA calculated and experimental values of Yamada *et al.* [1].

Fragment	GGA+TS			LDA			EXP		
	BL (Å)		ANG (deg)	BL (Å)		ANG (deg)	BL (Å)		ANG (deg)
ABC	A-B	B-C	A-B-C	A-B	B-C	A-B-C	A-B	B-C	A-B-C
H6N1H8	1.06	1.05	105.92	1.07	1.07	105.50	0.92	1.01	111.63
H6N1H7	1.06	1.05	109.39	1.07	1.07	109.50	0.92	1.00	105.72
H6N1C1	1.06	1.50	109.21	1.07	1.47	108.64	0.92	1.49	108.43
H8N1H7	1.05	1.05	110.56	1.07	1.07	111.87	1.01	1.00	105.60
H8N1C1	1.05	1.50	110.80	1.07	1.47	110.86	1.00	1.49	114.48
H7N1C1	1.05	1.50	110.80	1.07	1.47	110.31	1.00	1.49	114.48
H2N2H3	1.04	1.03	118.99	1.06	1.04	119.96	0.94	0.91	121.28
H2N2C4	1.04	1.35	120.27	1.06	1.33	119.80	0.94	1.33	118.54
H3N2C4	1.03	1.35	120.73	1.04	1.33	120.24	0.91	1.33	120.12
N1C1H1	1.50	1.10	107.02	1.47	1.10	107.97	1.49	1.00	107.63
N1C1C2	1.50	1.55	110.73	1.47	1.52	110.73	1.49	1.54	109.89
N1C1C3	1.50	1.54	111.55	1.47	1.52	111.34	1.49	1.53	110.87
H1C1C2	1.10	1.55	107.58	1.10	1.52	107.63	1.00	1.54	109.79
H1C1C3	1.10	1.54	109.57	1.10	1.52	109.26	1.00	1.53	108.76
C2C1C3	1.55	1.54	110.25	1.52	1.52	109.81	1.54	1.53	109.86
O1C2O2	1.25	1.27	126.74	1.25	1.26	126.04	1.24	1.26	127.00
O1C2C1	1.25	1.55	118.43	1.25	1.52	118.68	1.24	1.54	118.07
O2C2C1	1.27	1.55	114.51	1.26	1.52	115.25	1.26	1.54	114.89
C1C3H4	1.54	1.10	111.05	1.52	1.10	110.99	1.53	1.03	111.04
C1C3H5	1.54	1.10	107.08	1.52	1.11	107.69	1.53	1.01	107.37
C1C3C4	1.54	1.52	112.86	1.52	1.50	111.36	1.53	1.52	111.71
H4C3H5	1.10	1.10	108.13	1.10	1.11	108.30	1.03	1.01	109.94
H4C3C4	1.10	1.52	108.83	1.10	1.50	109.33	1.03	1.52	107.24
H5C3C4	1.10	1.52	108.74	1.11	1.50	109.09	1.01	1.52	109.95
C3C4N2	1.52	1.35	116.35	1.50	1.33	116.73	1.52	1.33	115.90
C3C4O3	1.52	1.25	121.39	1.50	1.25	121.26	1.52	1.24	121.82
N2C4O3	1.35	1.25	122.25	1.33	1.25	122.00	1.33	1.24	122.28

TABLE III: L-asparagine crystal torsion angles (in degrees): GGA+TS, LDA calculated and experimental values of Yamada *et al.* [1].

TORSION ANG	GGA+TS	LDA	EXP
N1-C1-C2-O1	-37.143	-36.690	-36.1 (2)
C3-C1-C2-O1	86.795	86.665	86.1 (2)
N1-C1-C2-O2	144.536	145.038	145.97 (16)
C3-C1-C2-O2	-91.526	-91.607	-91.81 (18)
N1-C1-C3-C4	-69.673	-68.514	-67.71 (17)
C2-C1-C3-C4	166.865	168.490	170.64 (14)
C1-C3-C4-O3	109.530	108.777	107.35 (19)
C1-C3-C4-N2	-70.397	-70.763	-72.2 (2)

TABLE IV: L-asparagine crystal hydrogen bond related lengths (in Å) and angles (ANGs, in degrees) in the unit cell: GGA+TS, LDA calculated and experimental values of Yamada *et al.* [1].

Hydrogen Bonds N-H ...O	N-H			H ...O			N—O			ANG		
	GGA+TS			GGA+TS			GGA+TS			GGA+TS		
N1-H6 ...O2	1.064	1.074	0.92 (4)	1.672	1.604	1.83 (4)	2.725	2.661	2.741 (2)	169.593	166.643	167 (3)
N1-H7 ...O2	1.053	1.068	1.00 (3)	1.739	1.645	1.82 (3)	2.785	2.704	2.807 (2)	171.387	170.374	169 (3)
N1-H8 ...O3	1.049	1.067	1.01 (3)	1.801	1.675	1.94 (3)	2.839	2.730	2.908 (2)	169.169	169.373	159 (3)
N2-H2 ...O1	1.042	1.060	0.94 (3)	1.782	1.683	1.91 (3)	2.823	2.741	2.8456 (19)	175.644	174.982	174 (3)
N2-H3 ...O3	1.026	1.039	0.92 (3)	1.920	1.786	2.03 (3)	2.909	2.796	2.921 (2)	160.907	162.876	163 (2)

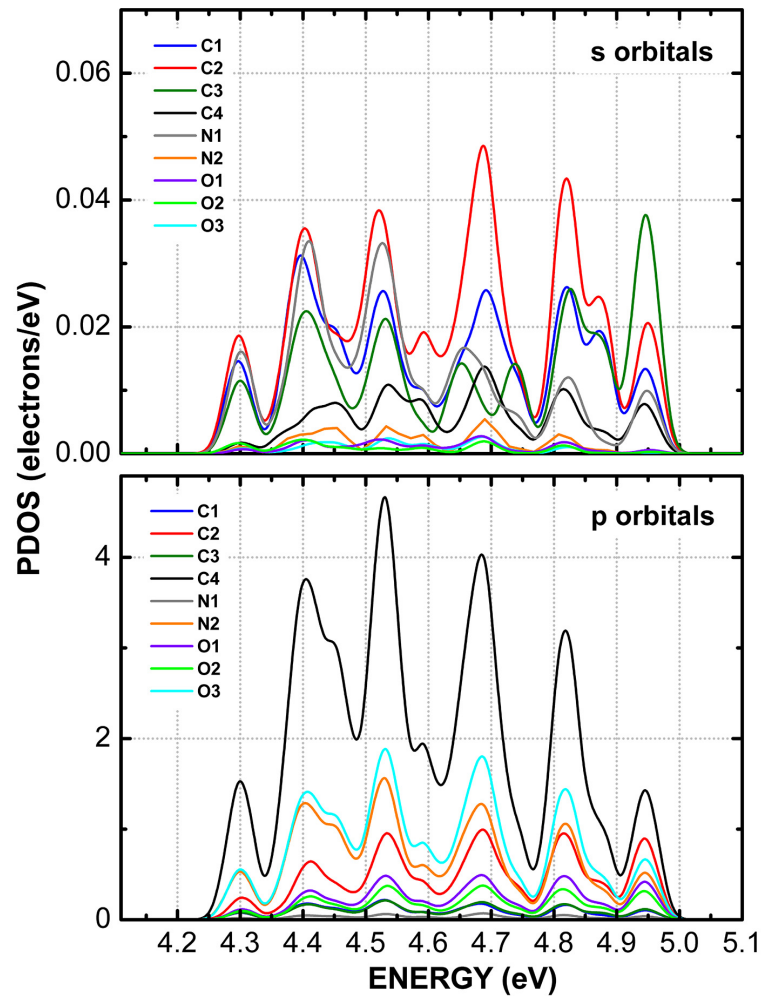


FIG. 1: Partial density of states showing the s state and p state contributions of each atom at the bottom of the conduction band (energy range between 4.1 and 5.1 eV).

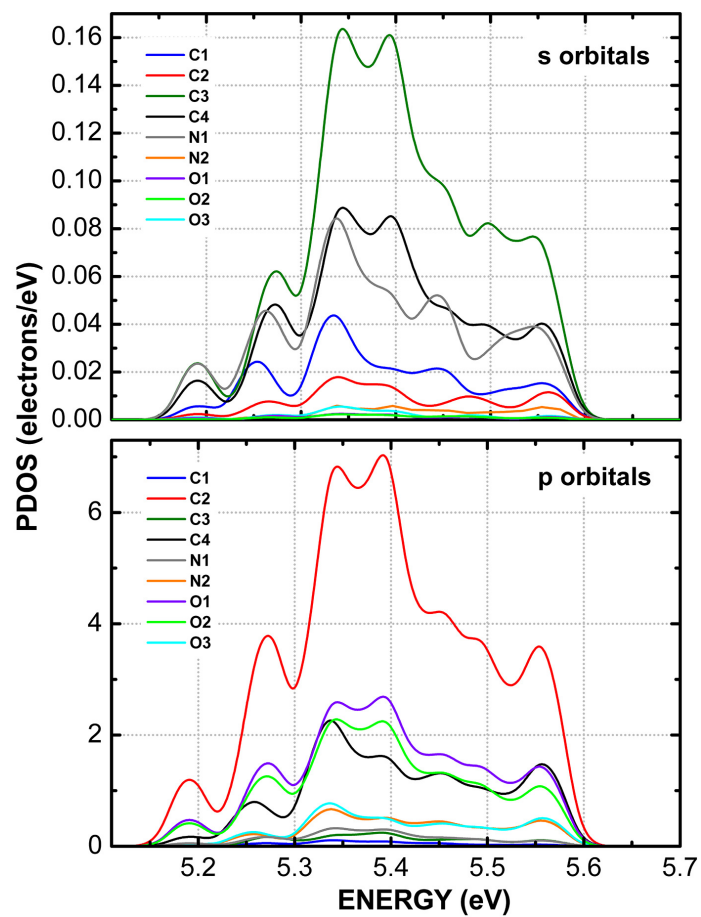


FIG. 2: Partial density of states showing the s state and p state contributions of each atom at the conduction band (energy range between 5.1 and 5.7 eV).

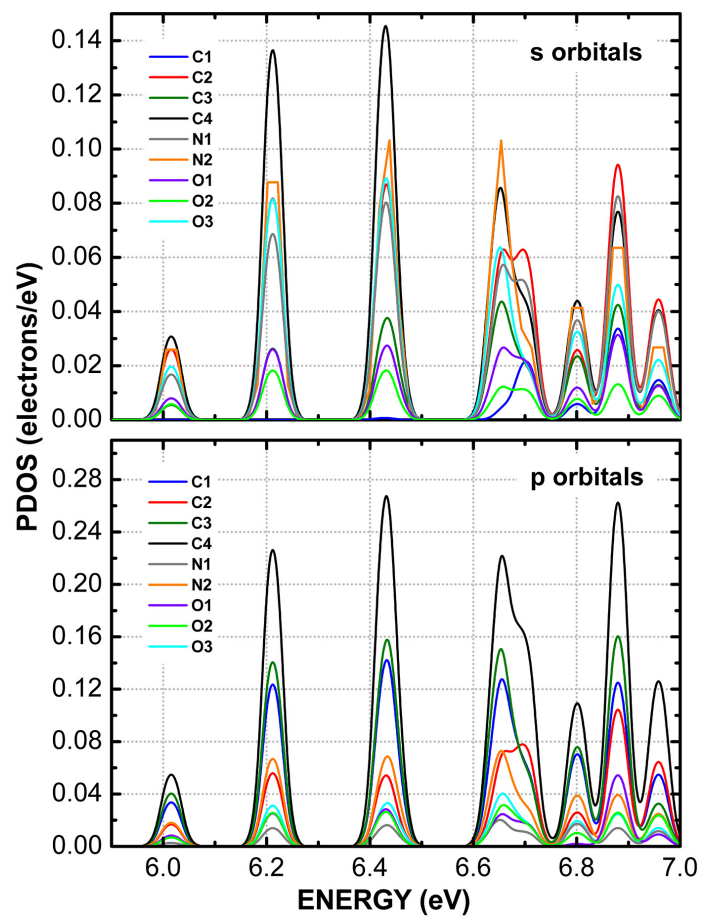


FIG. 3: Partial density of states showing the s state and p state contributions of each atom at the conduction band (energy range between 5.9 and 7.0 eV).

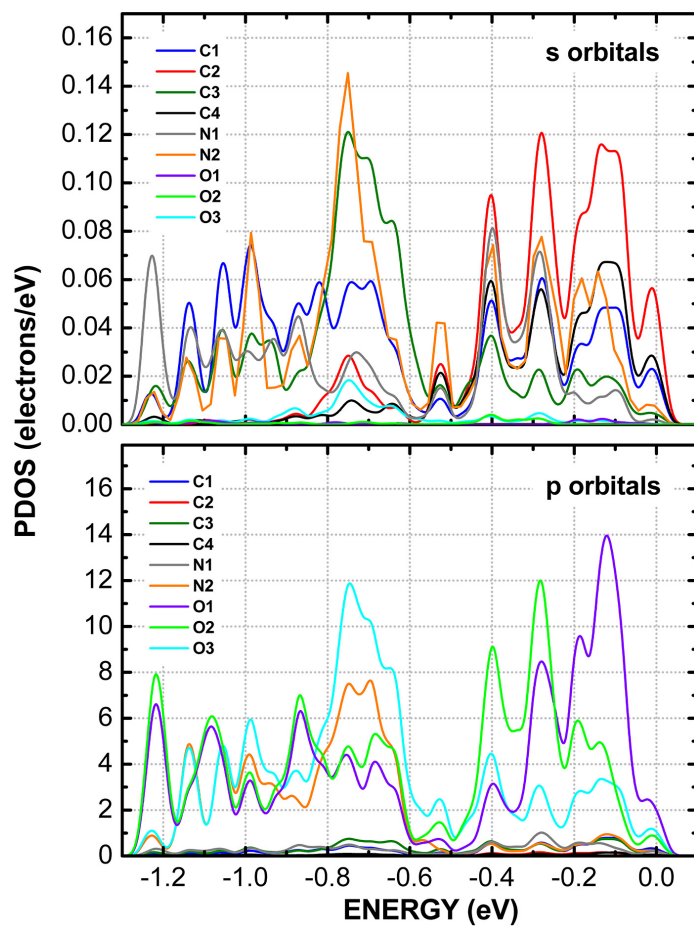


FIG. 4: Partial density of states showing the s state and p state contributions of each atom at the top of the valence band (energy range between -1.3 and 0.1 eV).

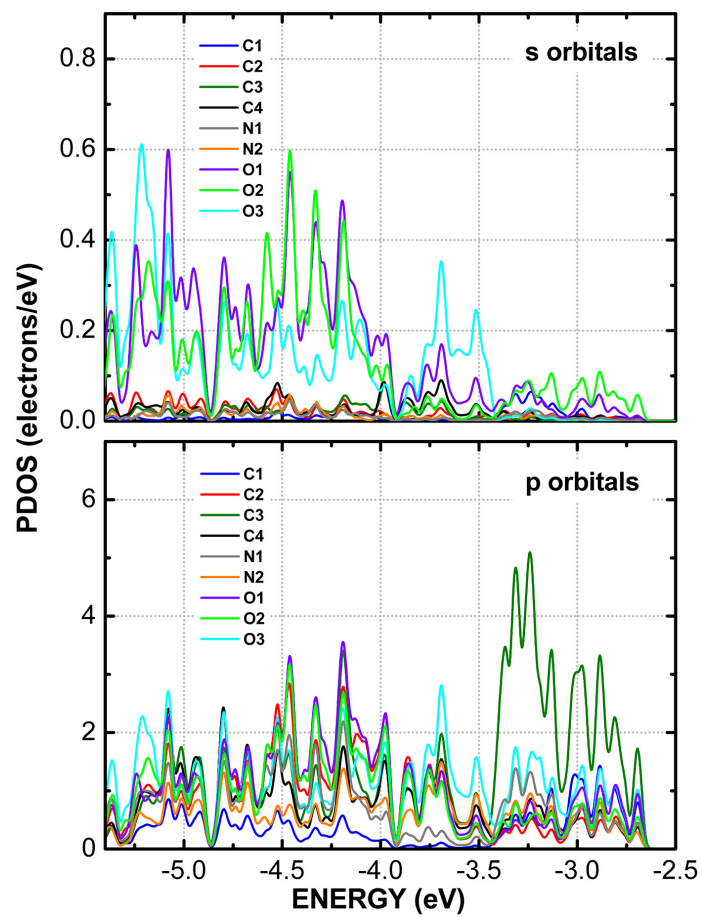


FIG. 5: Partial density of states showing the s state and p state contributions of each atom at the valence band (energy range between -5.4 and -2.5 eV).

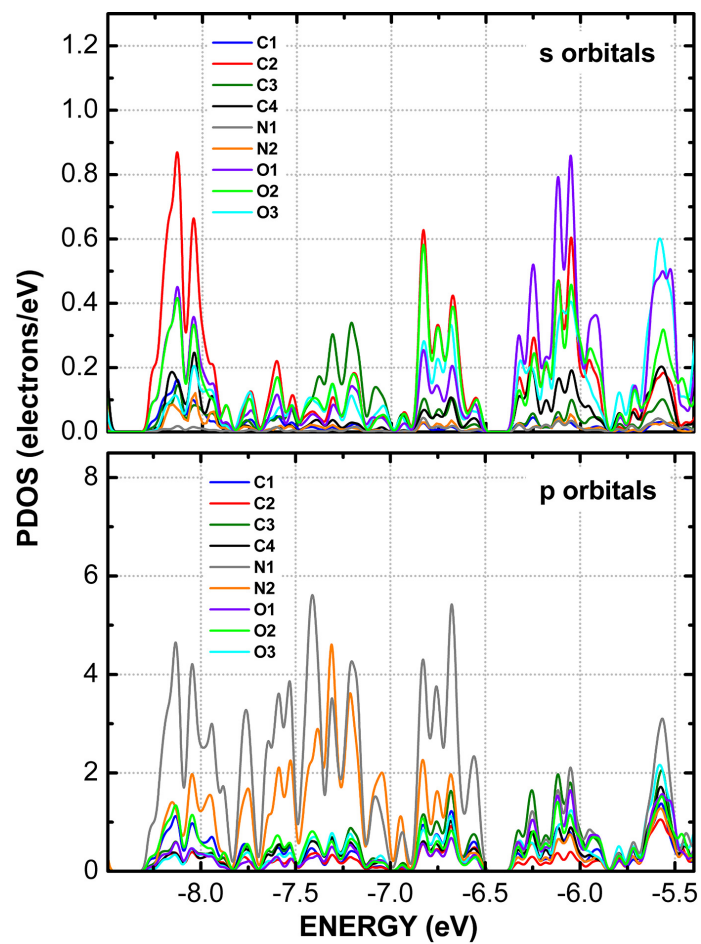


FIG. 6: Partial density of states showing the s state and p state contributions of each atom at the valence band (energy range between -8.6 and -5.4 eV).

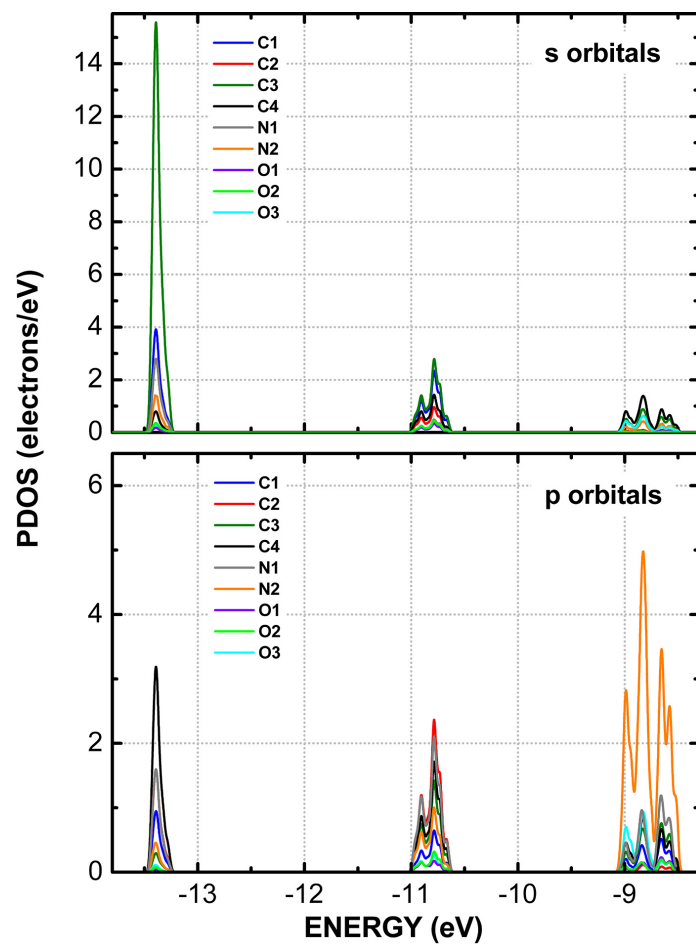


FIG. 7: Partial density of states showing the s state and p state contributions of each atom at the valence band (energy range between -14.0 and -8.6 eV).

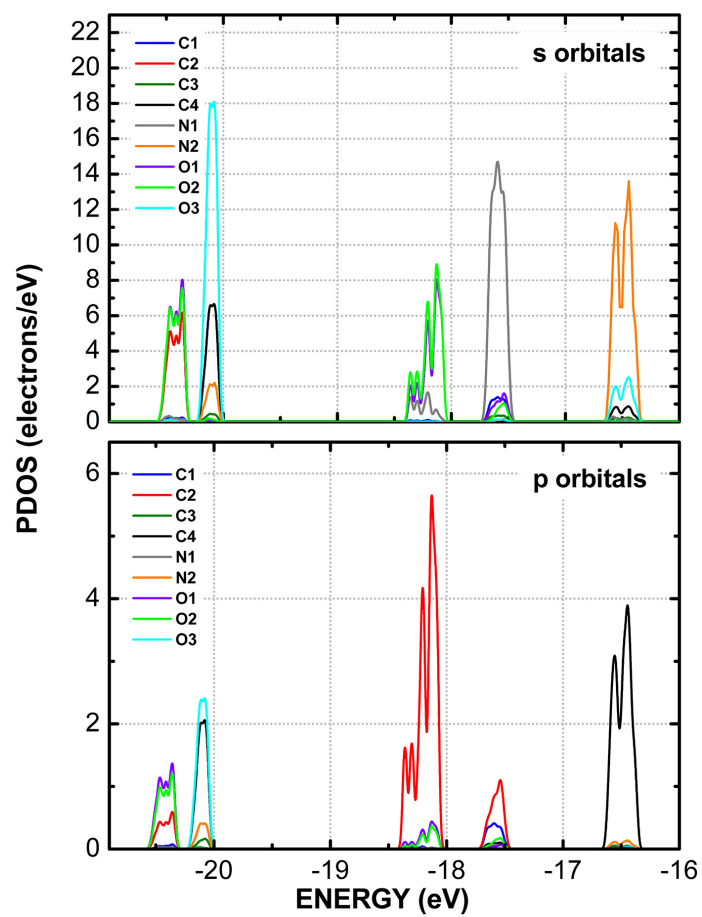


FIG. 8: Partial density of states showing the s state and p state contributions of each atom at the valence band (energy range between -21.0 and -16.0 eV).

References

- [1] K. Yamada, D. Hashizume, T Shimizu, S. Yokoyama, *Acta Cryst.* **E63**, 3802 (2007)

10. Lista de Figuras

Figura 1: Regulação da enzima adenilato ciclase pelos receptores de dopamina. Receptores da subfamília D1 estão associados a subunidades estimulatórias (Gs), modulando positivamente a atividade da enzima adenilato ciclase. Os membros da subfamília D2 estão associados a proteína G inibitória (Gi), promovendo a inibição da adenilato ciclase.

Figura 2: Vias dopaminérgicas no SNC: 1) Via mesolímbica; 2) via mesocortical; 3) via nigroestriatal; e, 4) via tuberoinfundibular.

Figura 3: Árvore evolutiva dos receptores acoplados a proteína G. Os receptores de dopamina da subfamília 1 e 2 estão destacados em vermelho e azul, respectivamente. Adaptado de Graham (2009), p. 52 (GRAHAM, 2009).

Figura 4: Dados cristalográficos do receptor humano de dopamina co-cristalizado com o antagonista eticloprida. (a) Modelo de representação espacial do antagonista eticloprida ligado ao receptor D3. (b) Sítio de ligação da eticloprida. (c) Resíduos de contato elucidados na análise dos dados cristalográficos PDBID: 3PBL. ECL1, ECL2 e ECL3: Alça extracelular 1, 2 e 3, respectivamente. ICL1, ICL2 e ICL3: Alça intracelular 1, 2 e 3, respectivamente. TM1, TM2, TM3, TM4, TM5, TM6 e TM7: Hélice transmembrana 1, 2, 3, 4, 5, 6 e 7, respectivamente. Figura adaptada de Chien e colaboradores (2010) (CHIEN, E. Y. T. *et al.*, 2010).

Figura 5: Estrutura molecular do antipsicótico típico (a) haloperidol, $C_{21}H_{23}ClFNO_2$; e, atípicos (b) risperidona, $C_{23}H_{27}FN_4O_2$, e (c) eticloprida, $C_{17}H_{25}ClN_2O_3$.

Figura 6: Hipótese de mecanismo de atipicidade dos antipsicóticos. Antipsicóticos típicos ligam-se com alta afinidade ao receptor de dopamina e mantêm-se ligados por um longo período, de forma a aumentar a ocupação dos receptores e provocar sintomas extrapiramidais (SEP). Antipsicóticos atípicos ligam-se com menor afinidade ao receptor de dopamina e por isso são facilmente dissociados. Este mecanismo promove a ação terapêutica dos agentes atípicos com a redução/ausência da manifestação de SEP devido ao rápido restabelecimento da sinalização dopaminérgica basal.

Figura 7: Superfície de potencial eletrostático do receptor D3. (A) Representação da densidade eletrônica dos resíduos de aminoácidos localizados na abertura da cavidade do sítio de ligação. Os cálculos foram realizados sem a presença do antipsicótico eticloprida, o qual foi posteriormente inserido para auxiliar a visualização das regiões de interação do sítio de ligação. (B) Representação da densidade eletrônica calculada na presença da eticloprida no sítio de ligação, conforme dados estruturais (PDBID: 3PBL). A superfície do receptor foi colorida conforme a densidade de elétrons no sistema, sendo que as regiões em vermelho (azul) representam áreas de maior (menor) densidade eletrônica. As energias de interação individual de alguns resíduos são exibidas em kcal/mol e foram calculadas utilizando-se a DFT com o funcional GGA-TS.

Figura 8: Fluxograma mostrando as etapas preparação e refinamento da estrutura tridimensional contendo o antipsicótico ligado ao receptor de dopamina D3.

Figura 9: Superfície de potencial eletrostático do receptor D3. (A) Representação da densidade eletrônica dos resíduos de aminoácidos localizados na abertura da cavidade do sítio de ligação. Os cálculos foram realizados sem a presença do antipsicótico haloperidol, o qual foi posteriormente inserido para auxiliar a visualização das regiões de interação do sítio de ligação. (B) Representação da densidade eletrônica calculada na presença do haloperidol no sítio de ligação. A superfície do receptor foi colorida conforme a densidade de elétrons no sistema, sendo que as regiões em vermelho (azul) representam áreas de maior (menor) densidade

eletrônica. As energias de interação individual de alguns resíduos são exibidas em kcal/mol e foram calculadas utilizando-se a DFT com o funcional GGA-TS.

Figura 10: Superfície de potencial eletrostático da estrutura D3-RO1. (A) Representação da densidade eletrônica de resíduos de aminoácidos localizados no sítio de ligação. Os cálculos foram realizados sem a presença da risperidona, a qual foi posteriormente inserida para auxiliar a visualização das regiões de interação do sítio de ligação. (B) Representação da densidade eletrônica calculada na presença da risperidona no sítio de ligação, de forma a ressaltar as alterações na densidade eletrônica do sítio quando da ligação deste antipsicótico. A superfície do receptor foi colorida conforme a densidade de elétrons no sistema, sendo que as regiões em vermelho (azul) representam áreas de maior (menor) densidade eletrônica. As energias de interação individual de alguns resíduos são exibidas em kcal/mol e foram calculadas utilizando-se a DFT com o funcional GGA-TS.

Figura 11: Superfície de potencial eletrostático da estrutura D3-RO2. (A) Representação da densidade eletrônica de resíduos de aminoácidos localizados no sítio de ligação. Os cálculos foram realizados sem a presença da risperidona, a qual foi posteriormente inserida para auxiliar a visualização das regiões de interação do sítio de ligação. (B) Representação da densidade eletrônica calculada na presença da risperidona no sítio de ligação, de forma a ressaltar as alterações na densidade eletrônica do sítio quando da ligação deste antipsicótico. A superfície do receptor foi colorida conforme a densidade de elétrons no sistema, sendo que as regiões em vermelho (azul) representam áreas de maior (menor) densidade eletrônica. As energias de interação individual de alguns resíduos são exibidas em kcal/mol e foram calculadas utilizando-se a DFT com o funcional GGA-TS.

Figura 12: Abertura da cavidade do sítio de ligação do receptor D3 exibindo o antipsicótico em seu interior. (a) Eticloprida posicionada no sítio primário, com a porção pirrolidina (região 1) voltada para a abertura; (b) haloperidol posicionado ao longo do sítio primário e porção do secundário, com o fragmento clorofenil (região 1) voltada para a abertura da cavidade; (c) risperidona (RO1) posicionada no sítio primário e secundário e com a porção tetrahidropiridopirimidinona (região 4) voltada para a superfície; (d) risperidona (RO2), também posicionada no sítio primário e secundário, liga-se com a porção fluor-benzoxazol (região 1) voltada para a abertura do sítio de ligação. A superfície do receptor foi colorida conforme a carga parcial dos átomos do sistema, sendo que as regiões em vermelho (azul) representam áreas de maior (menor) densidade eletrônica.

Figura 13: Perfil de variação de energia em função do raio analisado. Os valores de energia exibidos foram obtidos utilizando-se o nível de teoria DFT com o funcional GGA-TS durante os cálculos envolvendo: dados cristalográficos da estrutura Eticloprida-D3; e, ambas a estruturas refinadas (QM/MM) do Haloperidol-D3; as estruturas refinadas (QM/MM) da Risperidona-D3, RO1 e RO2.

Figura 14: Interação dos antipsicóticos Eticloprida, Haloperidol e Risperidona (RO1 e RO2) com as porções (hélices e alças) do receptor de dopamina humano D3. Relação obtida utilizando-se os dados cristalográficos contendo a eticloprida e estruturas refinadas pelo método QM/MM contendo os antipsicóticos haloperidol e risperidona (RO1 e RO2).

Figura 15: Esquema de MFCC com o efeito de blindagem: (A) Ligante, resíduo de interesse e resíduos de blindagem com seus respectivos caps conjugados; (B) resíduo de interesse e resíduos de blindagem com seus respectivos caps conjugados; (C) Ligante e caps conjugados; (D) caps conjugados. Ligante, resíduos de aminoácidos de interesse, resíduos de blindagem e caps estão representados por M, Ri, Rb e Ci,b, respectivamente.

Figura 16: Esquema de MFCC abrangendo somente os resíduos de blindagem: (A) ligante e resíduos de blindagem com caps conjugados; (B) resíduos de blindagem com caps conjugados; (C) ligante e caps conjugados; (D) caps conjugados. Ligante, resíduos de blindagem e caps estão representados por M, Rb e Cb, respectivamente.

Tabela 1: Comparação entre a energia de interação de alguns resíduos de aminoácido formadores do sítio de ligação secundário e os antipsicóticos haloperidol e risperidona – RO1 e RO2. Energia representada em kcal/mol e calculada através do funcional GGA-TS. TM1, TM2 e TM7 representam hélice transmembrana 1, 2 e 7, respectivamente. ECL2 representa alça extracelular 2.

Tabela 2: Energia de interação calculada entre os antipsicóticos Eticloprida, Haloperidol e Risperidona (RO1 e RO2). Energia representada em kcal/mol e calculada através do funcional GGA-TS. TM1-7 representam hélice transmembrana 1-7, respectivamente. ECL2 representa alça extracelular 2.