



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS**  
**DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA**

**DANILO VASCONCELOS GUIMARÃES**

**ESTUDO COMPARATIVO DA L-ASPARAGINASE DE *E. coli* E *Phaseolus vulgaris* UTILIZANDO DINÂMICA MOLECULAR**

**FORTALEZA**

**2019**

DANILO VASCONCELOS GUIMARÃES

ESTUDO COMPARATIVO DA L-ASPARAGINASE DE *E. coli* E *Phaseolus vulgaris*  
UTILIZANDO DINÂMICA MOLECULAR

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de mestre em Bioquímica.

Área de concentração: Bioquímica Vegetal

Orientador: Prof. Dr. Bruno Anderson Matias da Rocha.

Coorientador: Dr. Marcos Roberto Lourenzoni

FORTALEZA

2019

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
Universidade Federal do Ceará  
Biblioteca Universitária

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

---

G977e Guimarães, Danilo Vasconcelos.

Estudo Comparativo da L-asparaginase de *E. coli* e *Phaseolus vulgaris* utilizando  
dinâmica molecular / Danilo Vasconcelos Guimarães. – 2019.

70 f. : il. color.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Programa  
de Pós-Graduação em Bioquímica, Fortaleza, 2019.

Orientação: Prof. Dr. Bruno Anderson Matias da Rocha.

Coorientação: Prof. Dr. Marcos Roberto Lourenzoni.

1. L-asparaginase. 2. *Phaseolus vulgaris*. 3. Dinâmica molecular. I. Título.

CDD 572

---

DANILO VASCONCELOS GUIMARÃES

ESTUDO COMPARATIVO DA L-ASPARAGINASE DE *E. coli* E *Phaseolus vulgaris*  
UTILIZANDO DINÂMICA MOLECULAR

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de mestre em Bioquímica.  
Área de concentração: Bioquímica Vegetal

Aprovada em: 27/02/2019.

BANCA EXAMINADORA

---

Prof. Dr. Bruno Anderson Matias da Rocha (Orientador)  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Prof. Dr. Ito Liberato Barroso Neto  
Centro Universitário Unichristus

---

Prof. Dr. Geancarlo Zanatta  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

## AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, que me incentivaram a continuar na vida acadêmica. Ao meu irmão Rafael por ser uma inspiração acadêmica e um exemplo o qual sempre me espelho.

Ao meu co-orientador Marcos Lourenzoni por ter sido uma peça fundamental na realização do meu trabalho e que aceitou a me orientar desde a iniciação científica quando não tinha conhecimento nenhum na área de bioinformática. Por sempre estar disponível quando precisei e disposto a me ajudar.

Ao meu orientador prof. Bruno Anderson, o qual admiro desde a graduação em que sempre presenciei o desenvolvimento dos seus projetos de pesquisa, e por ser um excelente professor, orientador e amigo, sempre disponível para discussões científicas, conversas amistosas e debates políticos. Além de ter aceito de prontidão ser meu orientador e se disposto a elaborar um projeto de pesquisa em uma área um pouco diversa da que é desenvolvida no seu laboratório.

Aos meus colegas de mestrado, por terem participado comigo dos perrengues dos prazos dos trabalhos e estudos para as provas, em especial ao Misrael, Larissa, Nadine, Pedro, Jackson, Lyndefânia e João Pedro por terem participado em conjunto da apresentação de seminário mais épica do mestrado.

Ao Eduardo (Dudu) por todos os momentos de descontração, merenda da tarde, ensinamentos científicos e demonstrações de bom senso. Momentos de prata, colóquios de ouro.

Aos amigos de Labic: Léo, mesmo com seu mau humor diário; Jucilene, mesmo com sua euforia constante que tira o juízo de qualquer um; Renally, que adora levar um béquer; Will, que me mostrou que o ser humano pode dormir em qualquer lugar; e Cássia (vida) por ser parte da entidade suprema do laboratório que sempre está trabalhando focada nos projetos e tocando o laboratório pra frente.

Aos amigos que fiz na graduação e ainda estão presentes: Bia, que aparece sempre que tem comida grátis; Ian, que todo dia diz que devíamos desistir mas nunca desistimos; Karol, que faz parte da santíssima trindade biotecnológica e mesmo morando na messejana sempre vem me visitar; Isabel (mozaum), a outra parte da santíssima trindade que foi meu braço direito desde que entrou na minha vida e nunca negou nenhum pedido de ajuda, que assiste aos jogos do ferroviário comigo e escuta minhas análises técnicas sem reclamar mesmo não fazendo menor ideia do

que estou falando.

“A verdade não resulta do número dos que nela creem.”

(Galileu Galilei)

## RESUMO

A Leucemia Linfóide Aguda (LLA) é uma doença que se caracteriza por afetar os linfócitos, provocando um acúmulo de células jovens anormais na medula óssea. A quimioterapia é um dos tratamentos para essa doença e a L-asparaginase é uma das drogas utilizadas nesse tratamento. Embora diversos organismos sintetizem L-asparaginase, apenas as de origem bacteriana são utilizadas como quimioterápico. O objetivo foi estudar a estabilidade estrutural da L-asparaginase de *Phaseolus vulgaris* a fim de comparar seu sítio ativo com a da L-asparaginase de *E. coli* para analisar a viabilidade da enzima vegetal como alternativa à bacteriana. Foram utilizadas técnicas de modelagem para obter a estrutura completa da L-asparaginase de *P. vulgaris*, simulação de Dinâmica Molecular (DM) para o estudo da estabilidade estrutural da proteína e suas alças modeladas e *docking* para o estudo da interação do substrato asparagina com os resíduos do sítio catalítico presentes nessas alças. A estabilidade estrutural da proteína total e de suas alças em água, foi avaliada, assim como as interações entre os monômeros de L-asparaginase, visando identificar os resíduos determinantes de estabilidade e que levam a manutenção da forma e a relação desses determinantes com os sítios catalíticos. A modelagem foi feita por técnicas *ab initio* a partir do programa I-TASSER seguida de 100 ns de DM com metodologia de *annealing*. As simulações de DM utilizaram o campo de força GROMOS53A6, em meio aquoso e com íons o suficiente para manter a concentração de 0,15 M do sistema, e a trajetória foi armazenada com tempo total de simulação de 300 ns. A estabilidade da proteína e das alças de ambas L-asparaginases foi analisada por parâmetros de desvio quadrático médio e ligações de hidrogênio. A estabilidade da estrutura quaternária é influenciada diretamente pela formação de ligações de hidrogênio (LHs) entre os monômeros da enzima e a atividade catalítica é dependente dessas LHs. As perspectivas são de obter dados experimentais sobre a interação da enzima com seu substrato para permitir a avaliação de quais resíduos participam ativamente da catálise e propor mutações pontuais com o propósito de tentar aumentar a especificidade da L-asparaginase a fim de viabilizá-la como alternativa à L-asparaginase de *E. coli*.

**Palavras-chave:** L-asparaginase. *Phaseolus vulgaris*. Dinâmica molecular.



## ABSTRACT

Acute lymphoid leukemia (ALL) is a disease characterized by affecting lymphocytes, causing an accumulation of abnormal young cells in the bone marrow. Chemotherapy is one of the treatments for this disease and L-asparaginase is one of the drugs used in this treatment. Although several organisms synthesize L-asparaginase, only those of bacterial origin are used as chemotherapeutic. The aim of this work was to study the structural stability of *Phaseolus vulgaris* L-asparaginase in order to compare its active site with *E. coli* L-asparaginase to analyze the viability of the plant enzyme as an alternative to bacterial. It was used modeling techniques to obtain the complete structure of *P. vulgaris* L-asparaginase, Molecular Dynamics (MD) simulation for the structural stability study of the protein and its modeling loops and docking to study the interaction of the asparagine substrate with the catalytic site residues present in these loops. The structural stability of the total protein and its loops in water was evaluated, as well as the interactions between the L-asparaginase monomers, in order to identify the determinant residues of stability and that lead to the maintenance of the form and the relation of these determinants with the catalytic sites. The modeling was done by ab initio techniques from the I-TASSER program followed by 100 ns of MD with annealing methodology. The MD simulations used the GROMOS53A6 force field, in aqueous solution and with ions sufficient to maintain the system's 0.15 M concentration, and the trajectory was stored with a total simulation time of 300 ns. The stability of the protein and the loops of both L-asparaginases was analyzed by parameters of mean square deviation and hydrogen bonds. The stability of the quaternary structure is directly influenced by the formation of hydrogen bonds (HBs) between the monomers of the enzyme and the catalytic activity is dependent on these HBs. The prospects are to obtain experimental data on the interaction of the enzyme with its substrate to allow the evaluation of which residues participate actively in the catalysis and to propose point mutations in order to try to increase the specificity of L-asparaginase in order to make it possible as an alternative to L-asparaginase from *E. coli*.

**Keywords:** L-asparaginase. *Phaseolus vulgaris*. Molecular dynamics.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1	– Mecanismo de ação da L-asparaginase .....	22
Figura 2	– Estrutura cristalizada (código PDB 3eca) de L-asparaginase de <i>E.coli</i> , em que observa-se os 4 monômeros e sua organização para a formação do homotetrâmero.....	22
Figura 3	– Estrutura da L-asparaginase de <i>Phaseolus vulgaris</i> cristalizada disponível no PDB (código 4pu6) em que se observa os 4 monômeros proposto por Byger.....	24
Figura 4	– Reação da transaminação da glutamina.....	25
Figura 5	– Reação de adição de amônio ao aspartato.....	25
Figura 6	– Reação de conversão entre alfa-cetoglutarato e glutamato .....	26
Figura 7	– Estrutura de L-asparaginase de <i>Phaseolus vulgaris</i> obtida após a modelagem das alças (em vermelho) pelo I-TASSER.....	34
Figura 8	– Gráfico do perfil RMSD das alças de <i>Phaseolus vulgaris</i> com e sem annealing.....	42
Figura 9	– Perfil RMSD somente da proteína sem as alças modeladas ....	44
Figura 10	– Perfil RMSD da proteína sem as alças modeladas e das alças modeladas em conjunto (Alças 1 e 2) .....	44
Figura 11	– Perfil RMSD das alças do monômero 1 (Alça 1) e monômero 2 (Alça 2) de <i>Phaseolus vulgaris</i> modeladas isoladamente .....	44
Figura 12	– Perfil de RMSD comparativo entre as alças de <i>Phaseolus vulgaris</i> analisadas de maneira isoladas e em conjunto (alças 1 e 2).....	45
Figura 13	– Perfil de RMSD da alça na DM do monômero de <i>E. coli</i> .....	48
Figura 14	– Perfis de RMSD da alça nos Mo1 e Mo2 de <i>E. coli</i> .....	48
Figura 15	– Perfis de RMSD das alças do monômero de tetrâmero de <i>E. coli</i> .....	49
Figura 16	– Os perfis de RMSD dos monômeros e do tetrâmero de <i>E. coli</i> .....	49

- Figura 17 – Resíduos que realizam ligações de hidrogênio entre cadeia principal e cadeia principal no tetrâmero da L-asparaginase de *E. coli*. Os ácidos aspárticos são mostrados em esferas amarelas e os resíduos que realizam ligações de hidrogênio estão representados em esferas na cor original do átomo: Carbono em verde, Nitrogênio em azul, Oxigênio em vermelho e Hidrogênio em branco ..... 54
- Figura 18 – Resíduos que realizam ligações de hidrogênio entre cadeia principal e cadeia e cadeia lateral no tetrâmero da *L-asparaginase de E. coli*. Os ácidos aspárticos são mostrados em esferas amarelas e os resíduos que realizam ligações de hidrogênio estão representados em esferas na cor original do átomo: Carbono em verde, Nitrogênio em azul, Oxigênio em vermelho e Hidrogênio em branco ..... 55
- Figura 19 – Resíduos que realizam ligações de hidrogênio entre cadeia lateral e cadeia lateral no tetrâmero da L-asparaginase de *E. coli*. Os ácidos aspárticos são mostrados em esferas amarelas e os resíduos que realizam ligações de hidrogênio estão representados em esferas na cor original do átomo: Carbono em verde, Nitrogênio em azul, Oxigênio em vermelho e Hidrogênio em branco ..... 55
- Figura 20 – Tetrâmero de L-asparaginase de *E. coli* cocrystalizado com ácido aspártico. Os resíduos N24, T26, Q59, M121, I182 e N184 do monômero 1 são mostrados interagindo com o ácido aspártico no sítio catalítico mostrado em esferas amarelas ..... 56
- Figura 21 – Resíduos que realizam ligações de hidrogênio entre cadeia principal e cadeia principal no dímero da L-asparaginase de *P. vulgaris* (em verde o domínio A1 e em azul o domínio A2). Os ácidos aspárticos são mostrados em esferas amarelas e os resíduos que realizam ligações de hidrogênio estão representados em esferas na cor original do átomo: Carbono em verde, Nitrogênio em azul, Oxigênio em vermelho e Hidrogênio em branco ..... 60

- Figura 22 – Resíduos que realizam ligações de hidrogênio entre cadeia principal e cadeia lateral no dímero da L-asparaginase de *P. vulgaris* (em verde o domínio A1 e em azul o domínio A2). Os ácidos aspárticos são mostrados em esferas amarelas e os resíduos que realizam ligações de hidrogênio estão representados em esferas na cor original do átomo: Carbono em verde, Nitrogênio em azul, Oxigênio em vermelho e Hidrogênio em branco. .... 61
- Figura 23 – Resíduos que realizam ligações de hidrogênio entre cadeia lateral e cadeia lateral no dímero da L-asparaginase de *P. vulgaris* (em verde o domínio A1 e em azul o domínio A2). Os ácidos aspárticos são mostrados em esferas amarelas e os resíduos que realizam ligações de hidrogênio estão representados em esferas na cor original do átomo: Carbono em verde, Nitrogênio em azul, Oxigênio em vermelho e Hidrogênio em branco ..... 62
- Figura 24 – Interações entre o aminoácido asparagina e resíduos presentes na alça 1 da L-asparaginase de *Phaseolus vulgaris*..... 63
- Figura 25 – Interações entre o aminoácido asparagina e resíduos presentes na alça 2 da L-asparaginase de *Phaseolus vulgaris*..... 64
- Figura 26 – Interações entre o aminoácido asparagina e resíduos presentes na alça da L-asparaginase de *E. coli*. .... 65

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1	– Valores de $K_m$ , $V_{max}$ e $K_{cat}$ para a L-asparaginase de <i>P. vulgaris</i> na presença e ausência de íons de potássio.....	24
Tabela 2	– Parâmetros utilizados na equilibração dos sistemas simulados.....	38
Tabela 3	– Médias e desvio padrão dos RMSD para as alças com e sem annealing.....	41
Tabela 4	– Médias e desvio padrão dos RMSD para as alças e proteínas.....	43
Tabela 5	– Médias e desvio padrão dos RMSD para o monômero, dímero e tetrâmero e individualmente, para cada um dos monômeros, após o alcance do equilíbrio no instante $t_{eq}$ .....	47
Tabela 6	– Médias e desvio padrão dos RMSD para as alças dos monômeros das três DMs. Dados mostrados para a alça de cada monômero das L-asparaginases.....	47
Tabela 7	– Porcentagem de observação de (%OBS) dos LHs intermolecular realizadas pelos grupos entre cadeia principal e cadeia principal entre dois domínios; $A_N N= 1, 2, 3, 4$ .....	50
Tabela 8	– Porcentagem de observação de (%OBS) dos LHs intermolecular realizadas pelos grupos entre cadeia principal e cadeia lateral entre dois domínios; $A_N N= 1, 2, 3, 4$ .....	51
Tabela 9	– Porcentagem de observação de (%OBS) dos LHs intermolecular realizadas pelos grupos entre cadeia lateral e cadeia lateral entre dois domínios; $A_N N= 1, 2, 3, 4$ .....	52
Tabela 10	– Porcentagem de observação de (%OBS) dos LHs intermolecular realizadas pelos grupos entre cadeia principal e cadeia principal entre os dois domínios A1 e A2.....	57

Tabela 11 – Porcentagem de observação de (%OBS) dos LHs intermolecular realizadas pelos grupos entre cadeia principal e cadeia lateral entre os dois domínios.....	58
Tabela 12 – Porcentagem de observação de (%OBS) dos LHs intermolecular realizadas pelos grupos entre cadeia lateral e cadeia lateral entre os dois domínios .....	58

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

DM	Dinâmica Molecular
EcA	L-asparaginase de <i>E. coli</i>
IUPAC	União Internacional de Química Pura e Aplicada
LLA	Leucemia Linfóide Aguda
LH	Ligação de Hidrogênio
Mo	Monômero
RMSD	<i>Root Mean Square Deviation</i>
UIB	União Internacional de Bioquímica

## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO .....	17
1.1	Leucemia Linfoide Aguda.....	17
1.2	Fitoterapia.....	18
1.3	Tratamento.....	19
1.4	Enzimas.....	20
1.4.1	<i>Classificação das enzimas</i> .....	20
1.5	Caracterização da L-asparaginase.....	21
1.5.1	<i>L-asparaginase bacteriana</i> .....	22
1.5.2	<i>L-asparaginase vegetal</i> .....	23
1.6	Asparagina.....	24
1.7	Dinâmica Molecular.....	26
1.8	Modelagem Molecular .....	28
1.8.1	<i>I-TASSER</i> .....	29
1.8.2	<i>Annealing usando Dinâmica Molecular</i> .....	30
1.9	<i>Docking</i> Molecular.....	31
2	OBJETIVOS.....	33
2.1	Objetivo geral .....	33
2.2	Objetivos específicos.....	33
3	METODOLOGIA .....	33
3.1	Obtenção das estruturas de L-asparaginase.....	33
3.2	Modelagem da alça da L-asparaginase de <i>Phaseolus vulgaris</i> .....	34
3.3	Composição do sistema a ser submetido a Dinâmica Molecular .....	35
3.4	Programas para analisar as trajetórias de Dinâmica Molecular.....	38
3.4.1	<i>Avaliação da estabilidade estrutural</i> .....	38
3.4.2	<i>Ligações de Hidrogênio</i> .....	39
3.5	<i>Docking</i> .....	40
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	40
4.1	Dados para o RMSD após a modelagem das alças pelo I-TASSER e DM de <i>Phaseolus vulgaris</i> .....	40
4.2	Dados de RMSD da L-asparaginase de <i>Phaseolus vulgaris</i> submetida a DM .....	42
4.3	Dados de RMSD da estrutura quaternária de L-asparaginase de <i>E. coli</i>	



<b>submetida a DM .....</b>	<b>45</b>
<b>4.4 Ligações de Hidrogênio .....</b>	<b>49</b>
<b>4.4.1 <i>Escherichia coli</i> .....</b>	<b>49</b>
<b>4.4.2 <i>Phaseolus vulgaris</i> .....</b>	<b>57</b>
<b>4.5 Docking .....</b>	<b>62</b>
<b>4.5.1 Interações do sítio catalítico de <i>L-asparaginase</i> de <i>Phaseolus vulgaris</i> .....</b>	<b>62</b>
<b>4.5.2 Interações do sítio catalítico de <i>L-asparaginase</i> de <i>E. coli</i> .....</b>	<b>64</b>
<b>5 CONCLUSÃO .....</b>	<b>65</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>67</b>

## 1 INTRODUÇÃO

### 1.1 Leucemia Linfoide Aguda

O câncer é um conjunto de doenças que possuem como característica o crescimento desordenado de células, acarretando em complicações no funcionamento normal do organismo. Um dentre os vários tipos existentes de câncer é a leucemia, uma doença cuja causa exata ainda é desconhecida e se caracteriza por afetar os leucócitos, induzindo o acúmulo de células jovens anormais na medula óssea que substituem as células normais. As células malignas são capazes de expressar vários fenótipos e respostas variáveis à quimioterapia. A leucemia se divide em dois tipos, a Leucemia Linfoide, relacionada aos linfócitos, e a Leucemia Mieloide, relacionada com as células da medula formadora de hemácias, de plaquetas e de alguns tipos de leucócitos.

Enquanto a Leucemia Linfoide Crônica (LLC) as células doentes se desenvolvem mais e possuem uma maior similaridade metabólica com as células normais, mantendo algumas de suas funções metabólicas no organismo, a Leucemia Linfoide Aguda (LLA) afeta os linfócitos B jovens, possuem uma rápida progressão e não preservam sua função metabólica. A LLA pode ser classificada com bases em critérios morfológicos e imunológicos. Quanto a morfologia, ela pode ser classificada em 3 subtipos: L1, L2 e L3. No subtipo L1, encontra-se a presença majoritária de linfoblastos pequenos, com núcleo regular e cromatina homogênea. No L2, há a presença predominante de linfoblastos de tamanho médio, com núcleo irregular e cromatina heterogênea. Já no subtipo L3, caracteriza-se pela presença de linfoblastos de tamanho variável entre médio e grande, com citoplasma hiperbasofílico e presença de múltiplos vacúolos. Quanto aos aspectos imunológicos, pode ser dividida de acordo com os estágios de desenvolvimento e linhagem das células B ou T (CHAMPLIN, 1989).

O tipo mais comum de câncer infantil é a LLA, constituindo, aproximadamente, um terço de todas as neoplasias malignas em crianças (PEDROSA, 2002). Dentre os casos registrados, a LLA acomete com maior frequência pessoas com até 10 anos de idade, mas a maioria dos óbitos ocorre em adultos. Isso se deve às diferenças da própria doença nessas faixas etárias e ao tipo de tratamento, visto que o organismo

das crianças, muitas vezes, pode (CHAMPLIN, 1989) lidar melhor do que o dos adultos com um tratamento mais agressivo (American Cancer Society).

A LLA é responsável por milhares de mortes no Brasil por ano, segundo o Instituto Nacional de Câncer (INCA). Em 2013, morreram 6.316 pessoas, sendo 3.439 homens e 2.877 mulheres. Embora existam diversos tratamentos para essa doença, como quimioterapia, radioterapia, uso de células tronco e transplante de medula óssea, a quimioterapia é o método mais utilizado. A quimioterapia se caracteriza por ser um tratamento demorado que requer um prazo de até 3 anos para o efeito ser observado. Dentre os vários tipos de drogas que podem ser utilizadas no tratamento quimioterápico, pode-se citar a L-asparaginase (REDDY 2016).

O desenvolvimento de novas tecnologias e avanços na área de bioinformática nos permitiu que estudos mais detalhados fossem feitos. Uma das ferramentas que nos proporcionam realizar esses estudos é a técnica de simulação utilizando Dinâmica Molecular (DM).

## **1.2 Fitoterapia**

A Organização Mundial da Saúde (OMS) vem enfatizando na importância de medicamentos de origem vegetal, sugerindo como alternativa viável aos medicamentos tradicionais e ressaltando sua importância aos países em desenvolvimento devido seu custo reduzido. No Brasil, a medicina popular é muito utilizada de maneira informal, principalmente em cuidados contra dores, enjoos e inflamações (REZENDE, 2002).

Segundo a OMS, 80% da população mundial faz uso de alguma planta a fim de aliviar algum sintoma. Embora a medicina moderna seja amplamente utilizada e desenvolvida, a OMS revela que grande parte da população de países não desenvolvidos e em desenvolvimento depende do uso da medicina tradicional. Dentre os que usam práticas tradicionais de medicina, 85% utilizam plantas ou soluções provenientes de plantas (ZENI, et al. 2017; BRASIL, 2006).

De acordo com dados da IMS Health, os fitoterápicos refletem 2% da receita global, representando R\$ 1,6 bilhão somente no ano de 2015. O mercado de fitoterápicos movimenta US\$ 20 bilhões por ano dentre os US\$ 320 bilhões de vendas por ano de produtos farmacêuticos. Segundo a Associação Brasileira das Empresas do Setor Fitoterápico, Suplemento Alimentar e de Promoção da Saúde (Abifisa), o mercado brasileiro de fitoterápicos cresceu, em 2015, em torno de 8% em relação ao

período de 2014, onde teve um crescimento de 6,1% em relação ao período anterior (VALECIO, 2016).

### 1.3 Tratamento

O tratamento mais utilizado para a LLA é utilizando L-asparaginase bacteriana (ELSPAR® e Erwinase®).

De acordo com o Ministério da Saúde, a importação de diversos medicamentos, incluindo a L-asparaginase, representam um gasto de R\$ 1,8 bilhão por ano. Com o incentivo da produção nacional, estima-se que haja uma economia de R\$ 225 milhões por ano.

Quanto a produção nacional, em 2015 o governo investiu cerca de R\$ 18 milhões de reais em parcerias com empresas privadas e com a Fundação Oswaldo Cruz para a aquisição do medicamento.

A estratégia de uso da L-asparaginase no tratamento do câncer está em limitar as fontes externas de asparagina para a síntese proteica da célula cancerígena. Embora não se tenha certeza dos motivos que explicam porque os linfócitos malignos da LLA utilizam asparagina sérica para seu crescimento, as células leucêmicas têm baixa eficiência em expressar a asparagina sintase, enquanto as normais possuem essa habilidade. Dessa forma, quando a L-asparaginase é administrada durante o tratamento, a asparagina circulante presente no soro é degradada, provocando a morte seletiva das células leucêmicas impedindo sua posterior proliferação (SWAIN, 1993).

A administração de L-asparaginase como tratamento de LLA é amplamente utilizado, resultando em uma taxa de remissão maior que 95% se combinados com outras enzimas como a asparagina sintetase e uma taxa de remissão entre 40 e 60% se utilizada de forma exclusiva na terapia (NELSON; COX, 2011).

Entretanto, o uso de inibidores de asparagina sintetase possui um entrave devido ao fato de que essa enzima é uma aminotransferase dependente de glutamina e o domínio aminoterminal da glutaminase é muito similar em todas as enzimas com atividade glutamina-aminotransferase. Dessa forma, uma droga que atinja seu sítio catalítico provavelmente inibirá outras enzimas presentes no organismo, provocando diversos efeitos adversos (NELSON; COX, 2011).

## 1.4 Enzimas

As enzimas possuem um importante papel nos processos bioquímicos. Elas catalisam inúmeras reações de várias etapas que degradam moléculas nos seres vivos, que conservam e transformam energia química e que constroem moléculas biológicas a partir de recursos primordiais (NELSON; COX, 2011).

Dentre as importâncias da enzima no metabolismo de seres vivos pode-se destacar que ausência de enzimas, ou sua deficiência parcial, é a causa de diversas doenças, principalmente doenças hereditárias, enquanto outras doenças possuem a causa inversa, a superatividade de certa enzima (NELSON; COX, 2011).

A catálise biológica foi reconhecida e descrita no final do século XVIII em estudos de digestão de secreções estomacais. Em seguida houveram diversos experimentos para o estudo da atividade enzimática utilizando extrato de plantas na conversão do amido em açúcar. Outra etapa histórica importante foi na metade do século XIX, quando Louis Pasteur concluiu que a fermentação de açúcar em álcool por leveduras era catalisada por uma substância inerente à própria célula da levedura viva (NELSON; COX, 2011).

Outro ponto marcante na história do estudo das enzimas foi em 1926, quando James Sumner isolou e cristalizou uma urease e descobriu que os seus cristais constituíam-se de proteínas, postulando então que toda enzima é uma proteína. Embora hoje sabemos que existem moléculas de RNA que também realizam atividade enzimática (NELSON; COX, 2011).

### 1.4.1 *Classificação das enzimas*

As enzimas foram classificadas pela União Internacional de Bioquímica (IUB) em 6 grupos gerais de acordo com a natureza da reação química (oxidoredutases, transferases, hidrolases, liases, isomerases e ligases) que por sua vez são classificados em subgrupos mais específicos sobre a atividade da enzima (WEEB, 1992).

A enzima L-asparaginase (EC 3.5.1.1), que é utilizada no tratamento da Leucemia Linfóide Aguda, pertence à classe das hidrolases, que promove a clivagem do aminoácido asparagina através da utilização de água e cliva ligações carbono-nitrogênio não peptídicas (ERVA, 2016).

## 1.5 Caracterização da L-asparaginase

A L-asparaginase é uma enzima que hidrolisa aminoácidos que possuem grupo amida na sua cadeia lateral. Em bactérias, a principal função da L-asparaginase é manter o crescimento celular em ambiente deficiente de amônia, através da degradação de asparagina e de glutamina como fontes de nitrogênio (SANCHES; KRAVCHENCO; POLIKARPOV, 2007).

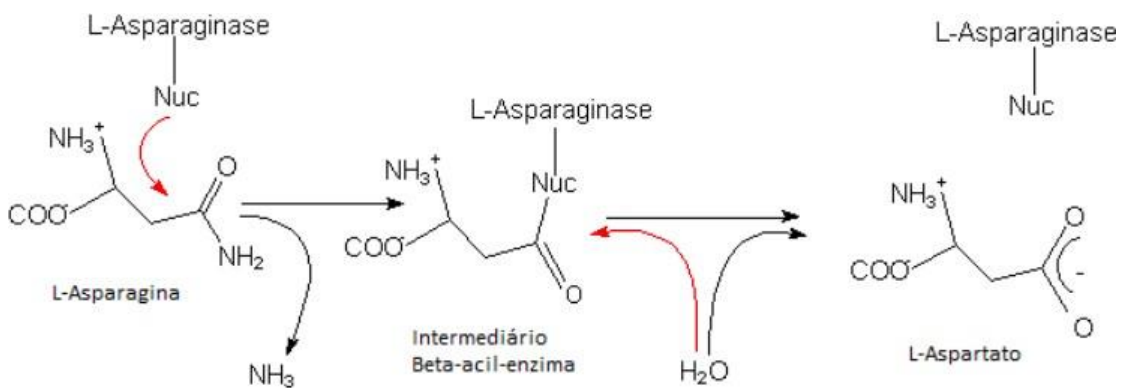
A L-asparaginase é dividida entre dois grupos: as asparaginases, que hidrolisam com alta especificidade a asparagina, e as asparaginase-glutaminases, que hidrolisam com mesma eficiência asparagina e glutamina, sendo portanto menos específicas. A hidrólise da asparagina resulta em ácido aspártico e amônia, enquanto que a hidrólise da glutamina resulta em ácido glutâmico e amônia (SANCHES, KRAVCHENCO; POLIKARPOV, 2007).

Embora a L-asparaginase de *E. coli* (EcA) seja amplamente utilizada no tratamento da LLA, a sua administração necessita de um controle crucial para a manutenção do bem-estar do paciente, tendo em vista que sua atividade de glutaminase é apontada como a principal responsável pelos efeitos colaterais. Entre esses efeitos estão as reações alérgicas (dificuldade para respirar, erupção cutânea, febre, dores, vermelhidão, inchaço na região da injeção), sintomas de problemas no fígado (escurecimento da urina, náuseas, perda de apetite), pancreatite (dores estomacais), apreensão neurológicas e indução para a produção de anticorpos anti-L-asparaginase (ERVA et al., 2016).

Sabido dessas consequências provocadas pela ação glutaminase da L-asparaginase, há uma questão não esclarecida sobre os reais efeitos dessa atividade. Até o presente momento, não se sabe quanto a ação terapêutica da droga melhora em relação a diminuição da ação glutaminase ou se essa atividade da enzima é necessária para que os efeitos desejáveis existam (KAFKEWITZ; BENDICH, 1983). Uma hipótese sugere que o potencial terapêutico da droga aumenta com o aumento da sua atividade glutaminase e, às vezes, é estritamente necessário para que exista, de fato, o combate às células cancerígenas. Sendo a diminuição de atividade glutaminase responsável por um maior aumento da toxicidade do que da atividade anticâncer, contribuindo para a diminuição do índice terapêutico (DISTASSIO et al., 1982). Em contrapartida, há indícios de que o índice terapêutico da L-asparaginase aumenta devido à diminuição da atividade glutaminase (WARRELL et al., 1982).

O mecanismo de ação da L-asparaginase (Figura 1) não é totalmente elucidado. Entretanto, sabe-se que a hidrólise ocorre em duas etapas, formando beta-acil-enzima como um composto intermediário. No primeiro passo, a treonina nucleofílica ataca o radical carbonil, formando o intermediário e liberando uma molécula de amônia. Em seguida, uma molécula de água ataca o composto intermediário, formando o ácido aspártico (MICHALSKA; JASKÓLSKI, 2006).

**Figura 1 - Mecanismo de ação da L-asparaginase.**



Fonte: WARANGKAR et. al, 2009 (adaptado).

### 1.5.1 L-asparaginase bacteriana

As asparaginases bacterianas são caracterizadas por ter atividade enzimática apenas quando em tetrâmero, mesmo possuindo sítio ativo em todos os monômeros (SWAIN, 1993.)

Uma das L-asparaginases mais amplamente estudada e caracterizada é a L-asparaginase de *Escherichia coli* (Figura 2). Essa bactéria apresenta uma L-asparaginase que possui atividade anti-linfoma, diferentemente das enzimas presentes em levedura (BROOME, 1965) e *Bacillus coagulans* (MASHBURN; WRISTON, 1964). Dois tipos de L-asparaginase, a EC-1 e EC-2. Embora ambas apresentem atividade catalítica de asparagina produzindo ácido aspártico e amônia, a EC-1 não possui efeito aparente antitumoral enquanto a EC-2 possui uma atividade antitumoral característica.

**Figura 2: Estrutura cristalizada (código PDB 3eca) de L-asparaginase de *E. coli*, em que observa-se os 4 monômeros e sua organização para a formação do**

homotetrâmero.



Fonte: SWAIN, 1993.

### **1.5.2 *L*-asparaginase vegetal**

Embora as asparaginases bacterianas possuam uma maior especificidade com asparagina do que as vegetais, as asparaginases vegetais além de possuírem uma atividade asparaginásica possuem também uma atividade isoaspartil peptidase (BEJGER, 2014).

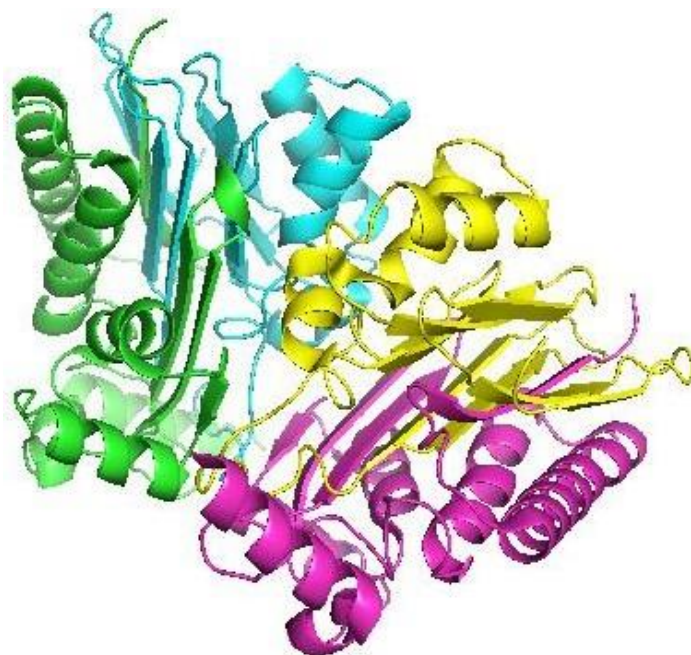
As asparaginases vegetais são divididas em dois grupos, as dependentes e as independentes de íon potássio. Essa dependência está diretamente relacionada com o valor do  $K_m$  (Tabela 1) da enzima para o ligante asparagina, sendo as que possuem dependência possuem um valor de  $K_m$  muito superior na ausência de íon  $K^+$  do que na sua presença. Os átomos de  $K^+$  desempenham um importante papel na estabilização de alças da estrutura da enzima, melhorando a eficiência da catálise (BEJGER, 2014).

Quanto a estrutura, segundo Bejger, são organizadas de maneira tetramérica sendo o tetrâmero formado por dois heterodímeros, que pode ser observada na Figura



3, diferentemente das bacterianas que são formadas por um homotetrâmero (BEJGER, 2014).

**Figura 3: Estrutura da L-asparaginase de *Phaseolus vulgaris* cristalizada disponível no PDB (código 4pu6) em que se observa os 4 monômeros propostos por Bejger.**



Fonte: BEJGER, 2014.

**Tabela 1 - Valores de  $K_m$ ,  $V_{max}$  e  $K_{cat}$  para a L-asparaginase de *Phaseolus vulgaris* na presença e ausência de íons de potássio.**

	$K_m$ (mM)	$V_{max}$ ( $\times 10^{-8}$ mol s $^{-1}$ mg $^{-1}$ )	$V_{max}/K_m$ ( $\times 10^{-8}$ mol s $^{-1}$ mg $^{-1}$ mM $^{-1}$ )	$k_{cat}$ (s $^{-1}$ )
Com íons K	3.71 $\pm$ 1.11	57.1 $\pm$ 8.6	15.8 $\pm$ 2.2	20.4 $\pm$ 3.1
Sem íons K	9.66 $\pm$ 0.80	13.9 $\pm$ 1.0	1.44 $\pm$ 0.09	4.96 $\pm$ 0.36

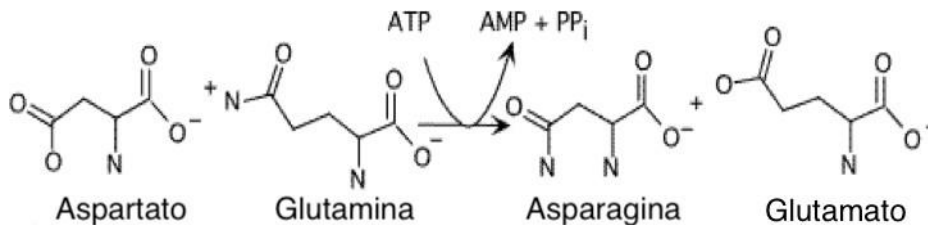
Fonte: BEJGER, 2014.

## 1.6 Asparagina

A asparagina é um aminoácido não essencial e sua biossíntese se dá a partir, principalmente, de duas vias: transaminação da glutamina (Figura 4) ou por adição direta da amônia ao aspartato (Figura 5). Ela possui diversas funções no organismo,

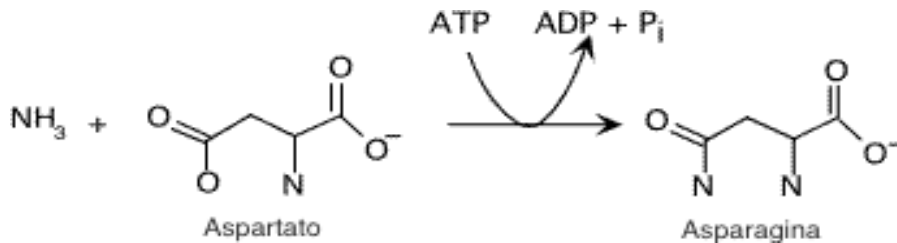
dentre elas a restituição de grupo amina livre através da sua degradação para a síntese de outros aminoácidos ou ácidos nucleicos bem como participação direta na síntese de proteínas (NELSON; COX, 2011).

**Figura 4 - Reação de transaminação da glutamina.**



Fonte: elaborada pelo autor.

**Figura 5 - Reação de adição de amônia ao aspartato.**

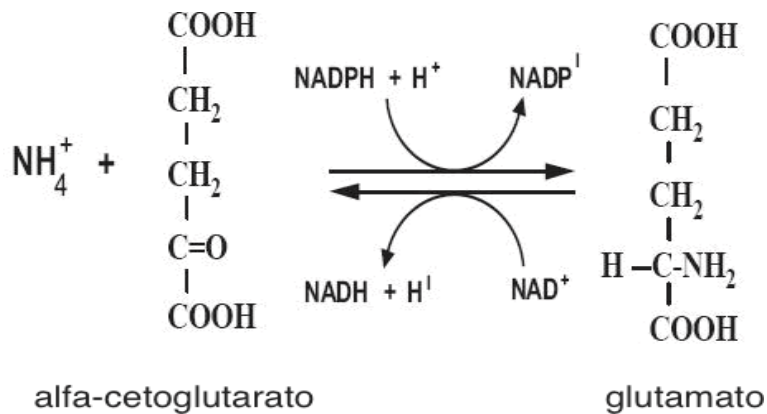


Fonte: elaborada pelo autor.

Uma das reações químicas que sintetizam a asparagina utiliza a glutamina como precursor e esta possui relação direta com as vias metabólicas, como o ciclo do ácido cítrico, em que sua síntese pode ocorrer a partir do alfa-cetoglutarato através do glutamato (NELSON; COX, 2011).

Dessa forma, a síntese de glutamina é induzida pela inibição do complexo da alfa-cetoglutarato desidrogenase, que pode ocorrer por causa de grandes concentrações de NADH, ATP e Succinil-CoA, provocando um acúmulo de alfa-cetoglutarato que é convertido em glutamato pela glutamato desidrogenase (Figura 6) (NELSON; COX, 2011).

**Figura 6 - Reação de conversão entre alfa-cetoglutarato e glutamato.**



Fonte: NELSON; COX, 2011.

### 1.7 Dinâmica Molecular

A estrutura tridimensional de uma proteína está diretamente relacionada com a sua função e, portanto, os detalhes da distribuição tridimensional das moléculas do solvente ao redor da proteína influenciam as suas características de estabilização estrutural e propriedades nas proteínas (NELSON; COX, 2011).

A Simulação de Dinâmica Molecular (DM) é um experimento de controle microscópico e possibilita acessar detalhes atômicos relacionados a sua posição num determinado tempo. Fundamenta-se em fornecer um número grande de configurações moleculares no espaço do sistema, aplicando-se as equações de movimento de Newton para cada átomo da caixa de simulação, durante intervalos de tempo consecutivos. Sabidas as posições e as velocidades dos átomos em um instante de tempo, podemos conhecer suas posições e suas velocidades em um instante posterior. Assim, calcula-se novas forças e resolve-se as equações de Newton novamente (BURKERT; ALLIGNER, 1982).

Na Dinâmica Molecular, o potencial de interação é calculado por meio da equação da Energia Potencial total (FOSTER, 2002) em mecânica molecular:

$$\begin{aligned}
 V = & \frac{1}{2} \sum_{\text{ligações}} k_b (b_{eqm} - b)^2 + \frac{1}{2} \sum_{\text{ângulos}} k_\theta (\theta_{eqm} - \theta)^2 \\
 & + \frac{1}{2} \sum_{\text{torções } \theta} k [1 + \cos(n\phi)] + \sum_{\text{pares } i-j \text{ não ligados}} \left[ \frac{A}{r^{12}} - \frac{B}{r^6} + \frac{q_i q_j}{Dr} \right]
 \end{aligned}$$

Essa equação leva em consideração dois tipos de interações. São elas as interações intermoleculares e intramoleculares. Para os átomos ligados, são considerados os fatores: comprimentos de ligação, ângulos torção e ângulos de ligação. Já para o cálculo do potencial de interação entre de átomos não ligados é calculado a partir do potencial de Lennard-Jones e do potencial de Coulomb entre as cargas atômicas (BURKERT; ALLIGNER, 1982).

Na equação da Energia Potencial total, podemos observar que os três primeiros termos se referem: ao comprimento de ligação, aos ângulos entre os átomos e à torção da ligação, respectivamente. O quarto termo da equação se refere ao cálculo para os átomos não ligados diretamente e para átomos cuja interação é intermolecular, sendo, portanto, considerada as interações de van der Waals e de Coulomb.

Para o termo relacionado aos modelos de ligação,  $b_{eqm}$  é o comprimento de ligação no equilíbrio e  $b$  a deformação desse parâmetro. No termo referente aos ângulos de ligação,  $\theta_{eqm}$  para os valores dos ângulos no equilíbrio e  $\theta$  os valores de deformação dos ângulos. A constante de Hooke é representada por  $k$ , sendo  $k_b$  a constante referente à ligação química e  $k_\theta$  a constante de Hooke relacionada para a restituição do ângulo em equilíbrio entre os três átomos. O terceiro termo refere-se à torção de ligação entre quatro átomos que segue um potencial na função de cosseno.

Em simulação de DM, as posições dos átomos variam de acordo com o tempo e são determinadas através das equações de movimento de Newton (para interações entre  $N$  átomos).

As forças  $\mathbf{F}$  são calculadas pela derivada negativa da razão entre a função do potencial  $V$  e da posição dos átomos  $i$  na posição  $\mathbf{r}$ .

$$\mathbf{F}_i = - \frac{\partial V}{\partial \mathbf{r}_i}$$

$$\mathbf{F}_i = \frac{\partial^2 \mathbf{r}_i}{\partial t^2}, i = 1 \dots N$$

Já os movimentos dos átomos são simulados resolvendo numericamente as equações de movimento, sendo  $\mathbf{r}_i$  a posição,  $t$  o tempo,  $\mathbf{F}_i$  a força e  $m_i$  a massa para  $i$  átomos, onde as variáveis em negrito são grandezas vetoriais.

$$\frac{d^2 \mathbf{r}_i}{dt^2} = \frac{\mathbf{F}_i}{m_i}$$

O *Leap-frog* é o algoritmo utilizado para calcular a posição posterior do átomo, que utiliza a posição  $r$  no tempo  $t$  e velocidades  $v$  no tempo  $t - \frac{1}{2}\Delta t$ . Então a posição e velocidades são atualizadas utilizando a força  $F(t)$  determinada pelas posições no tempo  $t$ , usando as equações:

$$v\left(t + \frac{1}{2}\Delta t\right) = v\left(t - \frac{1}{2}\Delta t\right) + \frac{\Delta t}{m}F(t)$$

$$r(t + \Delta t) = r(t) + \Delta t v\left(t + \frac{1}{2}\Delta t\right)$$

Rearranjando ambas as equações, obtemos a equação utilizada para a atualização de posições atômicas:

$$r(t + \Delta t) = 2r(t) - r(t - \Delta t) + \frac{1}{m}F(t)\Delta t^2$$

As posições de cada átomo são armazenadas e constituem uma trajetória atômica que é usada para as análises.

## 1.8 Modelagem Molecular

A elucidação dos mecanismos de ação de enzimas pode ser feita pela integração de diversas áreas de conhecimento como Bioquímica, Química Orgânica e Biologia Molecular (CARVALHO et al., 2003). A modelagem integra-se em um amplo conjunto métodos computacionais que assistem nessa compreensão, proporcionando uma maior eficiência do processo de planejamento racional de compostos (SANT'ANNA, 2009).

Segundo a IUPAC (União Internacional de Química Pura e Aplicada), a técnica de Modelagem Molecular pode ser definida como a averiguação de estruturas e propriedades moleculares pelo uso de Bioquímica Computacional. Além de técnicas de visualização gráfica, objetivando fornecer uma reprodução tridimensional, sob um dado conjunto de circunstâncias (SANT'ANNA, 2009).

Por meio da modelagem molecular, é possível prever a estrutura tridimensional de uma molécula e realizar cálculos para alcançar as geometrias de energias mínimas (RODRIGUES, 2001).

Existem diversos métodos para a modelagem molecular de proteínas, dentre eles destacam-se os métodos clássicos, como a DM, que utiliza uma simulação em função do tempo para estudar o comportamento de um sistema molecular utilizando

campos de força clássicos (YOUNG, 2001); os métodos quânticos, que são capazes de fornecer dados que se aproximam dos obtidos de forma experimental, utilizam, dentre outros modelos de aproximação, a aproximação de Born-Oppenheimer (ATKINS; PAULA, 2004); métodos *ab initio* a predição de estrutura de proteína ou peptídeo refere-se a um processo algorítmico pelo qual a estrutura terciária de proteína é prevista a partir de sua sequência primária de aminoácidos, em que os cálculos realizados não utilizam dados experimentais para auxiliar na resolução (YOUNG, 2001), como o I-TASSER.

### **1.8.1 I-TASSER**

O I-TASSER (*Iterative Threading Assembly Refinement*) é um programa que possui uma abordagem hierárquica para a predição de estrutura e função de proteínas. Esse programa identifica modelos estruturais depositados no PDB através de várias abordagens LOMETS (*Local Meta-Threading-Server*) com modelos atômicos completos construídos por simulações de montagem de fragmentos baseados em modelos iterativos (YANG et al., 2015).

A primeira etapa de predição é a submissão de sequências de aminoácidos e a posterior busca proteínas com conformação de estrutura secundária parecidas. Na segunda etapa, os fragmentos contínuos extraídos dos modelos do PDB são remontados em modelos completos por simulações de Monte Carlo com a troca de réplica com as regiões não alinhadas (principalmente alças) construídas por modelagem *ab initio*. Nos casos em que nenhum modelo apropriado é identificado por LOMETS, o I-TASSER irá construir as estruturas inteiras por modelagem *ab initio* (ZHANG; ROY; KUCUKURAL, 2010).

Na terceira etapa, a simulação da montagem do fragmento é executada a partir do *cluster* SPICKER, onde as restrições espaciais coletadas dos modelos LOMETS e das estruturas PDB pelo *TM-align* são usadas para guiar as simulações. O objetivo da segunda iteração é remover o conflito estérico e refinar a topologia global do cluster. As estruturas geradas nas segundas simulações são agrupadas e as de menor energia são selecionadas. Os modelos atômicos completos finais são obtidos pelo REMO, que constrói os detalhes atômicos a partir das estruturas geradas, através da otimização da rede de ligação de hidrogênio (ZHANG, 2008).

### **1.8.2 Annealing usando Dinâmica Molecular**

O mecanismo de enovelamento de proteínas fornece muitas informações sobre a função da proteína ou do peptídeo. No entanto, considerando o número de novas sequências que são entregues por cada projeto de genoma, estimativas atuais do número de sequências de código peptídico hipotético nos genomas procarióticos completos disponíveis hoje são da ordem de 1,5 milhões, o que é muito maior em eucariotos (DESCHAVANNE et al., 2014). Assim, a maioria das estruturas proteicas ou peptídicas ainda são desconhecidas. Outro fator que contribui para a dificuldade de resolver as estruturas proteicas é a dificuldade de realizar o estudo experimental do mecanismo de dobramento. Para solucionar esse problema, técnicas de simulação de dinâmica molecular, como forma complementar à metodologia experimental, são frequentemente utilizadas para predição e otimização de estruturas proteicas (VOELZ et al., 2012).

As técnicas de simulação molecular para predição da estrutura de proteínas podem ser divididas em modelagem comparativa e predição *ab initio*.

A estrutura tridimensional de uma proteína pode ser prevista através de modelagem comparativa baseada na sequência de aminoácidos e estruturas de proteínas já conhecidas oriundas de metodologias experimentais, como a cristalografia de proteínas com mais de 30% de identidade de sequência com a proteína em estudo (BAKER; SALI, 2001).

Entretanto, os resultados provenientes de modelos comparativos geralmente resultam em baixa precisão devido a erros como de imprecisão de alinhamento das sequências e da incapacidade de identificar e modelar corretamente os domínios, principalmente regiões com grande mobilidade, como alças (CAVASOTTO; PHATAK, 2009).

Outro problema enfrentado é que mesmo as proteínas com alta identidade de sequência podem ter diferentes estruturas nativas (WU et al., 2013). Além disso, quando estamos diante de proteínas com grande número de resíduos, existem um número limitado de estruturas de solução disponíveis, o que dificulta a comparação estrutural (SHEN, et al., 2014).

Atualmente, alguns dos métodos *ab initio* de maior sucesso têm uma probabilidade razoável de prever o enovelamento de pequenas proteínas de domínio único dentro de 1,5 angstroms em toda a estrutura.

Utilizar a simulação de DM para realizar predição de estrutura de proteína ou peptídeo é um dos principais tipos de métodos *ab initio*, que incluem dinâmica molecular convencional e dinâmica molecular com *annealing*. Para melhorar a amostragem conformacional, o algoritmo deve iniciar a simulação em uma temperatura e aumentá-la para superar barreiras seguidas por um resfriamento gradual (*annealing*) para alcançar condições de baixa energia próxima do mínimo (KIRKPATRICK; GELATT; VECCHI, 1983).

Dessa forma, simulações de DM com *annealing* é uma forma de otimização de estruturas a partir de modelagem comparativa de proteínas.

### 1.9 Docking Molecular

O *docking* molecular é uma técnica *in silico* para prever as conformações de ligação entre moléculas quando há a possibilidade de formação de um complexo entre elas (LENGAUER; RAREY, 1996). Alguns compostos como ácidos nucleicos, proteínas, lipídeos, carboidratos entre outros compostos orgânicos podem causar mudanças estruturais em proteínas quando forma um complexo de ligação. Devido à relação entre a função e estrutura das proteínas, as diferentes formas apresentadas pela proteína são responsáveis pelas diversas funções desempenhadas no organismo (VERLI, 2014).

Embora houve um avanço tecnológico significativo para a caracterização estrutural de proteínas através de técnicas como difração de raios X, ressonância magnética nuclear e crio eletromicroscopia e posterior depósito em banco de dados online como o PDB, ainda há diversos empecilhos na cristalização de alguns complexos, em razão do tempo para a obtenção do cristal e altos custos, seja para determinadas condições de cristalização ou para execução de técnicas como a ressonância magnética e crio eletromicroscopia. (ACHARYA; LLOYD, 2005). Além disso, outra dificuldade encontrada é a obtenção de cristais de complexos com duas ou mais proteínas, pois há a necessidade de um maior grau de organização para sua formação e ao elevado peso molecular que apresentam (DOMINGUEZ et al., 2003).

O uso de *docking* molecular pode ser usado como possibilidade para deslindar esses empecilhos, pois não exigem grandes custos computacionais na realização de cálculos e não necessitam de amostras biológicas da molécula alvo. Ademais, possui



um rápido processamento capaz de gerar resultados razoáveis em um pequeno intervalo de tempo.

Outra característica é permitir análise de interações entre os compostos a nível molecular e proporcionar informações a respeito da energia livre (MENG et al., 2011). Cada *software* disponível para execução de cálculos através de algoritmo de *docking* molecular utiliza uma função score fundamentada em parâmetros físico-químicos, como a complementaridade de superfície, as interações de Van der Waals e as interações eletroestáticas pelo potencial de Coulomb, objetivando a revelação de potenciais químicos, levando em consideração a energia livre obtida na conformação resultante obtida (GILSON et al., 1997). Assim sendo, o *docking* molecular é capaz de prever sítio catalítico desconhecido (HETÉNYI; SPOEL, 2002), implicações sobre as conformações de ligantes e receptores.

Através do *docking* é possível tornar ambas as moléculas envolvidas totalmente flexíveis no sistema, requerendo um maior custo computacional; uma rígida, com alguns resíduos flexíveis, e a outra flexível; e uma totalmente rígida e a outra flexível (TROTT; OLSON, 2009).

O HADDOCK (*High Ambiguity Driven biomolecular Docking*) é um programa que possui uma abordagem de acoplamento flexível acionada por informações para a modelagem de complexos biomoleculares (DOMINGUEZ et al., 2003). O HADDOCK distingue-se de outros métodos de *docking* incorporando uma ampla variedade de dados experimentais e de bioinformática para conduzir a modelagem (BONVIN et al, 2010). Isso permite concentrar a pesquisa em partes relevantes do espaço de interação usando um tratamento mais sofisticado da flexibilidade conformacional.

As regiões de interface das moléculas podem ser definidas por estratégias experimentais, como espectrometria de massa e ressonância magnética nuclear. Quando dados experimentais não estão disponíveis ou são suficientes, esta informação pode ser complementada por previsões de bioinformática (de VRIES; BONVIN, 2008). Essas diversas fontes de informações geralmente apenas identificam ou preveem regiões de interface, mas não definem os contatos em uma interface. O HADDOCK lida com isso implementando restrições de interação ambíguas (AIRs) que forcem as interfaces a se unirem sem impor uma orientação particular (BONVIN et al, 2010).

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo Geral

Estudar a estabilidade estrutural da L-asparaginase de *Phaseolus vulgaris* a fim de comparar seu sítio ativo com a da L-asparaginase de *E. coli*.

### 2.2 Objetivos Específicos

- 2.2.1 Modelagem do sítio ativo da L-asparaginase de *P. vulgaris*
- 2.2.2 Estudar a estabilidade do sítio ativo da L-asparaginase de *P. vulgaris* e *E. coli*;
- 2.2.3 Estudar a interação do substrato asparagina com o sítio ativo de *P. vulgaris* e *E. coli*;
- 2.2.4 Comparar os dados de estabilidade das proteínas para obter informações sobre os determinantes estruturais de estabilização da L-asparaginase de *P. vulgaris* e *E. coli*;
- 2.2.5 Comparar a estabilidade de alças cujos resíduos participam ou interferem na manutenção estrutural do sítio catalítico da L-asparaginase de *P. vulgaris* e *E. coli*.

## 3 METODOLOGIA

### 3.1 Obtenção das estruturas de L-asparaginase

As coordenadas dos átomos da L-asparaginase de *E. coli* foram obtidas das estruturas cristalinas depositadas no PDB, Banco de Dados de Proteínas, (em inglês *Protein Data Bank*), através do 3eca (SWAIN, 1993).

As coordenadas dos átomos da L-asparaginase de *P. vulgaris* foram obtidas no PDB através do código 4pu6 (BEJGER et al., 2014) e seu arquivo foi editado para a exclusão de heteroátomos.

O arquivo de coordenadas da L-asparaginase de *P. vulgaris* possui uma quebra de continuidade na sua estrutura terciária referente aos resíduos 160 a 198, que fazem parte de uma região de alça que compõe o sítio ativo, principalmente o resíduo de Thr198, tido como o resíduo nucleofílico (BEJGER et al., 2014).

### **3.2 Modelagem da alça da L-asparaginase de *Phaseolus vulgaris***

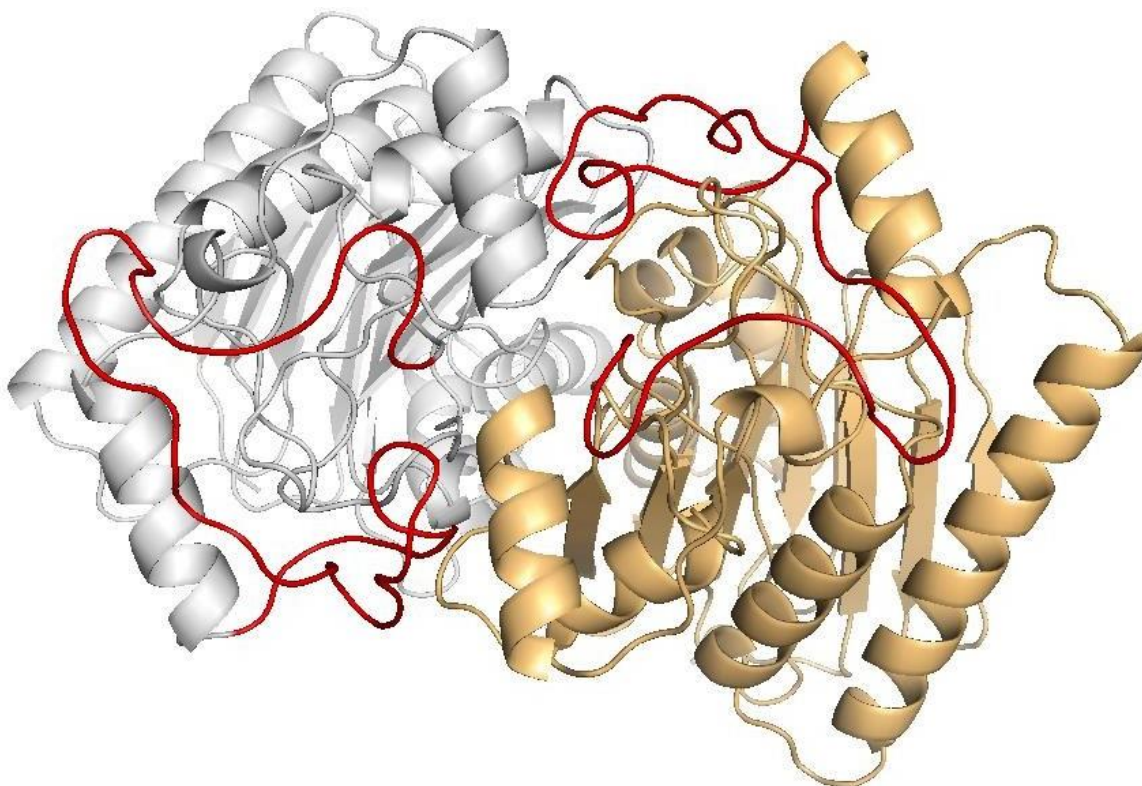
A fim de obter a estrutura que faltava da proteína foi utilizado o programa I-TASSER, que se baseia em modelagem molecular por técnica de *ab initio*. Foram utilizadas como base para a modelagem algumas estruturas de proteínas conhecidas, dentre elas a L-asparaginase de *E. coli*.

A sequência de aminoácidos da enzima foi submetida juntamente com um arquivo que continha as distâncias entre os carbonos alfa de todos os resíduos que foram obtidas a partir da estrutura cristalográfica (BEJGER, 2014), restringindo a posição desses átomos. Dessa forma, o programa I-TASSER ao modelar a proteína manteve as mesmas posições espaciais dos resíduos obtidos experimentalmente, modelando apenas os resíduos compreendidos na alça (160 a 198), de maneira livre. Assim, a estrutura final obtida possui apenas a alça modelada diretamente na estrutura (Figura 7) proveniente do cristal (BEJGER, 2014).

Após obter o arquivo de saída (Figura 7), a modelagem foi complementada com Dinâmica Molecular em algumas situações, dentre elas: sistema congelado com as alças livres, sistema inteiro sem restrição e sem *annealing* em condições NPT, proteína inteira com *annealing*, proteína congelada com alças livres submetidas ao *annealing* e proteína inteira congelada com alças livres sem *annealing*.

**Figura 7 - Estrutura de L-asparaginase de *Phaseolus vulgaris* obtida após a**

**modelagem das alças (em vermelho) pelo I-TASSER.**



Fonte: elaborada pelo autor.

O protocolo de *annealing* foi realizado aquecendo o sistema partindo de 310K até uma temperatura de 400K seguindo do resfriamento até a temperatura inicial e repetindo esse processo três vezes durante a DM. Também foi realizada DM em sistemas com a temperatura constante de 310K.

### **3.3 Composição do sistema a ser submetido a Dinâmica Molecular**

As coordenadas atômicas espaciais das proteínas foram usadas para compor um sistema com moléculas de água do tipo SPC (BERENDSEN et al., 1984) e íons  $\text{Na}^+$  e  $\text{Cl}^-$  para deixar o sistema com uma concentração de 0,15 M. As proteínas foram submetidas ao programa H++ (GORDON et al., 2005) para analisar o estágio de protonação dos resíduos considerando o  $\text{pH} = 7$ . As lisinas, as argininas, os ácidos aspárticos e glutâmicos foram considerados com as cadeias laterais ionizadas.

Quanto as histidinas, para a L-asparaginase de *E. coli* (His87, His183 e His197), foram considerados diferentes estados de protonação. A His87 apresenta

estado de protonação no nitrogênio delta em todos os monômeros. A His183 apresenta estado de protonação no nitrogênio epsilon nos monômeros 1 e 3 e dupla protonação nos nitrogênios delta e epsilon nos monômeros 2 e 4. Já a His197 apresenta dupla protonação nos nitrogênios delta e epsilon em todos os monômeros.

Para a L-asparaginase de *P. vulgaris* (His11, His119, His275 e His282) também foram considerados diferentes estados de protonação. Entretanto elas apresentam o mesmo perfil nos dois domínios da proteína, em que as His11 e His275 apresenta estado de protonação no nitrogênio epsilon e as His119 e His282 apresentam dupla protonação, nos nitrogênios epsilon e delta.

O campo de força utilizado é o GROMOS53A6 (OOSTENBRINK et al., 2004). O sistema será acondicionado numa caixa de formato dodecaédrico e com tamanho suficiente para considerar as imagens do sistema. Nesse caso a caixa é dimensionada considerando a maior distância entre átomos da proteína, somando-se a esse diâmetro 2.0 nm.

Os algoritmos SETTLE (MIYAMOTO; KOLLMAN, 1992) e LINCS (HESS, 2008) são usados para manter a geometria do solvente e do soluto. As interações de curto e de longo alcance são consideradas dentro de um raio de corte ( $r_c$ ) padrão de 1,4 nm e as correções necessárias no potencial eletrostático são feitas usando Particle Mesh Ewald (DARDEN; YORK; PEDERSEN, 1993) para considerar as cargas fora do  $r_c$ . O potencial de curto alcance para van der Waals usado é o método de *cut-off* também em 1,4 nm.

Uma vez montado, o sistema precisa ser termalizado para correção de desvios de geometria na proteína e, em seguida, correção na orientação do solvente em relação ao soluto. Um protocolo para minimização de energia no sistema é usado seguindo passos de Mecânica Molecular e DM em tempos de integração sucessivos com incremento pequenos, sendo considerado inicialmente o congelamento da proteína, como mostrado na Tabela 2.

Na primeira fase de termalização é usada a mecânica molecular o algoritmo *Conjugate Gradient* para a minimização de energia, através de correção das geometrias entre grupos de átomos da proteína. Na segunda e na terceira fase é usada a DM para simular o sistema no conjunto NVT que significa que, N é o número de átomos fixo, V é o volume do sistema que é fixo e T, a temperatura controlada pelo algoritmo de V-rescale (BUSSI; DONADIO; PARRINELLO, 2007). Três simulações curtas são realizadas com as posições atômicas da proteína congelada, onde

somente as moléculas de água podem se movimentar. Esse procedimento possibilita a estruturação da rede de ligações de hidrogênio ao redor da proteína e minimizar a energia do sistema, considerando a temperatura de 310 K. Em sequência, o sistema foi submetido a 5 simulações curtas de DM no conjunto NPT, onde N é o número de átomos fixo, a pressão é controlada pelo algoritmo de Berendsen (BERENDSEN et al., 1984) e temperatura controlada por V-rescale (BUSSI; DONADIO; PARRINELLO, 2007). Antes de realizar as DM 4 e 5 é adicionado íons  $\text{Na}^+$  e  $\text{Cl}^-$  ao sistema, o suficiente para manter a concentração de 0,15 M.

**Tabela 2 - Parâmetros utilizados na equilibrção dos sistemas simulados.**

Pr`s	Integrator	dt (ps)	nstep	Ensemble (conjunto)
1	Md	0,0002	5000	NVT
2	Md	0,001	5000	NVT
3	Md	0,002	5000	NVT
4	Md	0,0002	5000	NPT
5	Md	0,001	5000	NPT
6	Md	0,001	5000	NPT
7	Md	0,001	5000	NPT
8	Md	0,002	5000	NPT

### 3.4 Programas para analisar as trajetórias de Dinâmica Molecular

#### 3.4.1 Avaliação da estabilidade estrutural

A avaliação da estabilidade estrutural foi feita por Desvio Quadrático Médio (DQMD), ou em inglês RMSD (*Root Mean Square Deviation*), que representa o desvio quadrático médio entre uma estrutura de referência e as estruturas obtidas através da simulação. A estrutura de referência para os cálculos do RMSD foi a primeira estrutura no tempo igual a zero da simulação. A expressão que calcula o RMSD é:

$$RMSD(t) = \left[ \frac{1}{M} \sum_{i=1}^N m_i \|r_i(t) - r_i(t_{ref})\|^2 \right]^{\frac{1}{2}}$$

Os desvios são calculados pela soma do quadrado da diferença das coordenadas atômicas dos C $\alpha$  em um dado tempo,  $r_i(t)$ , pelas coordenadas atômicas dos C $\alpha$  em um tempo de referência,  $r_i(t_{ref})$ , para  $i$  átomos. Onde M é a soma das massas dos C $\alpha$  envolvidos na análise.

Esse processo permite que as estruturas obtidas no decorrer da simulação sejam sobrepostas à estrutura de referência escolhida e em seguida a distância entre os mesmos átomos é calculada, permitindo a quantificação da diferença de uma

estrutura para a outra em função do tempo. Dessa forma, é possível identificar quanto tempo de simulação foi necessário para que a estrutura alcançasse sua estabilidade ou se ainda seria necessário simular por mais tempo até obter que a proteína alcançasse a estabilidade estrutural, além de calcular a média e o desvio de RMSD da proteína.

### **3.4.2 Ligações de Hidrogênio**

Segundo a União Internacional de Química Pura e Aplicada, IUPAC ( em inglês, *International Union of Pure and Applied Chemistry*), a ligação de hidrogênio é um tipo de interação intermolecular resultante de interações entre determinados átomos que ocorre devido à capacidade de um átomo de hidrogênio em atuar como ligação entre dois átomos eletronegativos (ARUNAN et al., 2011). A ligação de hidrogênio é extremamente importante na química de proteínas e no estudo da sua estabilidade, pois é considerada a maior força coesiva que atua entre as moléculas que possuem principalmente grupo amino e hidroxila, sendo os grupos hidroxila e carbonila os maiores aceptores de prótons (JEFFREY; SAENGER, 1991). Entretanto, as ligações de hidrogênio também estão presentes em outros grupos (WATSON; CRICK, 1953).

Do ponto de vista físico químico, as ligações de hidrogênio (LH) pode ser basicamente um tipo de interação dipolo-dipolo ou como uma interação entre dipolos presentes em ligações, por exemplo a LH entre carbonila (C=O) e amina (N-H) da cadeia principal de proteínas (C=O H-N) (ARUNAN et al., 2011).

A quantificação das LHs é feita através de porcentagem de observações de LH entre dipolos presentes em ligações químicas na proteína, sendo as combinações de dipolo de átomos da cadeia principal e cadeia lateral, formadas durante o tempo de análise da trajetória de DM, seguindo o critério de identificação de LHs proposta pela IUPAC, em que o ângulo de interação entre o átomo de hidrogênio e o átomo eletronegativo (X-H .....Y) deve ser maior que 165° e a distância (H Y) entre eles seja menor de 0,3 nm, sendo X o doador de Hidrogênio e Y o acceptor. Para efeitos de cálculo da geometria (X-H Y-Z). A LH ocorre entre dois dipolos, em que o par X-H é denominado como um dipolo e o segundo dipolo é definido por Y-Z, onde Z é o átomo ligado diretamente a Y, que é o acceptor (ARUNAN et al., 2011).



A análise das LHs entre os átomos do sistema foram feitas através de dados gerados por um programa feito pelo grupo de pesquisa da Fundação Oswaldo Cruz Ceará. As LH são usadas para definir os contatos entre os domínios da enzima.

### 3.5 Docking

O *docking* foi realizado utilizando o programa HADDOCK. Foi submetida a estrutura final obtida a partir da Dinâmica Molecular identificando os resíduos de interação com o ligante asparagina.

Os resíduos identificados foram catalogados por Bejger (BEJGER, 2014) como sendo Asp229, Gly249, Arg226, Thr198, Gly251 e Thr248.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Dados para o RMSD após a modelagem das alças pelo I-TASSER e DM de *Phaseolus vulgaris*

O perfil do RMSD é muito utilizado para observar quando a estrutura da proteína, em água, alcança um equilíbrio, possibilitando determinar o momento que as propriedades estruturais podem ser extraídas. As oscilações nos perfis indicam o quanto instável pode ser a estrutura em água.

Foram submetidas à essa análise as simulações em que houve restrição de posição para a proteína, mas com as alças modeladas livres, tanto com o protocolo de *annealing* quanto apenas no sistema sem aquecimento.

A Figura 8 representa o perfil de RMSD, em que podemos observar que o perfil da dinâmica molecular sem *annealing* tanto a alça 1 como a alça 2 não adquirem uma estabilidade estrutural em 100 ns de simulação. Para a alça 1, a média do RMSD foi de  $0,40 \pm 0,07$ nm (Tabela 3) e não foi alcançado o equilíbrio estrutura, sendo necessário uma simulação em maior tempo para observarmos se haveria ou não uma estrutura estável. Para a alça 2, entretanto, há a obtenção de uma estrutura estável desde o começo da simulação, mas ela perde sua organização inicial após aproximadamente 62 ns, acompanhando parcialmente o perfil da alça 1, com uma média de  $0,37 \pm 0,04$  nm.

Para a simulação com *annealing* pode-se perceber que a alça 2 mantém sua estrutura inicial estabilizada durante toda a simulação, alcançando o equilíbrio em 10 ns com uma média de  $0,18 \pm 0,02$  nm de RMSD mesmo com o aquecimento, o que demonstra sua grande estabilidade. Já para a alça 1 a estabilidade não é alcançada no período simulado, sendo necessário um maior tempo de simulação para atingi-la, em que apresenta média de RMSD de  $0,47 \pm 0,05$  nm.

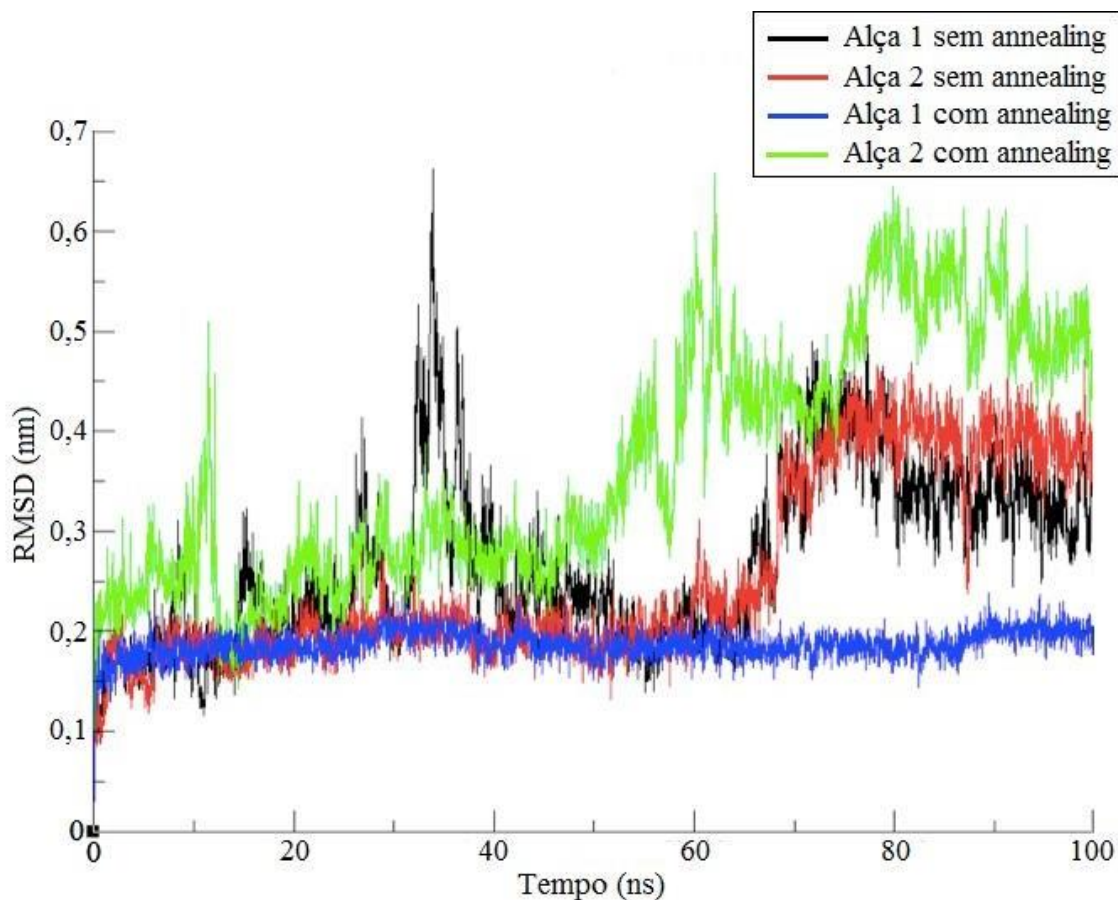
Na tabela 3 nota-se que os perfis de RMSD médio das alças sem *annealing* não apresentam uma estabilidade estrutural no tempo observado, mesmo a sua alça 2 sendo um pouco mais estável que a alça 2 da DM com *annealing*. Entretanto, a alça 1 da DM com *annealing* apresentou uma menor média de desvio que a alça 1 da DM sem *annealing* e alcançou o equilíbrio.

**Tabela 3 - Médias e desvio padrão dos RMSD para as alças de *Phaseolus vulgaris* com e sem *annealing*.**

	<i>Annealing</i>	Média $\pm$ s (nm)
<b>Alça 1</b>	Não	$0,40 \pm 0,07$
<b>Alça 2</b>	Não	$0,37 \pm 0,04$
<b>Alça 1</b>	Sim	$0,47 \pm 0,05$
<b>Alça 2</b>	Sim	$0,18 \pm 0,02$

s = desvio padrão

**Figura 8 - Gráfico do Perfil RMSD das alças de *Phaseolus vulgaris* com e sem annealing.**



#### 4.2 Dados de RMSD da L-asparaginase de *Phaseolus vulgaris* submetida a DM

Após obter a conformação final da modelagem pelo I-TASSER em conjunto da DM, a estrutura foi submetida a uma nova simulação de DM por 200 ns em uma caixa d'água.

Foi analisado o perfil RMSD da proteína sem levar em consideração a movimentação das alças modeladas (Figura 9) Podemos observar que até o tempo 100 ns não há variação de estrutura pois ela estava congelada, somente com suas alças livres, entretanto a partir desse tempo ela apresentou um perfil RMSD médio de  $0,35 \pm 0,05$  nm, alcançando o equilíbrio no tempo 125 ns.

As alças foram analisadas em conjunto (Figura 10), alcançando o equilíbrio no tempo 155 ns, apresentando um RMSD médio de  $0,58 \pm 0,07$  nm e analisadas de forma isolada (Figura 11), em que a alça 1 apresentou um perfil de RMSD médio de

0,54 ± 0,03 nm com um tempo de equilíbrio igual 128 ns e a alça 2 demonstra um perfil de RMSD médio de 0,52 ± 0,03 nm também atingindo o equilíbrio em 128 ns (Tabela 4).

**Tabela 4 - Médias e desvio padrão dos RMSD para as alças de *Phaseolus vulgaris* e a proteína sem levar em consideração a movimentação de suas alças.**

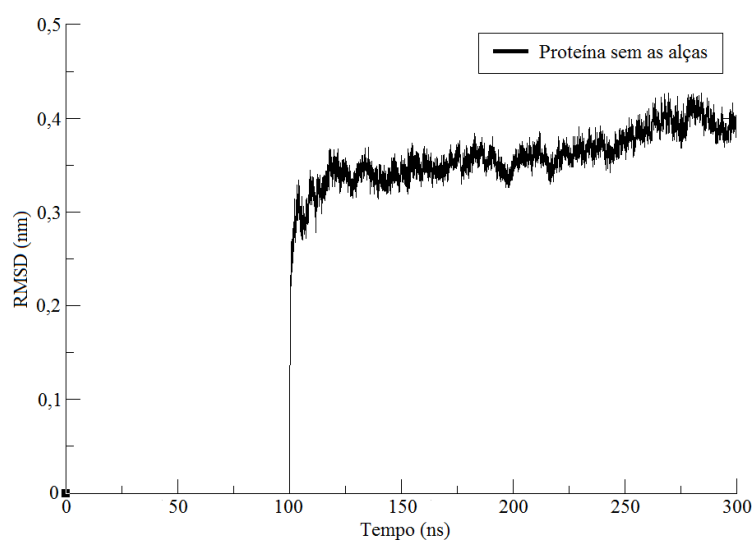
	Média ± s (nm)
<b>Proteína sem alças</b>	0,35 ± 0,05
<b>Alça 1</b>	0,54 ± 0,03
<b>Alça 2</b>	0,52 ± 0,03
<b>Alça 1 e 2</b>	0,58 ± 0,07

s = desvio padrão

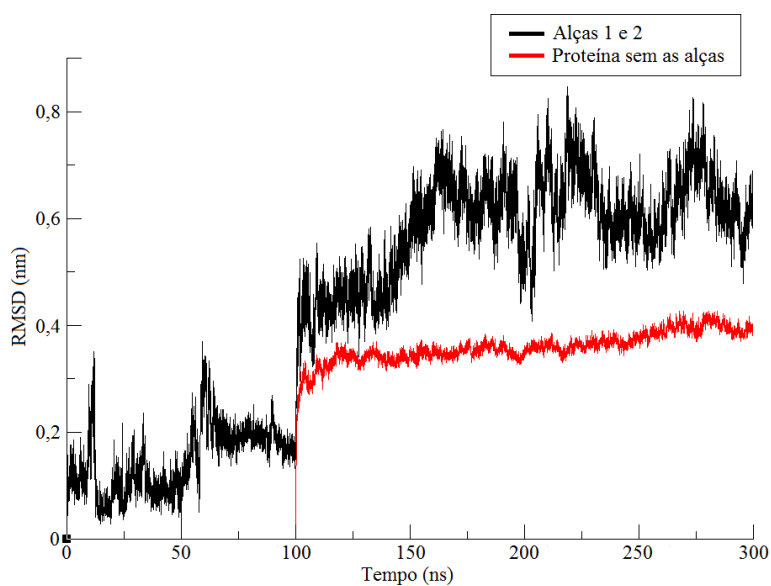
Na Figura 12 podemos observar o perfil de RMSD comparativo entre as alças analisadas de maneira isoladas e em conjunto e juntamente com os dados da Tabela 4 vemos que o perfil da alça 2 é semelhante com o da alça 1, corroborando com a premissa de que a modelagem a partir da metodologia por *annealing* proporcionou um modelo mais próximo da realidade, em que a estrutura final da simulação de DM não difere de maneira significativa da estrutura pós modelagem.

A estabilidade das alças é de suma importância pois fazem parte diretamente do sítio ativo e por serem regiões de grande oscilação acredita-se que os movimentos são necessários para a abertura do resíduo catalítico Thr198 ao substrato asparagina. Dessa forma, com as alças devidamente modeladas e com a estrutura final pós DM pode-se estudar as interações que ocorrem entre os resíduos do sítio e a asparagina.

**Figura 9 - Perfil RMSD somente da proteína sem as alças modeladas.**



**Figura 10 - Perfil RMSD da proteína sem as alças modeladas e das alças modeladas em conjunto (Alças 1 e 2).**



**Figura 11 - Perfil RMSD das alças do monômero 1 (Alça 1) e monômero 2 (Alça**

2) de *Phaseolus vulgaris* modeladas isoladamente.

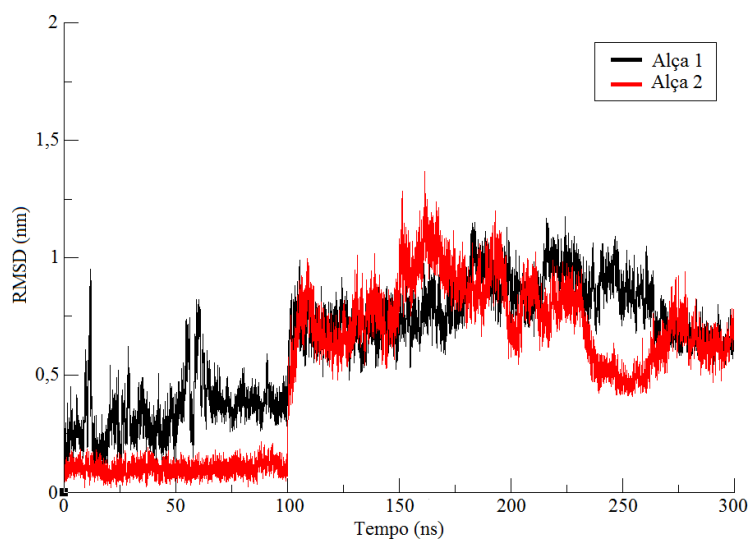
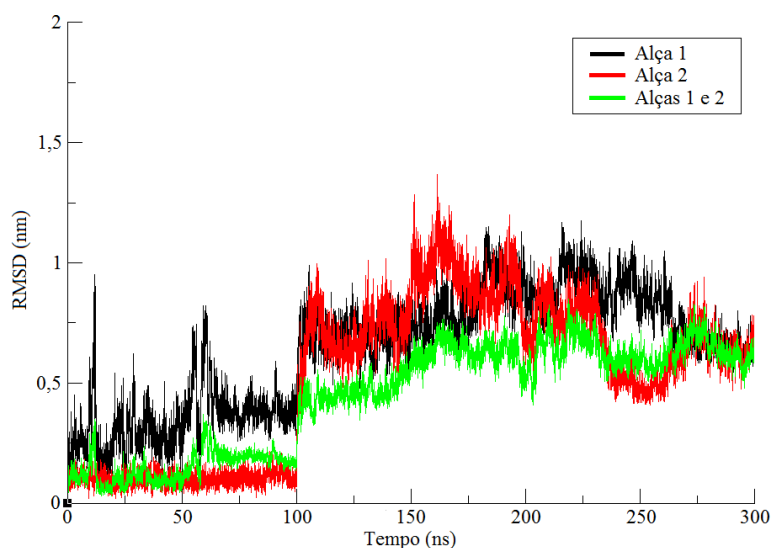


Figura 12 - Perfil de RMSD comparativo entre as alças de *Phaseolus vulgaris* analisadas de maneira isoladas e em conjunto (Alças 1 e 2).



#### 4.3 Dados de RMSD da estrutura quaternária de L-asparaginase de *E. coli* submetida a DM

A Figura 13 mostra o perfil de RMSD da alça na DM do monômero. Nota-se uma variação muito grande de RMSD ao longo do tempo de simulação. Contudo, após 20 ns admite-se o alcance do equilíbrio. O RMSD médio da alça é de  $0,30 \pm 0,04$  nm e está descrito na Tabela 6.

Para a simulação do dímero, os perfis de RMSD da alça nos Mo1 (monômero 1) e Mo2 (monômero 2) são mostrados na Figura 14. Os desvios e médias descritos na Tabela 6 possibilitam definir que a alça do Mo2 movimentada mais que a alça do Mo1. Na alça do Mo1 o RMSD médio é de  $0,39 \pm 0,02$  nm. Já a alça do Mo2, apresenta um RMSD médio igual a  $0,60 \pm 0,06$  nm.

A alça do Mo2 apresenta ainda mais instabilidade em comparação a alça do Mo1, indicando que a alça do Mo2 possui uma maior movimentação, contribuindo para uma maior oscilação do dímero.

Os perfis RMSD das alças (Figura 15) demonstram que a alça do Mo1 possui o maior RMSD entre os monômeros do tetrâmero ( $0,65 \pm 0,07$  nm). A alça do Mo3 (monômero 3) é um pouco menor ( $0,40 \pm 0,04$  nm) e para Mo2 e Mo4 (monômero 4) são similares, dados disponíveis na Tabela 6. Isso evidencia que cada alça do monômero possui um comportamento de movimentação diferenciado para cada monômero. A alça do Mo1 possui o maior desvio da média entre os monômeros e essa movimentação contribui para aumento das variações na estrutura de Mo1 e, conseqüentemente, na estrutura do tetrâmero.

Um comportamento bastante interessante é que o nível de variação da estrutura do monômero isolado (Tabela 5) em água mostrou-se menor do que os monômeros na estrutura quaternária do dímero, implicando que os monômeros têm estrutura terciária menos estáveis na forma dimérica.

Quanto aos monômeros que estão na forma tetramérica, esses possuem variações em sua estrutura menor que a do monômero isolado em água. Contudo, comparando os dados das Tabelas 5 e 6, as movimentações das alças tiveram pouco impacto na manutenção da estrutura geral dos monômeros (Figura 16), nos diferentes sistemas, assim como na manutenção da estrutura quaternária do dímero e tetrâmero.

Portanto, esses dados nos permitem afirmar que essas oscilações estruturais são devidas à grande movimentação das alças, caracterizando-as como uma estrutura bastante móvel e instável que apresenta diferentes conformações estruturais durante a simulação de DM. Isso implica que o movimento dessas alças em cada monômero está dissociado da estabilidade total da enzima e que sua estabilização

seja condicionante para manutenção da atividade catalítica. No caso o que se avalia é que é necessário que essa movimentação dessa alça ocorra, provavelmente, para dar acesso ao substrato ao sítio catalítico.

**Tabela 5 - Médias e desvio padrão dos RMSD para o monômero, dímero e tetrâmero e individualmente, para cada um dos monômeros, após o alcance do equilíbrio no instante  $t_{eq}$ .**

	Unidade	Média $\pm$ s (nm)	$t_{eq}$ (ns)
<b>Tetrâmero</b>	Mo1	0,29 $\pm$ 0,02	30
	Mo2	0,22 $\pm$ 0,01	30
	Mo3	0,20 $\pm$ 0,01	30
	Mo4	0,22 $\pm$ 0,01	30
	Tetrâmero	0,27 $\pm$ 0,01	30

s = desvio padrão

**Tabela 6 - Médias e desvio padrão dos RMSD para as alças nos monômeros das três DMs. Dados mostrados para as alças de cada monômero das L-asparaginases.**

	Unidade	Média $\pm$ s (nm)
<b>Monômero</b>	Mo1	0,30 $\pm$ 0,04
<b>Dímero</b>	Mo1	0,39 $\pm$ 0,02
	Mo2	0,60 $\pm$ 0,06
<b>Tetrâmero</b>	Mo1	0,65 $\pm$ 0,07
	Mo2	0,28 $\pm$ 0,05
	Mo3	0,40 $\pm$ 0,04
	Mo4	0,30 $\pm$ 0,02

s = desvio padrão



Figura 13 - Perfil de RMSD da alça na DM do monômero de *E. coli*.

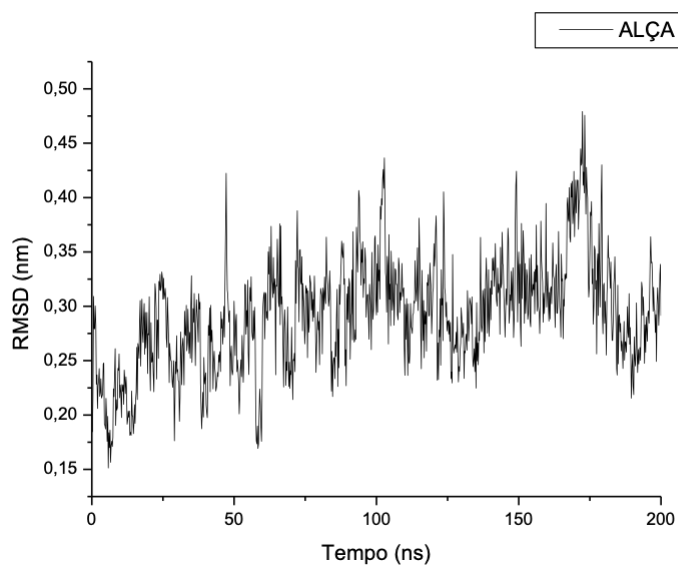


Figura 14 - Perfis de RMSD da alça nos Mo1 e Mo2 de *E. coli*.

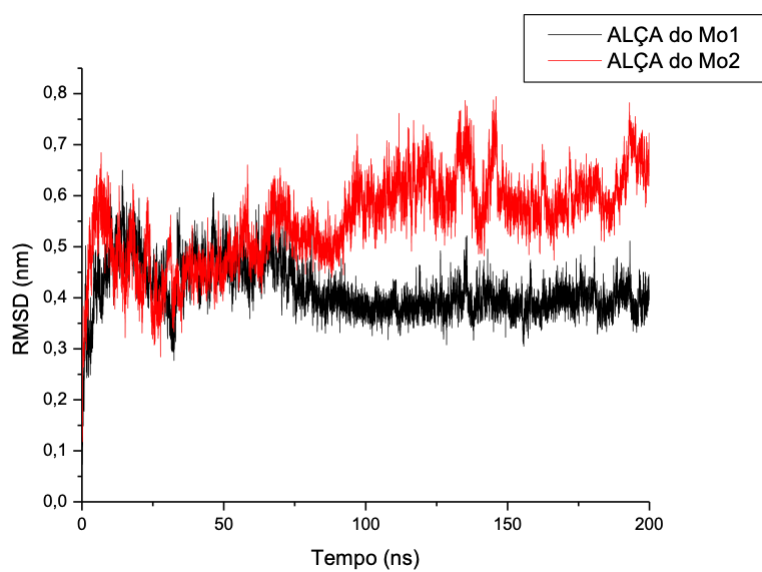


Figura 15 - Perfis de RMSD das alças dos monômeros do tetrâmero de *E. coli*.

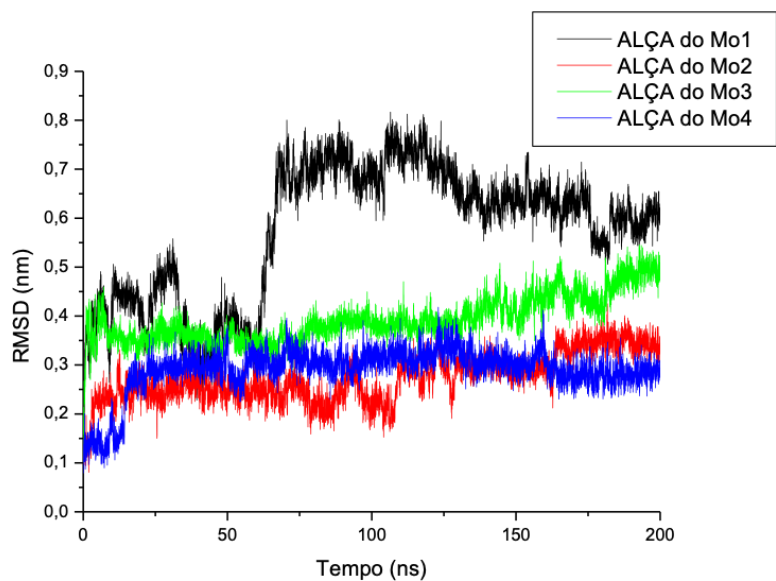
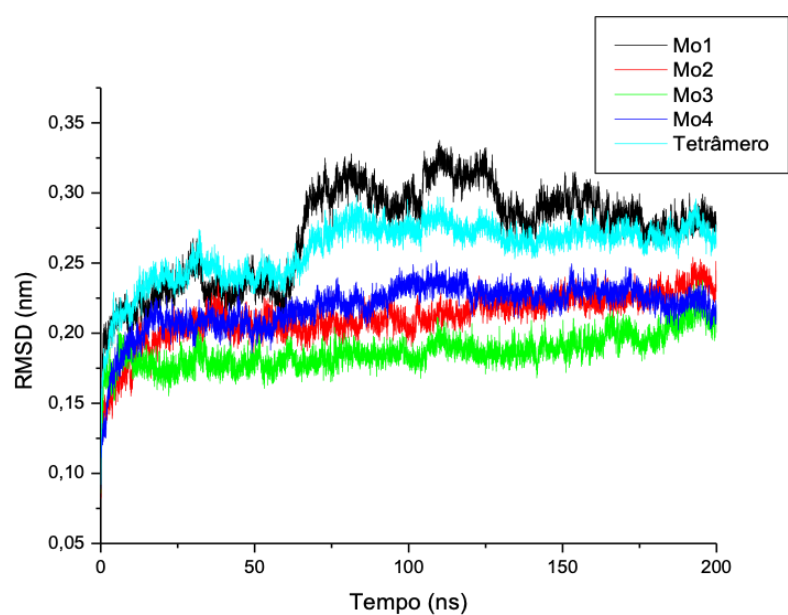


Figura 16 - Os perfis RMSD dos monômeros e do tetrâmero de *E. coli*.



## 4.4 Ligações de Hidrogênio

### 4.4.1 *Escherichia coli*

As ligações de hidrogênio são muito importantes para a estabilização da estrutura da proteína. Foram avaliadas as LHs formadas por resíduos da enzima que contribuem para a estabilidade do sítio ativo da enzima, separados por monômeros, A1, A2, A3 e A4 representando os Mo1, Mo2, Mo3 e Mo4 respectivamente.

**Tabela 7 - Porcentagem de observação de (%OBS) de LHs intermolecular realizadas pelos grupos entre cadeia principal e cadeia principal entre dois domínios; A<sub>N</sub> N=1, 2, 3, 4.**

Domínio	Resíduo	Resíduo	Domínio	Frequência(%OBS)
A1	Ser118	Ser122	A2	55,9
A1	Thr163	Thr275	A3	82,1
A1	Asn184	Gln280	A4	93,1
A1	Gln190	Ala194	A4	79,2
A1	Thr192	Thr192	A4	55,7
A1	Thr275	Thr165	A3	89,2
A1	Thr275	Thr166	A3	21,5
A1	Ala123	Ser122	A2	95,5
A1	Lys251	Gln59	A3	98,5
A1	Thr275	Thr163	A3	99,0
A1	Ala194	Gln190	A4	88,4
A1	Thr192	Thr192	A4	152,8
A2	Gln59	Lys251	A4	96
A2	Met61	Asn222	A4	43,6
A2	Thr163	Thr275	A4	99,2
A2	Gln190	Ala194	A3	87,7
A2	Thr192	Thr192	A3	121,1
A2	Ala194	Gln190	A3	67,7
A2	Lys251	Gln59	A4	23,1
A2	Asn222	Met61	A4	98,7
A2	Thr165	Thr275	A4	92,6
A3	Ala123	Met121	A4	71,7

**Tabela 8 - Porcentagem de observação de (%OBS) de LHs intermolecular realizadas pelos grupos entre cadeia principal e cadeia lateral entre dois domínios; A<sub>N</sub> N=1, 2, 3, 4.**

Domínio	Resíduo	Resíduo	Domínio	Frequência
A1	Asp90	Gly245	A3	68,3
A1	Ser120	Ser122	A2	36,9
A1	Asp152	Ala277	A4	61
A1	Asn175	Tyr181	A4	30,5
A1	Gly177	Arg191	A4	86,5
A1	Pro178	Arg191	A4	29
A1	Asp188	Thr296	A4	90,1
A1	Thr192	Thr192	A4	26,4
A1	Tyr220	Ile216	A3	40,8
A1	Asn222	Asp63	A3	68,8
A1	Gly245	Thr165	A3	21,7
A1	Leu249	Gln59	A3	27,7
A1	Thr275	Thr165	A3	51,3
A1	Tyr326	Ile187	A4	29
A1	Ser122	Ser122	A2	25
A1	Asn222	Asn62	A3	73,2
A1	Asn246	Asp90	A3	99,1
A1	Ala277	Thr165	A3	69,3
A1	Ile216	Tyr220	A3	31,1
A1	Met61	Asn222	A3	23,8
A1	Asp63	Asn222	A3	44,7
A1	Gln59	Leu249	A3	21,4
A1	Thr165	Ala277	A3	113,4
A1	Tyr181	Asn175	A4	89,7
A1	Gln190	Tyr176	A4	97,8
A1	Arg191	Gly177	A4	92,1
A1	Gln280	Asn184	A4	46,6
A1	Arg195	Gln190	A4	34,1
A2	Met61	Asn222	A4	24,3
A2	Asp90	Gly245	A4	20,2
A2	Tyr176	Arg191	A3	26,9
A2	Gly177	Arg191	A3	82,5
A2	Arg191	Arg191	A3	39,1
A2	Thr192	Thr192	A3	23,2
A2	Tyr220	Ile216	A4	55,7
A2	Asn222	Asp63	A4	43,3

**Tabela 8 - Porcentagem de observação de (%OBS) de LHs intermolecular realizadas pelos grupos entre cadeia principal e cadeia lateral entre dois domínios; A<sub>N</sub> N=1, 2, 3, 4 (continua)**

Domínio	Resíduo	Resíduo	Domínio	Frequência
A2	Gln190	Tyr176	A3	38,7
A2	Arg191	Gly176	A3	57,7
A2	Arg191	Gly177	A3	50,5
A2	Arg191	Pro178	A3	95,3
A2	Arg191	Arg191	A3	75,7
A2	Ala221	Glu94	A4	72,7
A2	Thr275	Thr163	A4	35,5
A2	Ile216	Tyr220	A4	36,4
A2	Gln59	Leu249	A4	52,4
A2	Met61	Tyr250	A4	98,9
A3	Ser23	Asn184	A4	25,8

**Tabela 9 - Porcentagem de observação de (%OBS) de LHs intermolecular realizadas pelos grupos entre cadeia lateral e cadeia lateral entre dois domínios; A<sub>N</sub> N =1, 2, 3, 4.**

Domínio	Resíduo	Resíduo	Domínio	Frequência(%OBS)
A1	Asp188	Tyr176	A4	51,39
A1	Asp188	Arg158	A4	126,7
A1	Asp188	Tyr176	A4	87,7
A1	Asn222	Arg303	A3	31,6
A1	Thr296	Lys186	A4	40,8
A1	Gln300	Tyr218	A3	73,7
A1	HIS183	Thr166	A2	21,2
A1	Tyr250	Asn62	A3	37,3
A1	Arg272	Glu94	A3	54,1
A1	Tyr218	Gln300	A3	30,2
A1	Tyr176	Asp188	A4	73,1
A1	Lys186	Gln320	A4	82,9
A1	Lys186	Asn324	A4	91,1
A2	Asp188	Tyr176	A3	77,9
A2	Gln300	Tyr218	A4	46,8
A2	Tyr176	Asp188	A3	56
A2	Tyr250	Asn62	A4	27,8
A2	Tyr218	Gln300	A4	87,1
A3	Asp167	Tyr181	A4	47,9
A3	Arg116	Asn151	A4	100,3

Os resíduos que fazem ligações de hidrogênio significantes foram marcados na estrutura quaternária da L-asparaginase de acordo com a natureza espacial,

cadeia principal e cadeia principal (Figura 17), cadeia principal e cadeia lateral (Figura 18) e cadeia lateral e cadeia lateral (Figura 19).

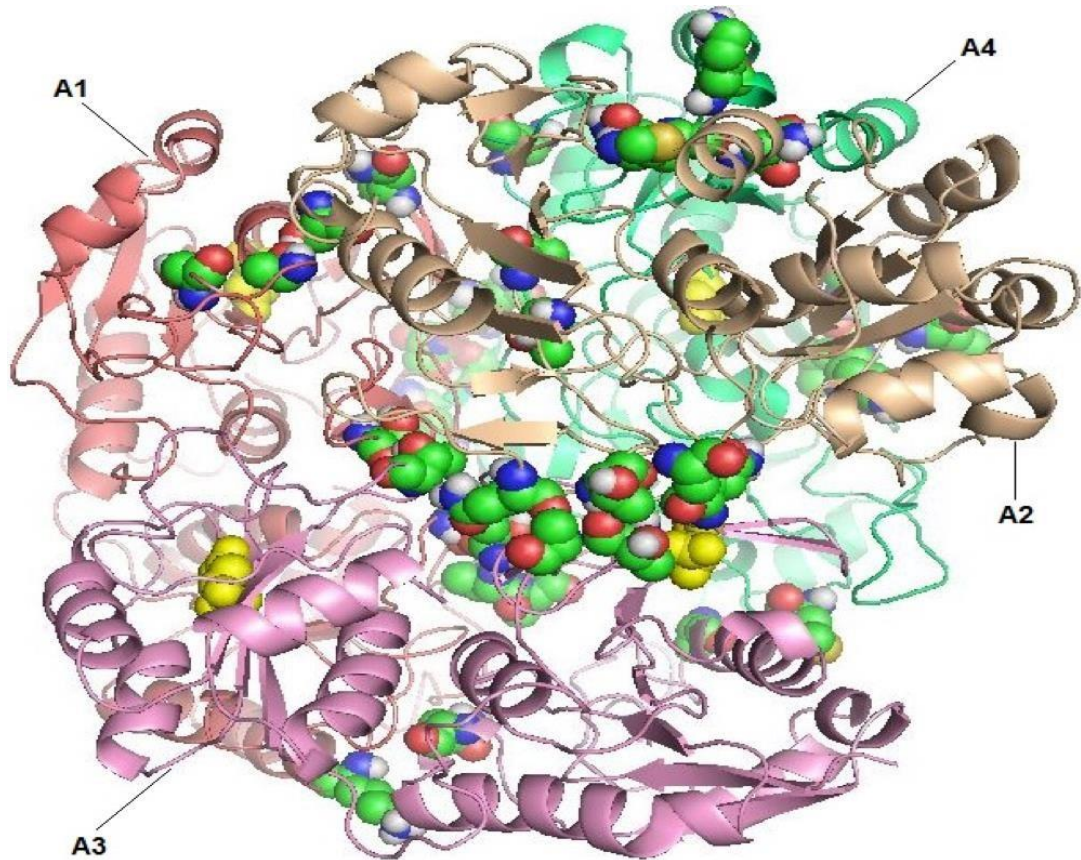
Foram encontradas 22 contatos entre resíduos com a presença de LH, sendo 3 entre A1 e A2, 5 entre A1 e A3, 6 entre A1 e A4, 3 entre A2 e A3, 6 entre A2 e A4 e 1 entre A3 e A4. Alguns dos resíduos que formam LHs entre os grupos da cadeia principal estão próximos espacialmente do sítio ativo da L-asparaginase, (Figura 17) e outros localizados na interface entre os monômeros, como observado nas Figuras 18 e 19.

Na Tabela 7, pode-se observar que Gln59, Asn184 e Met121 contribuem para a formação de LHs, de maneira que a Gln59 do A3 realiza LH com a Lys251 do A1, apresentando 98,5% de observação, e a Gln59 do A2 realiza LH com a Lys251 do A4, apresentando 96% de observação. Já a Asn184 do A1 possui 93,1% de observação de LH com Gln280 do A4. A Met121 do A4 realiza LH com a Ala123 do A3 com frequência observada de 71,7%.

Quanto à Gln59, esse resíduo está próximo espacialmente ao sítio catalítico da L-asparaginase, enquanto a Asn184 e Met121 estão na região de contato entre os monômeros 1 e 2 (Figura 20). O resíduo Gln59 participa diretamente na atividade asparaginase da enzima quanto à especificidade para o aminoácido asparagina (LORENZI et al., 2013), assim como Asn184 e Met121 (ERVA et al., 2016). Isso colabora com a hipótese de Lorenzi e Erva de que esses seriam resíduos importantes para a atividade específica para asparagina da L-asparaginase.

Além disso, alguns resíduos da região de alça (correspondente entre 191 e 212) formam LHs entre cadeia principal e cadeia principal, como a Thr192 e a Ala194, e cadeia principal e cadeia lateral, como a Arg191, a Thr192 e Arg195. Esses resíduos apresentam porcentagens de observação de LHs relevantes como visto nas Tabelas 7 e 8. Essa região já foi destacada na literatura como sendo importante para a manutenção da estrutura, sendo a região que mantém os domínios unidos. (SWAIN et al., 1993).

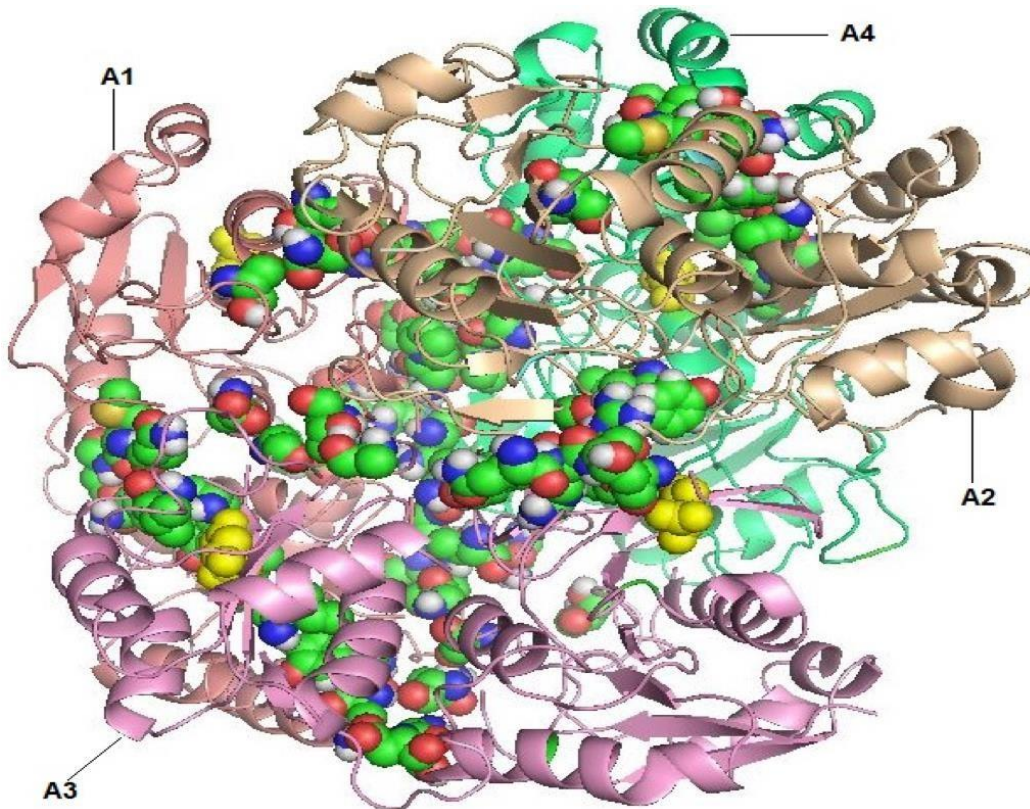
**Figura 17: Resíduos que realizam ligações de hidrogênio entre cadeia principal e cadeia principal no tetrâmero da L-asparaginase de *E. coli*. Os ácidos aspárticos são mostrados em esferas amarelas e os resíduos que realizam ligações de hidrogênio estão representados em esferas na cor original do átomo: Carbono em verde, Nitrogênio em azul, Oxigênio em vermelho e Hidrogênio em branco.**



Fonte: elaborada pelo autor.



**Figura 18: Resíduos que realizam ligações de hidrogênio entre cadeia principal e cadeia lateral no tetrâmero da *L-asparaginase* de *E. coli*. Os ácidos aspárticos são mostrados em esferas amarelas e os resíduos que realizam ligações de hidrogênio estão representados em esferas na cor original do átomo: Carbono em verde, Nitrogênio em azul, Oxigênio em vermelho e Hidrogênio em branco.**

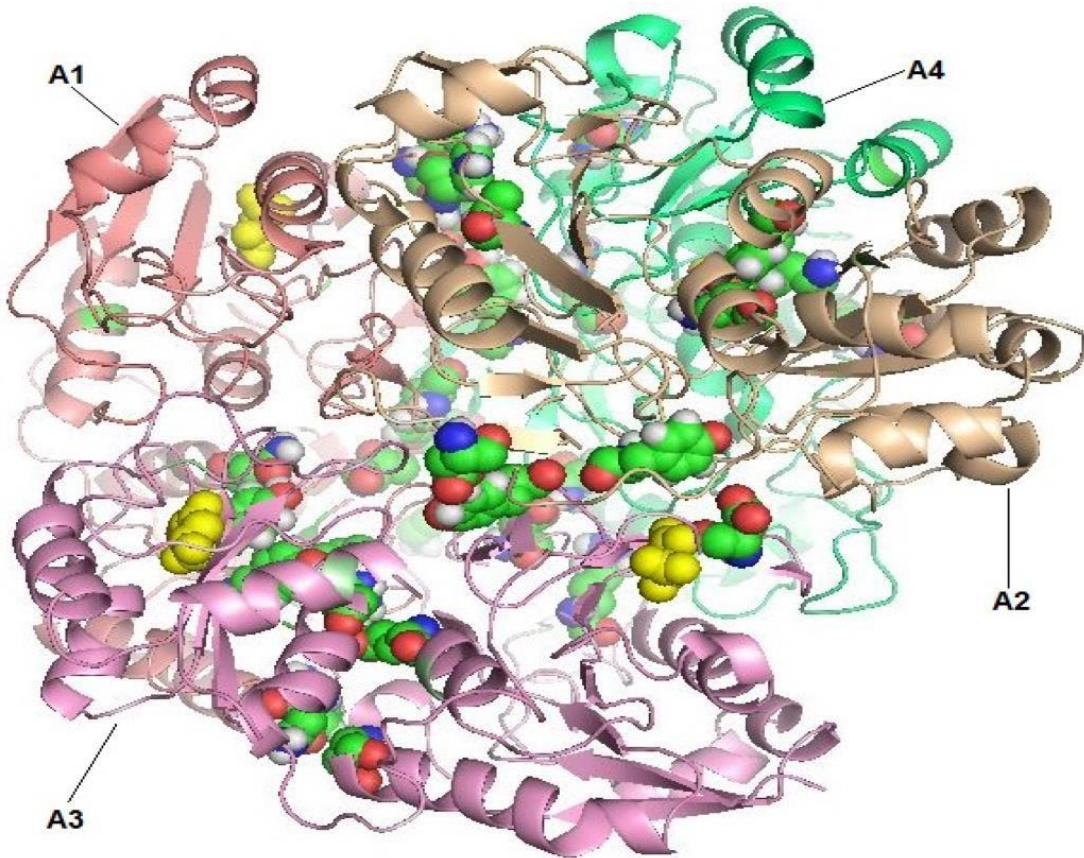


Fonte: elaborada pelo autor.

**Figura 19: Resíduos que realizam ligações de hidrogênio entre cadeia lateral e cadeia lateral no tetrâmero da *L-asparaginase* de *E. coli*. Os ácidos aspárticos são mostrados em esferas amarelas e os resíduos que realizam ligações de hidrogênio estão representados em esferas na cor original do átomo: Carbono**



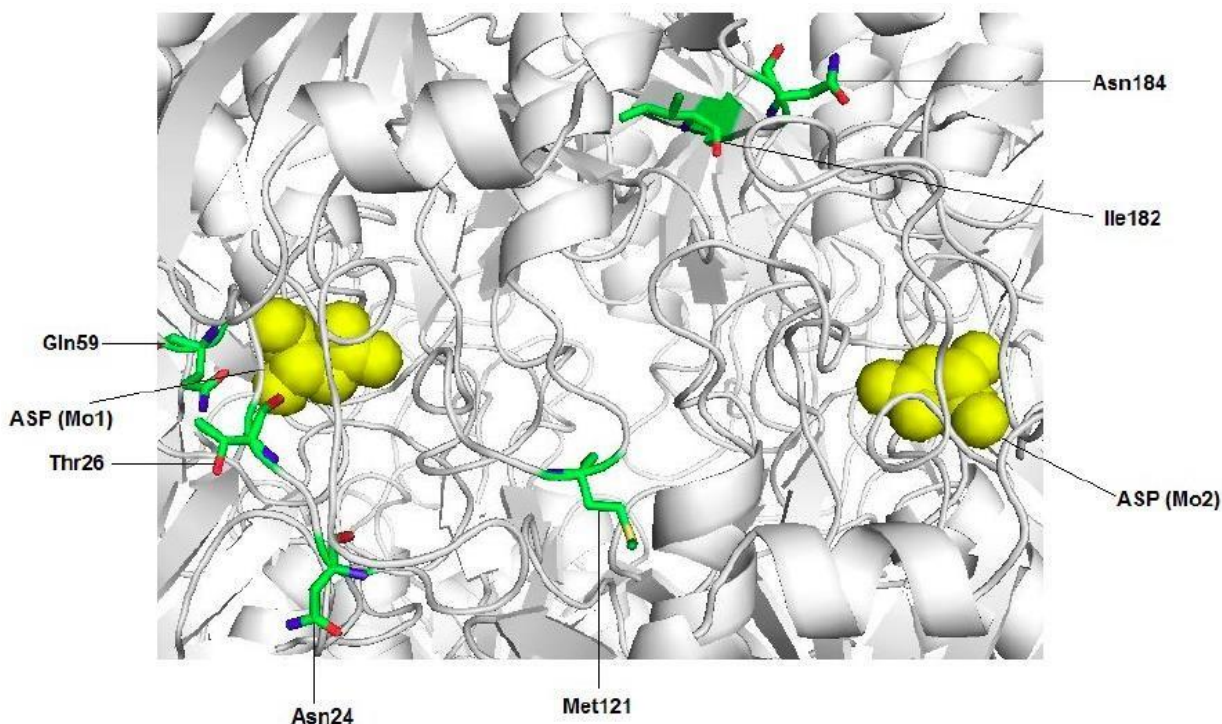
em verde, Nitrogênio em azul, Oxigênio em vermelho e Hidrogênio em branco.



Fonte: elaborada pelo autor.

**Figura 20 - Tetrâmero de L-asparaginase de *E. coli* cocrystalizado com ácido aspártico. Os resíduos N24, T26, Q59, M121, I182 e N184 do monômero 1 são mostrados interagindo com o ácido aspártico no sítio catalítico mostrado em**

esferas amarelas.



Fonte: elaborada pelo autor.

#### 4.4.2 *Phaseolus vulgaris*

Para a análise das LHs da *P. vulgaris*, foram analisadas as interações intermoleculares entre os domínios A1 e A2 da enzima.

**Tabela 10 - Porcentagem de observação de (%OBS) de LHs intermolecular realizadas pelos grupos entre cadeia principal e cadeia principal entre os dois domínios A1 e A2.**

Domínio	Resíduo	Resíduo	Domínio	Frequência(%OBS)
A1	Gly225	Ala123	A2	93,20
A1	Ile227	Tyr121	A2	48,79
A1	Ser170	Arg132	A2	88,64
A1	Ser171	Arg132	A2	66,19
A1	Ser171	Gln133	A2	15,22
A1	Ala172	Gln133	A2	86,22
A1	Ala123	Thr242	A2	15,28
A1	Gly257	Ile233	A2	94,74

**Tabela 11 - Porcentagem de observação de (%OBS) de LHs intermolecular realizadas pelos grupos entre cadeia principal e cadeia lateral entre os dois domínios.**

Domínio	Resíduo	Resíduo	Domínio	Frequência(%OBS)
A1	Ser125	Ser170	A2	27,05
A1	Tyr166	Gln133	A2	57,07
A1	Tyr194	Gly126	A2	15,46
A1	Glu252	Tyr121	A2	60,71
A1	Gly257	Arg261	A2	77,01
A1	Thr258	Arg261	A2	90,30
A1	Glu288	Lys91	A2	56,76
A1	Glu288	Arg92	A2	62,56
A1	Arg256	Asp88	A2	57,41
A1	Arg256	Arg93	A2	36,21
A1	Tyr166	Pro118	A2	55,33
A1	Ser171	Ala131	A2	30,75
A2	Tyr121	Ile227	A2	93,82
A2	Ser120	Glu252	A2	59,32
A2	Tyr121	Glu252	A2	80,54

**Tabela 12: Porcentagem de observação de (%OBS) de LHs intermolecular realizadas pelos grupos entre cadeia lateral e cadeia lateral entre os dois domínios.**

Domínio	Resíduo	Resíduo	Domínio	Frequência(%OBS)
A1	Ser120	Arg256	A2	19,60
A1	Ser125	Tyr194	A2	19,86
A1	Asp129	Tyr166	A2	45,30
A1	Gln133	Tyr166	A2	16,18
A1	Thr258	Arg261	A2	74,15
A1	Glu262	Arg261	A2	23,02
A1	Glu262	Tyr269	A2	84,22
A1	Tyr269	Arg285	A2	44,98
A1	Tyr166	Ser117	A2	15,84
A1	Tyr269	Glu262	A2	74,90
A1	Arg285	Tyr269	A2	72,56

Os resíduos que fazem ligações de hidrogênio significantes foram marcados na estrutura quaternária da L-asparaginase de acordo com a natureza espacial, cadeia principal e cadeia principal (Figura 21), cadeia principal e cadeia lateral (Figura 22) e cadeia lateral e cadeia lateral (Figura 23).

Na Tabela 10 (interações entre cadeia principal e cadeia principal) podemos observar que os resíduos Ser170, Ser171 e Ala172 realizam ligações de hidrogênio, em que a Ser171 apresenta interação com dois resíduos diferentes do domínio A2, com porcentagens de observação de 66,19% com a Arg132 e 15,32% com a Gln133. Já a Ser170 e a Ala172 apresentaram LHs com os resíduos Arg132 e Gln133 respectivamente e porcentagens de observação de 88,64% para o primeiro e 86,22% para o segundo.

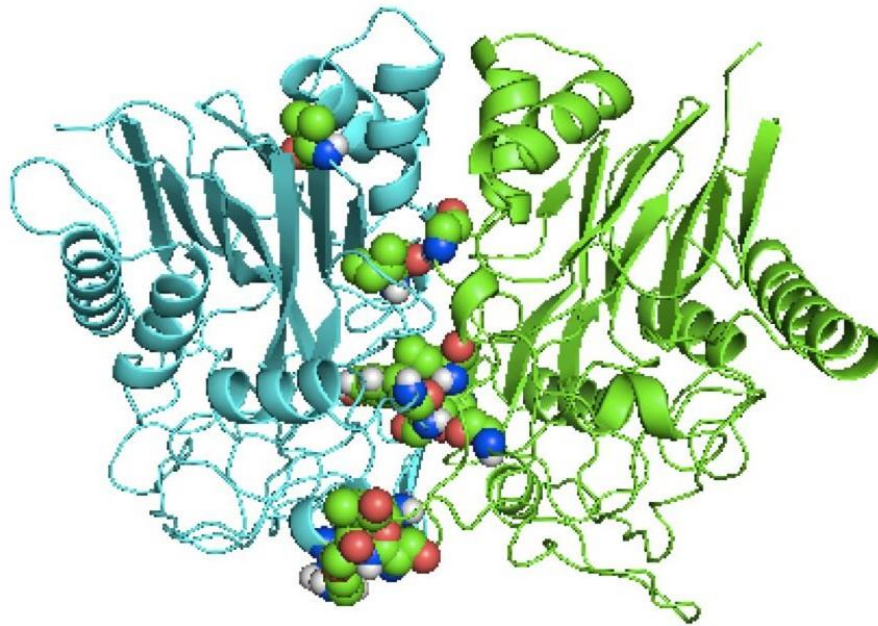
Quanto às LHs realizadas entre cadeia principal e cadeia lateral (Tabela 11), observamos que a Thr166 realiza LH com a Gln133, Pro118 e Ser125 com porcentagem de observação respectivamente de 57,07%, 55,33% e 22,14%. Outros resíduos que também contribuem para estabilidade estrutural são a Ser170, Ser171 e Tyr194, em que a Ser170 interage com a Ser125 e apresenta porcentagem de 27,05%, a Ser171 interage com a Ala131 e observação de 30,75% e a Tyr194 com a Gly126 e com 15,46%.

Para as LHs existentes entre cadeia lateral e cadeia lateral (Tabela 12) podemos observar que os resíduos Tyr166 e Tyr194 realizam interações intermoleculares sendo a Tyr166 interagindo com Asp129 e Gln133 e exibem 45,30% e 16,18% de observação, respectivamente. Já a Tyr194 interage com a Ser125 e exibe uma porcentagem de observação de 19,86%.

Dessa maneira, podemos analisar a importância dos resíduos compreendidos nas alças modeladas nesse estudo, que correspondem entre os resíduos 160 e 198. Embora não apresentem, em geral, uma alta observação de ligação de hidrogênio, as participações dessas interações entre os domínios da enzima contribuem para a estabilização do sítio catalítico, principalmente os resíduos Ser170, Ser171, Ala172 e Tyr166, que apresentam porcentagem de observação maiores que 50%.

Outros resíduos que também participam ativamente para a estabilidade da enzima são Gly225, Ala123, Gly257, Ile233, Thr258, Arg261, Tyr121 e Ile227 que apresentam porcentagem de observação maiores que 90%.

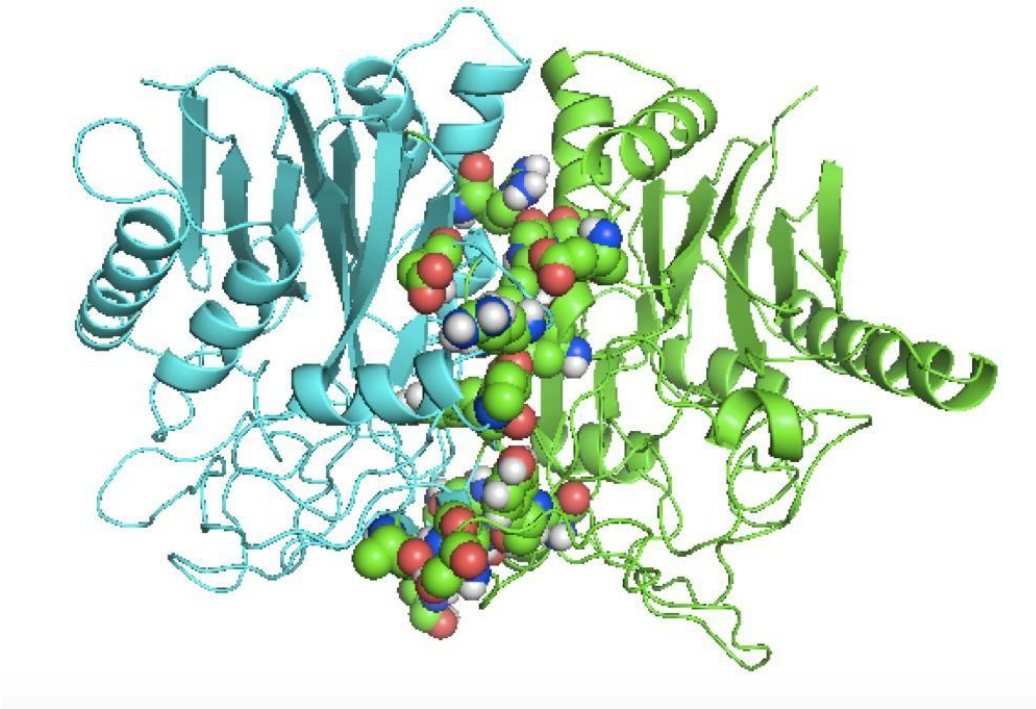
**Figura 21 - Resíduos que realizam ligações de hidrogênio entre cadeia principal e cadeia principal no dímero da L-asparaginase de *P. vulgaris* (em verde o domínio A1 e em azul o domínio A2). Os ácidos aspárticos são mostrados em esferas amarelas e os resíduos que realizam ligações de hidrogênio estão representados em esferas na cor original do átomo: Carbono em verde, Nitrogênio em azul, Oxigênio em vermelho e Hidrogênio em branco.**



Fonte: elaborada pelo autor.

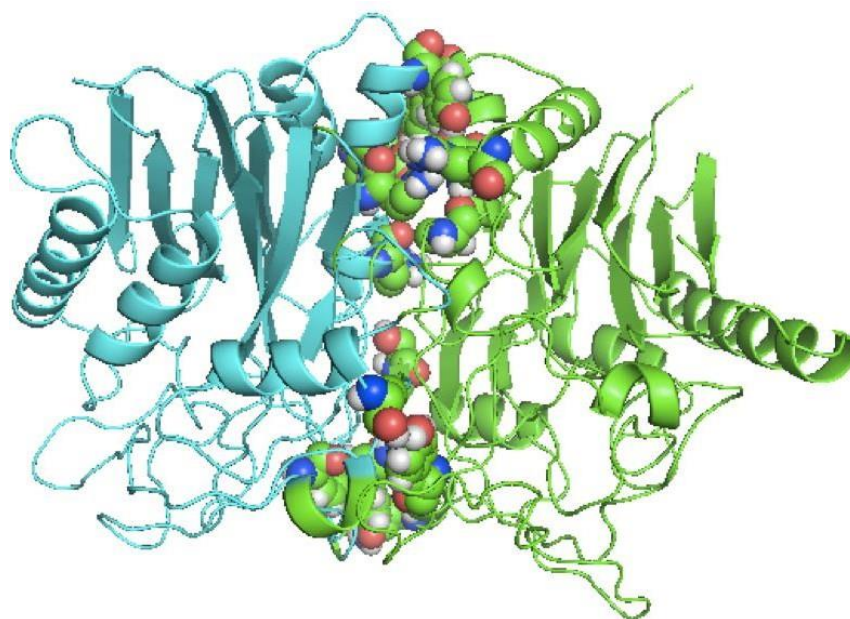


**Figura 22 - Resíduos que realizam ligações de hidrogênio entre cadeia principal e cadeia lateral no dímero da L-asparaginase de *P. vulgaris* (em verde o domínio A1 e em azul o domínio A2). Os ácidos aspárticos são mostrados em esferas amarelas e os resíduos que realizam ligações de hidrogênio estão representados em esferas na cor original do átomo: Carbono em verde, Nitrogênio em azul, Oxigênio em vermelho e Hidrogênio em branco.**



Fonte: elaborado pelo autor.

**Figura 23 - Resíduos que realizam ligações de hidrogênio entre cadeia lateral e cadeia lateral no dímero da L-asparaginase de *P. vulgaris* (em verde o domínio A1 e em azul o domínio A2). Os ácidos aspárticos são mostrados em esferas amarelas e os resíduos que realizam ligações de hidrogênio estão representados em esferas na cor original do átomo: Carbono em verde, Nitrogênio em azul, Oxigênio em vermelho e Hidrogênio em branco.**



Fonte: elaborado pelo autor.

#### **4.5 Docking**

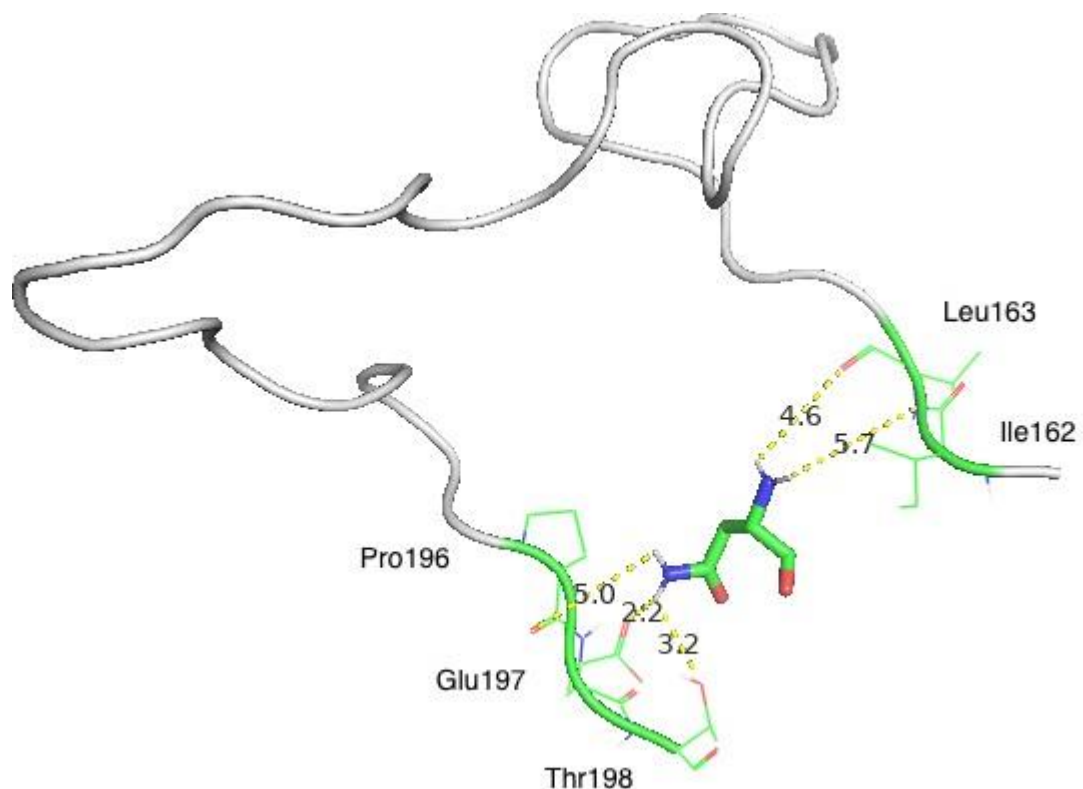
O resultado proveniente do HADDOCK apresentou uma afinidade de -4,1 kcal/mol para a alça 1 e -3,9 kcal/mol para a alça 2. Dessa forma, embora a afinidade da asparagina pelo sítio do domínio 1 seja ligeiramente maior que pelo sítio do domínio 2, podemos considerar que há uma semelhança quanto à afinidade do substrato para a enzima.

Em seguida a estrutura foi submetida à uma análise de contatos com os resíduos do sítio, especialmente em relação a alça modelada, cuja estrutura está presente o resíduo nucleofílico Thr198 (BEJGER et al., 2014).

##### **4.5.1 Interações do sítio catalítico de L-asparaginase de *Phaseolus vulgaris***

Na alça 1 (Figura 24), podemos observar que o aminoácido asparagina está distante de 2,2 Å do resíduo Glu197 e 3,2 Å do resíduo Thr198. Segundo a IUPAC, para que átomos realizem ligações de hidrogênio, essa distância deve ser menor que 3 Å. Dessa forma podemos observar que há interação com o resíduo Glu197 e uma provável interação com o resíduo nucleofílico Thr198, pois como a região de alça é caracterizada por uma grande movimentação essa distância pode variar permitindo a formação de ligação de hidrogênio. Entretanto, os demais resíduos espacialmente próximos ao substrato, como Pro196, Leu163 e Ile162 não realizam ligação de hidrogênio com a asparagina.

**Figura 24 – Interações entre o aminoácido asparagina e resíduos presentes na alça 1 da L-asparaginase de *Phaseolus vulgaris*.**

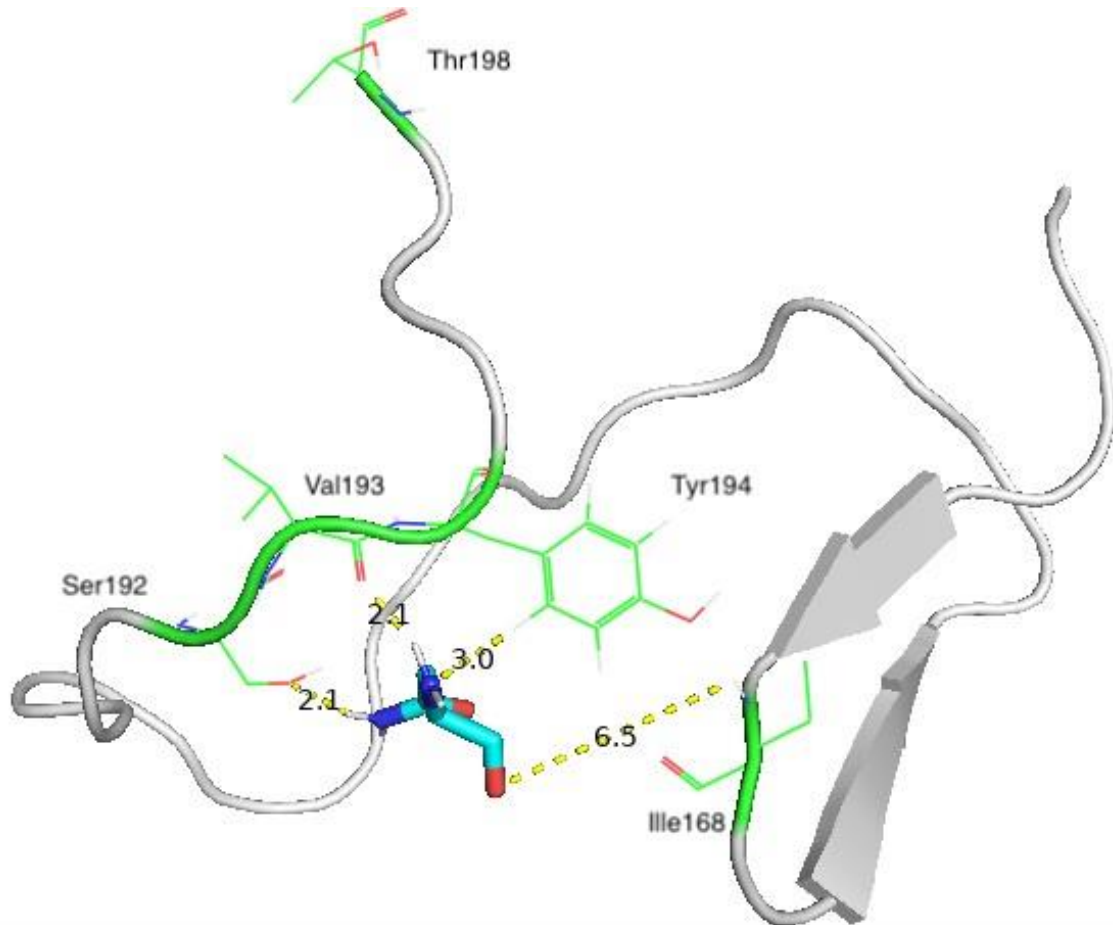


Já na alça 2 (Figura 25), podemos observar que após os 300ns de simulação de Dinâmica Molecular houve uma formação de estrutura secundária na forma de folha beta. Além disso, o substrato asparagina apresenta ligação de hidrogênio com os resíduos Ser192, Val193 e Tyr194, mas o resíduo nucleofílico Thr198 está espacialmente distante do substrato, sugerindo que não há interação entre ambos. Entretanto, como essa é uma região de muita movimentação, acredita-se que quando



a proteína está em solução o substrato obtém acesso ao bolsão da enzima e sofre a catálise.

**Figura 25 - Interações entre o aminoácido asparagina e resíduos presentes na alça 2 da L-asparaginase de *Phaseolus vulgaris*.**



#### **4.5.2 Interações do sítio catalítico da L-asparaginase de *E. coli***

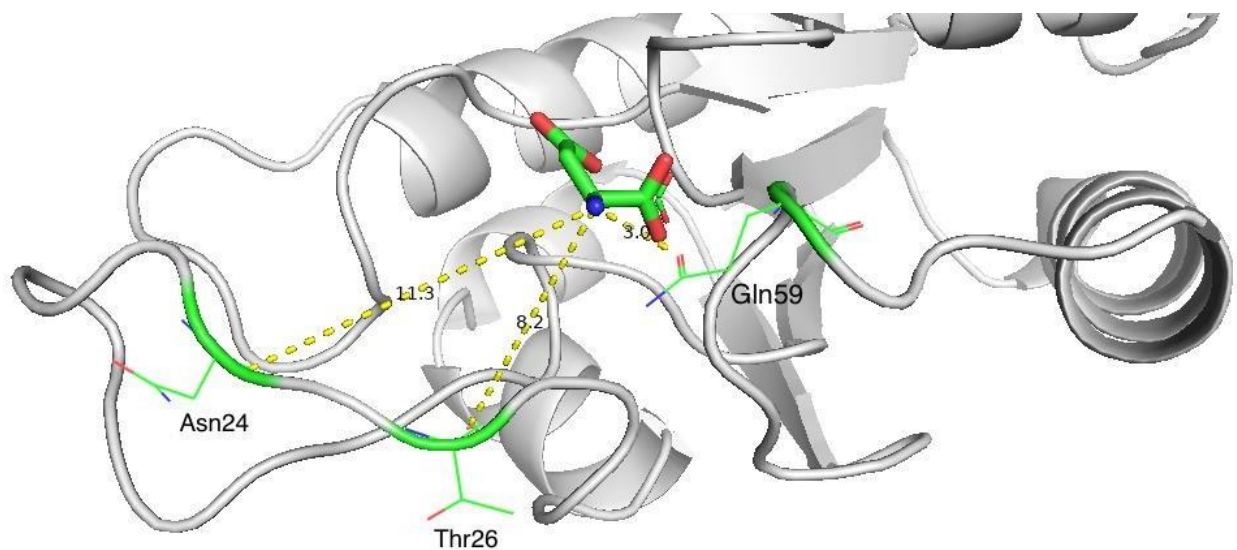
Ao analisar as interações do produto da reação da L-asparaginase co-cristalizado no sítio ativo da L-asparaginase (Figura 26), observamos que, dentre os resíduos catalogados por Lorenzi (LORENZI et al., 2013) e Erva (ERVA et al., 2016) como parte do sítio ativo, apenas o resíduo Gln59 é capaz de realizar ligação de hidrogênio.

Entretanto, como essa é uma região de alça, acredita-se que devido à grande movimentação da estrutura o substrato tem acesso aos demais resíduos pertencentes ao sítio catalítico, como a Asn24 e o resíduo nucleofílico Thr26. Ademais, existem

outros resíduos, como Met121 que possui papel na estabilidade do sítio do domínio adjacente.

Da mesma maneira que ocorreu na Alça 2 da L-asparaginase de *P. vulgaris*, na L-asparaginase de *E. coli* o resíduo de treonina apresenta-se espacialmente distante, ainda assim há atividade catalítica pois ambos fazem parte de uma região de grande movimentação estrutural.

**Figura 26 - Interações entre o aminoácido asparagina e resíduos presentes na alça da L-asparaginase de *E. coli*.**



## 5 CONCLUSÃO

A análise dos perfis de RMSD e das ligações de hidrogênio da L-asparaginase de *E. coli* e *P. vulgaris* nos permite comparar a estabilidade estrutural do sítio ativo da proteína, bem como a influência do sítio na estabilidade estrutural geral da enzima.

Quanto à L-asparaginase *E. coli* podemos concluir que os monômeros na forma tetramérica são mais estáveis que o monômero e o dímero da L-asparaginase em solução devido às ligações de hidrogênio entre os monômeros. Portanto, além das ligações de hidrogênio estabilizarem a estrutura quaternária da proteína, elas estão diretamente ligadas a região do sítio catalítico, representando uma interdependência dos monômeros para a estabilização estrutural. Dessa forma, há uma relação direta da estabilização da estrutura com atividade da enzima, justificando a premissa de

Swain (SWAIN, 1993) que a enzima, mesmo possuindo sítio ativo em cada um dos monômeros, só possui atividade quando em forma de tetrâmero.

Já para a L-asparaginase de *P. vulgaris*, contradizendo o que afirma Bejger (BEJGER, 2014), a enzima não possui estrutura quaternária em tetrâmero, como as bacterianas, mas sim estrutura em dímero. Isso deve-se que a separação dos domínios proposta por Bejger não levou em conta a alça do sítio catalítico, que não está presente na estrutura depositada no banco de dados, mas que foi modelada nesse estudo.

Além disso, a quantidade de ligações de hidrogênio apresentadas entre os resíduos do sítio ativo da *P. vulgaris* é menor que as apresentadas pela de *E. coli*, bem como seu perfil de RMSD é maior. Desse modo, a L-asparaginase vegetal apresenta uma estabilidade estrutural inferior à bacteriana.

A fim de comparar a atividade enzimática de ambos organismos se fez necessário estudar a região de alça pertencente ao sítio catalítico. Entretanto, devido a essa região possuir grande mobilidade, dificulta o estudo da sua estabilidade estrutural e está dissociada da estabilidade geral da enzima. Além disso, sua movimentação intrínseca é condicionante para manutenção da atividade catalítica, dando acesso ao substrato para entrada no sítio catalítico.

Quanto às alças da L-asparaginase vegetal e bacteriana, ambas apresentam ligações de hidrogênio efêmeras com o substrato, principalmente com o resíduo nucleofílico de treonina.

As perspectivas são de obter uma estrutura tridimensional por meio experimental da L-asparaginase de *P. vulgaris* com ligantes para o estudo das suas interações com o ligante e identificar se essas ligações interferem de alguma maneira na especificidade da enzima para o substrato asparagina.

Além disso, a obtenção de dados experimentais da enzima com seu substrato nos permitiria avaliar quais resíduos participam ativamente da catálise e propor mutações pontuais com o propósito de tentar aumentar a especificidade da L-asparaginase a fim de viabilizá-la como alternativa à L-asparaginase de *E. coli*.

## REFERÊNCIAS

- ACHARYA, K. R.; LLOYD, M. D. The advantages and limitations of protein crystal structures. **Trends in Pharmacological Sciences**, [S.l.], v. 26, n. 1, p. 10–14, 2005.
- AMERICAN CANCER SOCIETY. **Censo 2015**. Disponível em: <http://www.cancer.org>. Acesso em: 6 set 2016.
- ARUNAN, E. et al. Definition of the hydrogen bond (IUPAC Recommendations 2011). **Pure and Applied Chemistry**, [S.l.], v. 83, n. 8, p.1637–1641, 2011.
- ATKINS, P.; PAULA, J. Estrutura molecular. In: **Atkins: Físico-Química**, 7. ed. Rio de Janeiro: LTC, p. 122-163, 2004.
- BAKER, D.; SALI, A. Protein structure prediction and structural genomics. **Science**, [S.l.], v. 293, p. 93–96, 2001.
- BEJGER, M. et al. Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> exchange switches the catalytic apparatus of potassium-dependent plant L-asparaginase. **Acta Crystallographica**, [S.l.], v. 70, p. 1854 - 1872, 2014.
- BERENDSEN, H. J. C. et al. Molecular dynamics with coupling to an external bath. **The Journal of Chemical Physics**, [S.l.], v. 81, n. 8, p. 3684-3690, 1984.
- BONVIN, A. M. et al. Building macromolecular assemblies by information-driven docking: introducing the HADDOCK multibody docking server. **Molecular and Cellular Proteomics**, [S.l.], p. 1784-1794, 2010.
- BRASIL; MINISTÉRIO DA SAÚDE (MS). **Política nacional de plantas medicinais e fitoterápicos**, 2006.
- BROOME, J. D. Antilymphoma activity of L-asparaginase *in vivo*: clearance rate of enzyme preparations from guinea pig serum and yeast in relation to their effects on tumor growth. **Journal of the National Cancer Institute**, [S.l.], v. 35, p. 967–74, 1965.
- BURKERT, U.; ALLIGNER, N. L. Molecular Mechanics. **American Chemical Society**, [S.l.], p. 64-72, 1982.
- BUSSI, G.; DONADIO, D., PARRINELLO, M. Canonical sampling through velocity rescaling. **Journal of Chemistry Physics**, [S.l.], v. 126, n. 1, p. 101-141, 2007.
- CARVALHO, I.; PUPO, M. T.; BORGES, A. D. L.; BERNARDES, L. S. C. Introdução a modelagem molecular de fármacos no curso experimental de Química Farmacêutica. **Química Nova**, São Paulo, v. 26, p. 428-438, 2003.

CAVASOTTO, C. N.; PHATAK, S. S. Homology modeling in drug discovery: current trends and applications. **Drug Discovery Today**, [S.I.], v. 14, p. 676–683, 2009.

CHAMPLIN, R. B. L. O. D. **The Journal of The American Society of Hematology**, São Paulo, v. 73, n. 8, p. 2051–2067, 1989.

DARDEN, T.; YORK, D.; PEDERSEN, L. Particle mesh Ewald: An N·log (N) method for Ewald sums in large systems. **The Journal of Chemical Physics**, [S.I.], v. 98, n. 12, p. 1089-1092, 1993.

DESCHAVANNE, P. et al. BactPepDB: a database of predicted peptides from a exhaustive survey of complete prokaryote genomes. **The Journal of Biological Databases and Curation**, [S.I.], v.106, p. 1–9, 2014.

DE VRIES, S. J.; BONVIN, A. M. How proteins get in touch: interface prediction in the study of biomolecular complexes. **Current Protein and Peptide Science**[S.I.], v. 4, p. 394-406, 2008.

DISTASIO, J. A.; SALAZA, A. M.; NADJI, M.; DURDEN, D. L. Glutaminase-free asparaginase from *Vibrio succinogenes*: an antilymphoma enzyme lacking hepatotoxicity. **International Journal of Cancer**, [S.I.], v. 30, p. 343-347, 1982.

DOMINGUEZ, C. et al. HADDOCK: a protein-protein docking approach based on biochemical and/or biophysical information. **Journal of the American Chemical Society**, [S.I.], v. 125, p. 1731-1737, 2003.

ERVA, R. R. et al. Molecular dynamic simulations of *Escherichia coli* l-asparaginase to illuminate its role in deamination of asparagine and glutamine residues. **3 Biotech**, [S.I.], v. 6, n. 1, 2016, 2 p.

FORSTER, M. J. Molecular modeling in structural biology. **Micron, Elsevier Science Ltd.**, [S.I.], p. 365-384, 2002.

GILSON, M. K. et al. The statistical-thermodynamic basis for computation of binding affinities: A critical review. **Biophysical Journal**, [S.I.], v. 72, n. 3, p. 1047–1069, 1997.

GORDON, J. C. et al. H++: a server for estimating pKas and adding missing hydrogens to macromolecules. **Nucleic Acids Research (Web Server issue)**, [S.I.], v. 33, p. 368-371, 2005.

HESS, B. P-LINCS: A parallel linear constraint solver for molecular simulation. **Journal of Chemical Theory and Computation**, [S.I.], v. 4, n.1, p. 116- 122, 2008.

HETÉNYI, C.; VAN DER SPOEL, D. Efficient docking of peptides to proteins without prior knowledge of the binding site. **Protein Science**, [S.l.], v. 11, n. 7, p. 1729–1737, 2009.

JEFFREY G. A.; SAENGER W. Hydrogen Bonding in Biological Structures, **Springer-Verlag**, [S.l.], v. 105, n. 3, p. 477-478, 1991.

KAFKEWITZ, D.; BENDICH, A. Enzyme-induced asparagine and glutamine depletion and immune system function. **The American Journal Clinical Nutrition**, [Bethesda], v. 37, n. 6, p. 1025-1030, 1983.

KIRKPATRICK, S.; GELATT, C. D. JR.; VECCHI, M. P. Optimization by simulated annealing. **Science**, [S.l.], v. 220, p. 671–680, 1983.

LENGAUER, T.; RAREY, M. Computational methods for biomolecular docking. **Current Opinion in Structural Biology**, [S.l.], v. 6, p. 402-406, 1996.

LORENZI, P. L. et al. The Glutaminase Activity Of L-Asparaginase Is Not Required For Anticancer Activity Against Asns-Negative Cell Lines. **Blood**, [S.l.], v. 122, n. 21, p. 1, 2013.

MASHBURN, L. T.; WRISTON, J. C. Tumor inhibitory effect of L-asparaginase from *Escherichia coli*. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, [S.l.], v. 105, p. 451–452, 1964.

MENG, X. Y. et al. Molecular docking: a powerful approach for structure-based drug discovery. **Current Computer-Aided Drug Design**, [S.l.], p. 146-157, 2011.

MICHALSKA, K.; JASKÓLSKI, M. Structural aspects of l -asparaginases , their friends and relations. **Acta Biochimica Polonica**, [S.l.], v. 53, n. 4, p. 627–640, 2006.

MIYAMOTO, S; KOLLMAN, P. A. SETTLE: an analytical version of the SHAKE and RATTLE algorithm for rigid water models. **Journal of Computational Chemistry**, [S.l.], v. 12, n. 8, p. 952-962, 1992.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de Bioquímica de Lehninger**. 5. ed. Porto Alegre: Artmed, 2011.

OOSTENBRINK, C.; VILLA, A.; MARK, A. E.; VAN GUSNTEREN, W. F. A biomolecular force field based on the free enthalpy of hydration and solvation: the GROMOS force-field parameter sets 53A5 and 53A6. **Journal of Chemical Theory and Computation**, [S.l.], v. 25, n. 13, p. 1656-1676, 2004.

PEDROSA, F. Leucemia linfóide aguda: uma doença curável Acute lymphoblastic leukemia : a curable disease. **Revista Brasileira de Saúde Materno Infantil**, [S.l.], v. 2, n. 1, p. 63-68, 2002.

**Programa H++**. Disponível em: <http://biophysics.cs.vt.edu>. Acesso em: 21 abril 2017.

**Protein Data Bank.** Disponível em: <http://www.rcsb.org>. Acesso em: 10 abril 2017.

REDDY, E. R. et al. Exploration of the binding modes of L- asparaginase complexed with its amino acid substrates by molecular docking , dynamics and simulation. **3 Biotech**, [S.l.], p. 1-8, 2016.

REZENDE, Helena Aparecida de et al. A utilização de fitoterapia no cotidiano de uma população rural. **Revista da escola de enfermagem da USP**, São Paulo, 2002.

RODRIGUES, C. R. Modelagem molecular. **Química Nova na Escola**, [S.l.], v. 3, p. 43-49, 2001.

ROY, A.; KUCUKURAL, A.; ZHANG, Y. I-TASSER: a unified platform for automated protein structure and function prediction. **Nature Protocols**, [S.l.], v. 5, p. 725- 738, 2010.

SANCHES, M.; KRAUCHENCO, S.; POLIKARPOV, I. Structure, Substrate Complexation and Reaction Mechanism of Bacterial Asparaginases. **Current Chemical Biology**, [S.l.], v. 1, p. 75–86, 2007.

SANT'ANNA, C. M. R. Métodos de modelagem molecular para estudo e planejamento de compostos bioativos: uma introdução. **Revista Virtual de Química**, Rio de Janeiro, v. 1, p. 49-57, 2009.

SHEN, Y.; MAUPETIT, J.; DERREUMAUX, P.; TUFFERY, P. Improved PEP-FOLD Approach for Peptide and Miniprotein Structure Prediction. **Journal of Chemical Theory and Computation**, [S.l.], v. 10, p. 4745–4758, 2014.

SWAIN, A. Crystal structure of *Escherichia coli* L-asparaginase, an enzyme used in cancer therapy. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, [S.l.], v. 90, p. 1474–1478, 1993.

TROTT, O.; OLSON, A. J. AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization and multithreading. **Journal of Computational Chemistry**, [S.l.], v. 31, p. 455-461, 2010.

VALÉCIO, M. Fitoterápicos ganham espaço: guia da farmácia. São Paulo, 2016. Disponível em: <http://www.guiadafarmacia.com.br/suplementosespeciais/fito/fito-2016/10793-fitoterapicos-ganham-espaco>. Acesso em: 10 agosto 2017.

VERLI, H. **Bioinformática: da Biologia à Flexibilidade Molecular**. Porto Alegre: (org), 2014.

VOELZ, V. A. et al. Slow unfolded-state structuring in Acyl-CoA binding protein folding revealed by simulation and experiment. **Journal of the American Chemical Society**, [S.l.], p. 12565–12577, 2012.

WARANGKAR, S. C.; KHOBRAGADE, C., N.; DAWANE, B. S.; BHOSALE, R. B. Effect of dihydropyrimidine derivatives on kinetic parameters of *E. carotovora* L-

asparaginase. **International Journal of Biotechnology Applications**. [S.l.], v. 1, n. 1, p. 5-13, 2009.

WARREL, R. P. et al. Clinical evaluation of succinylated *Acinetobacter* glutaminase-asparaginase in adult leukemia. **Cancer Treatment Reviews**, [S.l.], v. 66, n. 7, p.1479-1485, 1982.

WATSON, J. D.; CRICK F. H. C. A Structure for Deoxyribose Nucleic Acid. **Nature**, [S.l.], v. 171, p. 737-738, 1953.

WEEB, E. C. **Enzyme nomenclature 1992. Recommendations of the Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology on the Nomenclature and Classification of Enzymes**, 6. ed. [S.l.], 1992.

WU, X.; JIN, Z.; XIU, Z. L.; LI, G. H. The Challenge to the Rule of Homology Modeling: Folding Mechanism Study of Protein G(A) and G(B) with High Sequence Identity but Different Native Structures. **Current Pharmaceutical Desing**, [S.l.], v. 19, p. 2282–2292, 2013.

YANG, J. et al. The I-TASSER Suite: protein structure and function prediction. **Nature Methods**, [S.l.], p. 7-8, 2015.

YOUNG, D. C. Computational chemistry: a practical guide for applying techniques to real- world problems. **Wiley-Interscience**, [S.l.], 2001, 369 p.

ZENI, A. L. B. et al. Utilização de plantas medicinais como remédio caseiro na Atenção Primária em Blumenau, Santa Catarina, Brasil. **Ciência & Saúde Coletiva**, [S.l.], v. 22, p. 2703-2712, 2017.

ZHANG, Y. I-TASSER server for protein 3D structure prediction. **BMC Bioinformatics**, [S.l.], 2008.