



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**  
**DE RECURSOS NATURAIS**

**JULIANA MENESES DE SENA SILVA**

**DESENVOLVIMENTO DE UM PROTOCOLO DE SIMULAÇÃO POR DINÂMICA  
MOLECULAR PARA AVALIAÇÃO ESTRUTURAL E ENERGÉTICA DE  
VARIANTES DA L-ASPARAGINASE HUMANA**

**FORTALEZA**

**2025**

JULIANA MENESES DE SENA SILVA

DESENVOLVIMENTO DE UM PROTOCOLO DE SIMULAÇÃO POR DINÂMICA  
MOLECULAR PARA AVALIAÇÃO ESTRUTURAL E ENERGÉTICA DE VARIANTES  
DA L-ASPARAGINASE HUMANA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia de Recursos Naturais da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Biotecnologia de Recursos Naturais. Área de concentração: Biologia estrutural de proteínas.

Orientador: Prof. Dr. Marcos Roberto Lourenzoni

Coorientadora: Dr. Ana Virginia Frota Guimarães

FORTALEZA

2025

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
Universidade Federal do Ceará  
Sistema de Bibliotecas  
Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

---

- S58d Silva, Juliana Meneses de Sena.  
Desenvolvimento de um protocolo de simulação por dinâmica molecular para avaliação estrutural e energética de variantes da l-asparaginase humana / Juliana Meneses de Sena Silva. – 2025.  
83 f. : il. color.
- Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia de Recursos Naturais, Fortaleza, 2025.  
Orientação: Prof. Dr. Marcos Roberto Lourenzoni.  
Coorientação: Profa. Dra. Ana Virginia Frota Guimaraes.
1. hASNase1. 2. Dinâmica Molecular. 3. Leucemia Linfoblástica Aguda. 4. Energia Livre de Ligação. I. Título.

CDD 660.6

---

JULIANA MENESES DE SENA SILVA

DESENVOLVIMENTO DE UM PROTOCOLO DE SIMULAÇÃO POR DINÂMICA  
MOLECULAR PARA AVALIAÇÃO ESTRUTURAL E ENERGÉTICA DE VARIANTES  
DA L-ASPARAGINASE HUMANA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia de Recursos Naturais da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Biotecnologia de Recursos Naturais. Área de concentração: Biologia estrutural de proteínas.

Aprovada em: 29/05/2025.

BANCA EXAMINADORA

---

Dr. Marcos Roberto Lourenzoni (Orientador)

Fundação Oswaldo Cruz/CE (Fiocruz/CE)

---

Dr. Gilvan Pessoa Furtado

Fundação Oswaldo Cruz/CE(Fiocruz/CE)

---

Dr. Carlos Alessandro Fuzo

Universidade de São Paulo (USP)

## AGRADECIMENTOS

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

Agradeço, em primeiro lugar, a Deus, pelo dom da vida, por iluminar meus caminhos e por me conceder forças para superar os desafios diários.

À Fundação Oswaldo Cruz – Ceará, pelo suporte e recursos disponibilizados, que contribuíram significativamente para a realização deste trabalho.

À Universidade Federal do Ceará, pela infraestrutura de excelência, pelas aulas enriquecedoras e pela oportunidade de cursar a Pós-Graduação em Biotecnologia de Recursos Naturais, espaço onde pude expandir meu conhecimento e crescer academicamente.

À Coordenação da Pós-Graduação em Biotecnologia de Recursos Naturais, pela grade curricular sólida e atualizada, que possibilitou o desenvolvimento de competências fundamentais para minha formação intelectual e profissional.

Ao meu orientador, Dr. Marcos Roberto Lourenzoni, e à minha coorientadora, Dra. Ana Virgínia Frota Guimarães, por toda a paciência, dedicação, orientação criteriosa e pelos inestimáveis ensinamentos ao longo desta jornada. Minha sincera gratidão por acreditarem no meu potencial e por conduzirem este trabalho com tanto compromisso.

Agradeço também aos professores da banca examinadora, Dr. Gilvan Pessoa Furtado e Dr. Carlos Alessandro Fuzo, pela disponibilidade, pelas valiosas contribuições e sugestões que enriqueceram significativamente este trabalho.

À minha família, em especial à minha mãe, Cosma, pelo amor incondicional, apoio constante e por sempre acreditar na minha capacidade.

Aos meus colegas de trabalho (Alana Lígia, João Eudes, Daniel Oliveira, Alice Queiroz, Ana Júlia e Axel) por tornarem o ambiente mais leve e acolhedor, e por estarem sempre dispostos a colaborar quando necessário.

Ao Professor Dr. Bruno Lopes, pela inspiração, apoio e incentivo fundamentais para minha entrada no mestrado. Sua confiança foi decisiva para que eu trilhasse este caminho.

Do início até o último porto, só interessa a viagem: às vezes tem tempestade, ondas enormes cobrem o barco; depois vem a calmaria e podemos desfrutar de um horizonte claro. Mas se durante essa travessia a gente prosseguir desejando o bom, o belo e o verdadeiro, então tudo terá valido a pena. (Lygia Fagundes Telles).

## RESUMO

A L-asparaginase é uma enzima amplamente empregada no tratamento da leucemia linfoblástica aguda (LLA), devido à sua capacidade de degradar a L- asparagina (Asn), essencial para a sobrevivência de células leucêmicas. No entanto, as formulações disponíveis são derivadas de fontes bacterianas e frequentemente associadas a reações imunológicas severas. Embora o organismo humano possua uma enzima homóloga, a hASNase1, sua baixa atividade catalítica inviabiliza sua aplicação clínica direta. Para contornar essa limitação, mutações vêm sendo propostas com o objetivo de aumentar sua eficiência. Este trabalho teve como objetivo desenvolver um protocolo computacional, baseado em simulações de dinâmica molecular e análises estruturais, para avaliar os efeitos estruturais e energéticos de variantes da hASNase1, identificando características moleculares associadas ao aumento de atividade catalítica. Os sistemas foram construídos com base na estrutura nativa da enzima e simulados em condições fisiológicas. A estabilidade estrutural foi avaliada por meio do desvio quadrático médio (RMSD), enquanto o potencial de interação interatômico (PII) e cálculos de energia livre de ligação foram utilizados para analisar as interações entre as variantes da hASNase1 e a Asn. Cálculos MM/PBSA indicaram afinidades de ligação crescentes na ordem D87S < D84N < A186V < D87N, consistentes com o tempo de residência do substrato no sítio catalítico. Experimentalmente, observou-se aumento de atividade catalítica de 17× (D87S), 19× (D84N), 50× (A186V) e 52× (D87N) em relação à enzima selvagem, confirmando a eficácia do protocolo DM + MM/PBSA para prever variantes de alto desempenho. Em conclusão, o protocolo de DM e MM/PBSA explicou os determinantes estruturais dos ganhos de atividade observados experimentalmente em variantes de hASNase1, apontando D87N e A186V como candidatas promissoras para uma L-asparaginase otimizada. O entendimento da relação entre estrutura e atividade catalítica em variantes da hASNase1 fortaleceu o uso de abordagens in silico no desenvolvimento racional de biofármacos mais seguros e eficazes para o tratamento da LLA.

**Palavras-chave:** hASNase1; dinâmica molecular; leucemia linfoblástica aguda; energia livre de ligação.

## ABSTRACT

L-asparaginase is an enzyme widely employed in the treatment of acute lymphoblastic leukemia (ALL) due to its ability to degrade L-asparagine (Asn), which is essential for the survival of leukemic cells. However, currently available formulations are derived from bacterial sources and are often associated with severe immune reactions. Although the human body possesses a homologous enzyme, hASNase1, its low catalytic activity precludes its direct clinical application. To overcome this limitation, mutations have been proposed to enhance its catalytic efficiency. This study aimed to develop a computational protocol, based on molecular dynamics (MD) simulations and structural analyses, to evaluate the structural and energetic effects of hASNase1 variants and to identify molecular features associated with increased catalytic activity. The systems were built based on the native structure of the enzyme and simulated under physiological conditions. Structural stability was assessed through root mean square deviation (RMSD), while interatomic interaction potentials (PII) and binding free energy calculations were used to analyze the interactions between hASNase1 variants and Asn. MM/PBSA calculations revealed increasing binding affinities in the order D87S < D84N < A186V < D87N, consistent with substrate residence times in the catalytic site. Experimentally, catalytic activity increases of 17× (D87S), 19× (D84N), 50× (A186V), and 52× (D87N) were observed compared to the wild-type enzyme, confirming the effectiveness of the DM + MM/PBSA protocol in identifying high-performance variants. In conclusion, the DM and MM/PBSA protocol elucidated the structural determinants underlying the experimentally observed activity gains in hASNase1 variants, identifying D87N and A186V as promising candidates for an optimized human L-asparaginase. Understanding the relationship between structure and catalytic activity in hASNase1 variants reinforces the use of in silico approaches in the rational development of safer and more effective biopharmaceuticals for the treatment of ALL.

**Keywords:** hASNase1; molecular dynamics; acute lymphoblastic leucemia; binding free energy.

## LISTA DE ABREVIATURA E SIGLAS

AGA	Aspartilglucosaminidase lisossomal
ANVISA	Agência Nacional De Vigilância Sanitária
CAR-T	Chimeric Antigen Receptor T-cell
DM	Dinâmica Molecular
E. coli	<i>Escherichia coli</i>
EcII	L-asparaginase de <i>Escherichia coli</i> tipo II
GEPeSS	Grupo de Engenharia de Proteínas e Soluções para a Saúde GROMACS <i>Groningen MACHine for Chemical Simulation</i>
hASNase1	L-asparaginase humana 1
hASNase3	L-asparaginase humana 3
INCA	Instituto Nacional de Câncer
kcal	Quilocaloria
kat	Constante de turnover
kDa	Quilodalton
K <sub>m</sub>	Constante de Michaelis-Menten
LLA	Leucemia Linfóide Aguda
μM	Micromolar
MM/PBSA	<i>Molecular Mechanics Poisson-Boltzmann Surface Area Method</i> - Mecânica Molecular de Poisson-Boltzmann com Solvatação da Área de Superfície
n	Coefficiente de Hill
nm	Nanômetro
NPT	Ensemble isotérmico-isobárico - Número de partículas, Pressão e Temperatura
ns	nanossegundo
NVT	Ensemble canônico - Número de partículas, Volume e Temperatura
OMS	Organização Mundial da Saúde
PII	Potencial de Interação Interatômico
RMSD	<i>Root Mean Square Deviation</i> – Desvio Quadrático Médio
teq	Tempo de equilíbrio estrutural

$v_0$	Velocidade inicial
$V_{\text{máx}}$	Velocidade máxima

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>11</b>
<b>1.1</b>	<b>Leucemia linfoide aguda</b> .....	<b>11</b>
<b>1.2</b>	<b>Enzimas</b> .....	<b>13</b>
<b>1.3</b>	<b>Enzimas L-asparaginases</b> .....	<b>17</b>
<b>1.4</b>	<b>Ação das L-asparaginases no tratamento da LLA</b> .....	<b>19</b>
<b>1.5</b>	<b>Enzima hASNase1</b> .....	<b>22</b>
<b>1.6</b>	<b>Mutações na hASNase1</b> .....	<b>24</b>
<b>1.7</b>	<b>Dinâmica molecular</b> .....	<b>27</b>
<b>1.8</b>	<b>Cálculos de energia livre de ligação</b> .....	<b>30</b>
<b>1.9</b>	<b>Mecânica Molecular de Poisson-Boltzmann com Solvatação da Área de Superfície (MM/PBSA)</b> .....	<b>32</b>
<b>2</b>	<b>JUSTIFICATIVA</b> .....	<b>34</b>
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>36</b>
<b>3.1</b>	<b>Objetivo geral</b> .....	<b>36</b>
<b>3.2</b>	<b>Objetivos específicos</b> .....	<b>36</b>
<b>4</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>36</b>
<b>4.1</b>	<b>Obtenção das estruturas das variantes estudados e definição dos sistemas de estudo</b> .....	<b>36</b>
<b>4.2</b>	<b>Simulação de dinâmica molecular e definições dos sistemas</b> .....	<b>38</b>
<b>4.3</b>	<b>Root Mean Square Deviation</b> .....	<b>41</b>
<b>4.4</b>	<b>Potencial de interação interatômico</b> .....	<b>42</b>
<b>4.5</b>	<b>Cálculo de energia livre de ligação pelo gmx_MMPBSA</b> .....	<b>42</b>
<b>5</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>43</b>
<b>5.1</b>	<b>Análise de RMSD e comportamento estrutural das variantes de hASNase1 nos Sistemas D84N, D87S e A186V-4ASN</b> .....	<b>43</b>
<b>5.2</b>	<b>Análise dos PII dos resíduos dos sítios catalíticos das variantes de</b>	

hASNase 1 com os respectivos substratos .....	45
<b>5.3</b> <b>Análise de PII dos resíduos dos sítios alostéricos das variantes de</b> <b>hASNase1 com os respectivos substratos .....</b>	<b>51</b>
<b>5.4</b> <b>Análise de PII do resíduo 84 com as asparaginas, nas variantes D84N,</b> <b>D87S, A186V e A186V-4ASN .....</b>	<b>53</b>
<b>5.5</b> <b>Análise de PII do resíduo 87 com as asparaginas, nas variantes D84N,</b> <b>D87S, A186V e A186V-4ASN .....</b>	<b>56</b>
<b>5.6</b> <b>Análise de PII do resíduo 186 com as asparaginas alostéricas, nas</b> <b>variantes D87N, D84N, D87S, A186V e hASNase1.....</b>	<b>58</b>
<b>5.7</b> <b>Análise de PII da lisina 188 com as asparaginas catalíticas,</b> <b>nas variantes D87N, D84N, D87S, A186V, A186V-4ASN e hASNase1.....</b>	<b>60</b>
<b>5.8</b> <b>Análise de energia livre de ligação .....</b>	<b>62</b>
<b>5.8.1</b> <i>EcII de E. coli</i> .....	62
<b>5.8.2</b> <i>hASNase1</i> .....	63
<b>5.8.3</b> <i>Variante A186V</i> .....	64
<b>5.8.4</b> <i>Variante A186V-4ASN</i> .....	65
<b>5.8.5</b> <i>Variante D87N</i> .....	67
<b>5.8.6</b> <i>Variante D84N</i> .....	68
<b>5.8.7</b> <i>Variante D87S</i> .....	69
<b>5.9</b> <b>Relação entre Energia livre de ligação e PII nos sistemas avaliados .....</b>	<b>71</b>
<b>5.10</b> <b>Distancias médias entre os resíduos do sítio catalítico nas variantes de</b> <b>hASNase1.....</b>	<b>72</b>
<b>6</b> <b>CONCLUSÃO .....</b>	<b>75</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>76</b>

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Leucemia linfoide aguda

O câncer é uma patologia caracterizada pelo crescimento desordenado de células, que podem invadir tecidos adjacentes ou órgãos distantes. O rápido crescimento dessas células pode ser agressivo e incontrolável, levando à formação de neoplasias, também chamadas de tumores. A principal característica dessa doença é a capacidade dessas células de se espalharem e comprometerem outros tecidos do organismo (BROWN et al., 2023; INCA, 2019).

O câncer desenvolve-se a partir de mutações genéticas, isto é, alterações no DNA celular que resultam em instruções anômalas para o funcionamento celular. Conseqüentemente, essa patologia pode manifestar-se em qualquer tecido do organismo, sendo classificada em distintos tipos, conforme sua origem anatômica (INCA, 2022; SATTOJU & MARAM, 2023). Atualmente existem mais de 200 tipos de câncer, dentre esses, cinco tipos são os mais comuns em pacientes. Podendo ser do tipo carcinoma, quando começam em tecidos epiteliais, como pele ou mucosas; sarcomas, quando se originam nos tecidos conjuntivos, como osso, músculo ou cartilagem; leucemias, quando se desenvolvem nos tecidos formadores de sangue, que leva a superprodução de células brancas anormais; linfomas, que afetam o sistema linfático, incluindo o linfoma de Hodgkin e o não Hodgkin; e o mieloma, quando se originam em células plasmáticas, comprometendo a medula óssea (DE, 2022; ZELIGER, 2023).

Dentre os diversos tipos de câncer supracitados, a Leucemia abrange uma ampla gama de malignidades hematopoiéticas, que são sub categorizadas de acordo com sua morfologia, imunofenótipo, anormalidades citogenéticas e moleculares e características clínicas. Basicamente, essa doença se caracteriza pelo excesso de glóbulos brancos observado na corrente sanguínea dos pacientes (PETRAKIS, 1964; WHITELEY, et al. 2021). Nesse tipo de câncer, as células sanguíneas cancerígenas se desenvolvem afetando a produção das células sanguíneas saudáveis da medula óssea, diminuindo seu número normal, com isso a medula passa a produzir células imaturas e anormais, chamadas de blastos e essas tomam o lugar das células sanguíneas na medula, no sangue e no sistema linfático. Os quatro principais tipos de leucemia são: leucemia linfoide aguda, leucemia mieloide aguda, leucemia linfocítica crônica e leucemia mieloide crônica (INCA, 2019; WHITELEY, et al. 2021).

Em 2020, foram estimados aproximadamente 475 mil casos de leucemia em todo o mundo, representando cerca de 2,5% de todas as neoplasias malignas. Dentre esses, 270 mil

ocorreram em homens, com uma taxa de incidência estimada em 6,3 casos por 100 mil indivíduos do sexo masculino. Entre as mulheres, foram registrados cerca de 205 mil novos casos, correspondendo a uma taxa de 4,5 casos por 100 mil mulheres (FERLAY et al., 2020).

Para o Brasil, estima-se a ocorrência de 11.540 novos casos de leucemia por ano no período de 2023 a 2025, o que corresponde a um risco estimado de 5,33 casos por 100 mil habitantes. Desse total, aproximadamente 6.250 casos deverão ocorrer em homens e 5.290 em mulheres, resultando em taxas de incidência estimadas de 5,90 por 100 mil homens e 4,78 por 100 mil mulheres, respectivamente (INCA, 2023).

A leucemia linfóide aguda (LLA) é o tipo de leucemia mais comum na infância, representando cerca de 75% dos casos pediátricos. Embora menos frequente em adultos, sua ocorrência nessa faixa etária está associada a um prognóstico menos favorável, com taxas de cura inferiores às observadas em crianças. Essa diferença pode ser atribuída a fatores como a menor tolerância dos adultos a tratamentos intensivos e características biológicas distintas da doença entre as faixas etárias (INCA, 2019; MANCINI, 2022).

As LLAs são neoplasias caracterizadas pela proliferação descontrolada de linfoblastos, células precursoras imaturas da linhagem B (pré-B) ou T (pré-T). A LLA de linhagem B é a forma mais comum, representando aproximadamente 85% dos casos, especialmente em crianças, onde se manifesta predominantemente como leucemia aguda. Em contrapartida, a LLA de linhagem T é menos frequente e geralmente se apresenta como linfoma tímico, principalmente em adolescentes do sexo masculino. Apesar das diferenças entre os subtipos, ambos compartilham características clínicas semelhantes, permitindo que sejam frequentemente estudados em conjunto (STRAUCHEN, 1996; NIH, SEER, 2024).

O tratamento para LLA é dividido em quatro fases diferentes: indução de remissão, consolidação, intensificação e manutenção de longo prazo. Os tipos de tratamento para LLA mais comuns que estão disponíveis para os pacientes são: radioterapia, quimioterapia, terapia direcionada e transplante de células tronco. Mundialmente diferentes regimes quimioterápicos de indução são utilizados no tratamento de pacientes com LLA, os principais são: daunorrubicina, doxorubicina ou idarrubicina; prednisolona ou dexametasona; vincristina; asparaginase; ciclofosfamida; 6-mercaptopurina; e metotrexato (AURELI et al., 2023; MALCZEWSKA et al., 2022).

Porém a maioria desses quimioterápicos causam efeitos colaterais prejudiciais aos pacientes, pois além de atacarem as células cancerosas também atacam as células saudáveis do organismo. A amplitude e a natureza desses efeitos colaterais podem variar conforme fatores

como o tipo de medicamento, a dosagem utilizada e o período de tratamento (BROWN et al., 2021; ŚLIWA-TYTKO et al., 2022).

## 1.2 Enzimas

Enzimas são biocatalisadores importantes, altamente específicos e eficientes na catálise de reações bioquímicas essenciais para todos os seres vivos. Todas as enzimas são proteínas cuja atividade catalítica depende da integridade de suas conformações nativas. Quando uma enzima é desnaturada, tem suas subunidades dissociadas ou seus aminoácidos degradados, ela perde a capacidade catalítica. Dessa forma, a manutenção das estruturas primária, secundária, terciária e quaternária das proteínas é fundamental para o pleno funcionamento das enzimas. (NELSON; COX, 2019).

As enzimas apresentam peso molecular que pode variar desde pequenas proteínas de cerca de 10 a 20 kDa, até grandes complexos multienzimáticos que ultrapassam 1 MDa. Algumas requerem grupos químicos adicionais, denominados cofatores, que podem consistir em íons inorgânicos, como  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$  ou  $\text{Zn}^{2+}$ , ou em moléculas orgânicas ou metalorgânicas complexas chamadas coenzimas. Essas coenzimas atuam como transportadoras transitórias de grupos funcionais específicos. A maioria das coenzimas é derivada de vitaminas, que são nutrientes orgânicos essenciais em pequenas quantidades na dieta (NELSON; COX, 2019).

A característica fundamental para que uma enzima realize a catálise é a presença de uma região denominada sítio ativo, onde o substrato, molécula sobre a qual a enzima atua, liga-se especificamente. O sítio ativo consiste em uma cavidade formada por resíduos de aminoácidos cujos grupos nas cadeias laterais interagem com o substrato, facilitando sua transformação química. Frequentemente, o sítio ativo envolve o substrato de forma a isolá-lo completamente do meio aquoso circundante. (NELSON; COX, 2019). Também pode haver nas enzimas a presença de sítios alostéricos de regulação. O termo “alostérico” deriva do grego *allos*, que significa “outro”, e *stereos*, que significa “sólido” ou “forma”. A interação de um ligante com sítios alostéricos pode induzir mudanças conformacionais na enzima, alternando entre formas mais ativas e menos ativas da proteína. Moduladores alostéricos, que podem ser inibidores ou ativadores, atuam ao se ligarem a esses sítios, afetando as propriedades de ligação em outros locais da mesma enzima, incluindo o sítio ativo. (WILSON; WALKER, 2010).

As propriedades características das enzimas conferem-lhes vantagens para aplicação como fármacos. Primeiramente, as enzimas apresentam alta afinidade e especificidade ao se ligarem e atuarem sobre seus alvos. Em segundo lugar, sua natureza catalítica permite converter múltiplas moléculas-alvo em produtos desejados. Dessa forma, as enzimas tornam-se fármacos específicos e potentes, com potencial terapêutico superior ao de muitas moléculas pequenas (VELLARD 2003). Além de sua aplicação na indústria farmacêutica, as enzimas desempenham papel fundamental em diversos setores, como os das indústrias alimentícia, têxtil e agropecuária, entre outras. Elas são utilizadas tanto na produção de compostos e produtos quanto na aceleração de inúmeras reações biológicas e químicas, tornando-se, assim, indispensáveis para os processos vitais e industriais. (KUMAR et al., 2024; NDOCHINWA et al., 2024).

Para realizar a catálise, as enzimas atuam reduzindo a energia de ativação necessária para a conversão do substrato em produto, acelerando assim a velocidade das reações químicas que, na ausência de um catalisador, seriam extremamente lentas. Durante uma reação enzimática típica, forma-se um complexo reversível denominado enzima-substrato (ES). Esse complexo posteriormente se decompõe, liberando o produto (P) da reação e regenerando a enzima para novos ciclos catalíticos. (BERG; TYMOCZKO; STRYER, 2014). Esse processo pode ser descrito pela Equação 1:



Em que E é a enzima, S é o substrato, P é o produto e ES o complexo enzima-substrato; k1: constante de velocidade de formação do complexo; k-1: constante de velocidade de dissociação do complexo ES; k2: constante de velocidade de decomposição do complexo ES, formando o produto.

No mecanismo enzimático, a enzima se liga reversivelmente ao substrato, formando um complexo enzima-substrato, que em seguida se dissocia irreversivelmente para liberar o produto e regenerar a enzima. A velocidade com que o produto é formado pode ser descrita pela equação de Michaelis-Menten (Equação 2), que assume que a concentração do complexo enzima-substrato permanece constante durante a reação, condição conhecida como estado estacionário. Esse estado caracteriza-se pela manutenção constante dos intermediários da reação, representando o passo limitante da velocidade. A equação deduzida por Michaelis e

Menten relaciona a velocidade inicial da reação ( $v_o$ ) e a velocidade máxima ( $V_{m\acute{a}x}$ ) com a concentração do substrato ( $[S]$ ). A constante de Michaelis-Menten ( $K_m$ ) representa a concentração de substrato na qual a velocidade inicial é metade da máxima, sendo um parâmetro fundamental para avaliar a eficiência cinética das enzimas. Quando uma enzima atua sobre diferentes substratos, o  $K_m$  auxilia na identificação daquele pelo qual a afinidade enzimática é maior, já que valores menores de  $K_m$  indicam maior afinidade. Assim, enzimas com baixos valores de  $K_m$  alcançam sua velocidade máxima em concentrações menores de substrato. Para a maioria das enzimas, o  $K_m$  varia entre  $10^{-1}$  e  $10^{-7}$  molar. (VOET; VOET, 2013). Entretanto, vale ressaltar que alguns fatores podem afetar a cinética das reações como, mudanças na concentração do substrato, pH, temperatura, presença de inibidores ou ativadores, entre outras (VOET; VOET, 2013). A equação de Michaelis-Menten está descrita na Equação 2.

$$v_o = \frac{V_{m\acute{a}x}[S]}{K_m + [S]} \quad (2)$$

Neste caso,  $K_m$  é a concentração de substrato  $[S]$  que produz metade da velocidade máxima,  $V_{m\acute{a}x}$ . Ou seja,  $K_m = [S]$  quando  $v_o = V_{m\acute{a}x}/2$ .

A constante  $K_m$  também pode ser interpretada como um indicador inverso da afinidade da enzima pelo substrato: quanto menor o  $K_m$ , maior a afinidade, especialmente quando a etapa limitante da reação é a dissociação do complexo enzima-substrato. Mutações em resíduos localizados no entorno do sítio ativo, sobretudo aqueles envolvidos no reconhecimento e na estabilização do substrato, podem modificar o  $K_m$  ao facilitar ou dificultar a ligação do substrato. Por exemplo, substituições que ampliam a cavidade catalítica, reduzem repulsões eletrostáticas, ou introduzem ligações de hidrogênio favoráveis, tendem a diminuir o valor de  $K_m$ . Dessa forma, análises cinéticas de variantes enzimáticas com alterações estruturais no sítio catalítico ou em regiões adjacentes à entrada do substrato são essenciais para compreender como essas modificações influenciam a eficiência catalítica e seu possível uso terapêutico. No estudo de Guimarães et al. (2019), simulações de dinâmica molecular com a L-

asparagina posicionada no sítio catalítico mostraram que, sob determinadas condições, o substrato pode se deslocar para fora da cavidade catalítica, mas permanecer próximo à região de entrada, ainda interagindo com resíduos específicos. Esses resíduos parecem atuar como uma "barreira parcial", modulando a permanência da Asn nas imediações do sítio catalítico, um fator que pode influenciar a reincorporação do substrato e, conseqüentemente, a eficiência da catálise. A partir desse comportamento observado na liberação do substrato, é razoável supor que mutações nesses resíduos periféricos também possam afetar a entrada da Asn, favorecendo ou dificultando sua estabilização no sítio ativo. Esse impacto pode se refletir diretamente nos valores de  $K_m$ , ao alterar a afinidade aparente da enzima pelo substrato. A equação de Michaelis-Menten foi fundamental para o avanço da enzimologia, mas não é capaz de descrever adequadamente as propriedades cinéticas de muitas enzimas, especialmente as alostéricas. Essas enzimas apresentam curvas de velocidade da reação ( $v_0$ ) em função da concentração do substrato ( $[S]$ ) com formato sigmoidal, ao contrário das curvas hiperbólicas previstas pela cinética de Michaelis-Menten. Tal comportamento ocorre porque a ligação do substrato a um sítio ativo em uma subunidade da enzima pode alterar a afinidade dos outros sítios ativos, caracterizando uma interação cooperativa. Essa cooperatividade implica que a ligação de substrato a um sítio facilita a ligação nos demais, aumentando a eficiência da enzima. Para modelar esse fenômeno, a cinética das enzimas alostéricas é frequentemente descrita pela equação de Hill (Equação 3), que considera a cooperatividade entre as subunidades enzimáticas (BERG; TYMOCZKO; STRYER, 2014).

$$V = \frac{V_{m\acute{a}x} [S]^n}{[S]_{0.5}^n + [S]^n} \quad (3)$$

Onde  $V$  é a velocidade inicial da reação enzimática,  $V_{m\acute{a}x}$  é a velocidade máxima,  $[S]$  é a concentração de substrato,  $[S]_{0.5}$  é a concentração de substrato que produz metade da velocidade, e  $n$  é o coeficiente de Hill, que indica o grau de cooperatividade da enzima não-michaeliana (HILL, 1910).

Os parâmetros cinéticos de uma enzima permitem quantificar sua eficiência catalítica. Além dos parâmetros já mencionados, destaca-se a constante  $k_{cat}$ , também conhecida como número de turnover ou constante de renovação. Esse parâmetro indica quantas vezes cada sítio ativo da enzima realiza a catálise de uma reação por unidade de tempo (Equação 4). O  $k_{cat}$

é calculado a partir da velocidade máxima ( $V_{m\acute{a}x}$ ) dividida pela concentração total de enzima ativa ( $[E_t]$ ) (VOET; VOET, 2013), como mostrado na Equação 4.

$$k_{cat} = \frac{V_{m\acute{a}x}}{[E_t]} \quad (4)$$

A relação entre  $k_{cat}$  e  $K_m$  funciona como uma constante aparente de segunda ordem, que representa a velocidade da reação enzimática em função da frequência de encontros entre a enzima e o substrato na solução. Por esse motivo, o valor de  $k_{cat}/K_m$  é amplamente utilizado para avaliar a eficiência catalítica da enzima de maneira quantitativa (BISSWANGER, 2017).

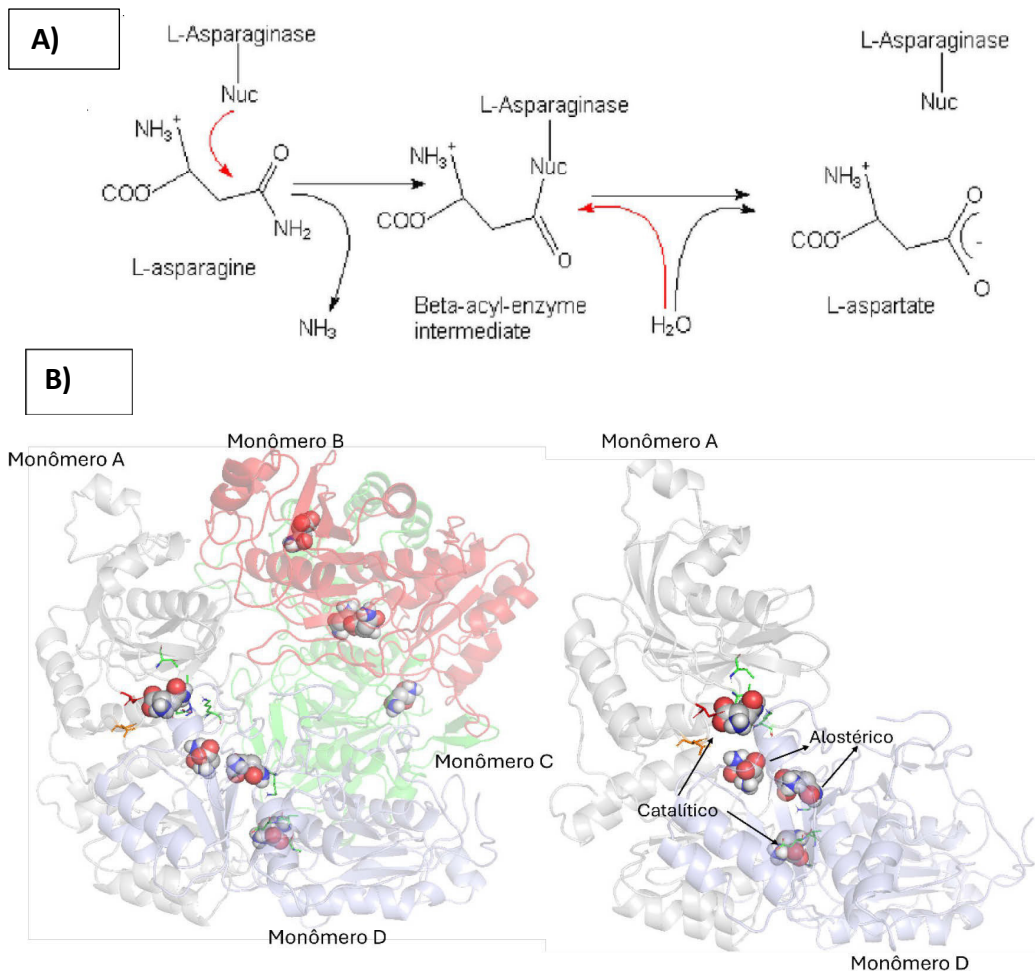
### 1.3 Enzimas L-asparaginases

As enzimas responsáveis pela catálise da asparagina são conhecidas como asparaginases (E.C. 3.5.1.1). A asparagina é um aminoácido essencial para a biossíntese proteica, fundamental tanto para células normais quanto para células cancerígenas. Consequentemente, a ausência desse aminoácido compromete a proliferação celular (IUBMB; IUPAC, 2023). As L-asparaginases (ASNases) geralmente possuem massa aproximada de 145 kDa e apresentam estrutura tetramérica, que pode ser organizada como homotetrâmero (quatro monômeros idênticos) ou como dímero de dímeros (homodímeros), com cada monômero apresentando por volta de 300 resíduos de aminoácido (MICHALSKA; JASKOLSKI, 2006) (Figura 1A).

As L-asparaginases bacterianas geralmente apresentam estruturas terciária e quaternária, organizadas na forma de proteínas homotetraméricas com peso molecular entre 140 e 150 kDa. Cada subunidade é composta por, aproximadamente, 330 aminoácidos e possui uma conformação estruturada em dois domínios  $\alpha/\beta$ , conectados por uma hélice aleatória com cerca de 21 resíduos. Os sítios ativos dessas enzimas são divididos em duas regiões distintas: uma porção rígida, responsável pela ligação ao ligante, e uma região flexível. Esta última, altamente conservada entre as L-asparaginases bacterianas, desempenha um papel essencial no controle do acesso ao bolso de ligação da enzima e na realocação de resíduos catalíticos críticos. (SWAIN, 1993; MAGGI; SCOTTI, 2022).

No mecanismo de ação da L-asparaginase (Figura 1B), a hidrólise da L- asparagina ocorre em duas etapas e é mediada por um intermediário  $\beta$ -acil-enzima. Na primeira fase, um resíduo nucleofílico da enzima é ativado por uma base forte ( $\text{NH}_2$ ), permitindo o ataque ao carbono da amida da L-asparagina, o que resulta na formação do intermediário  $\beta$ -acil-enzima. Na etapa subsequente, esse intermediário reage com o carbono da ligação éster ( $\text{R}-\text{C}=\text{O}$ ), após a ativação de uma molécula de água como nucleófilo, liberando L- aspartato e amônia. Embora a especificidade seja maior para a L-asparagina, a L- asparaginase também é capaz de hidrolisar amidas peptídicas, como L-glutamina (L-Gln) e L-aspartil, embora com menor eficiência (HOSSEINI, et al., 2024; POKROVSKAYA et al., 2022).

Figura 1 - Representação do mecanismo de ação e estrutura de uma L- asparaginase. A) Esquema do mecanismo de ação da L-asparaginase em duas etapas, com a formação de um intermediário covalente por meio de um ataque nucleofílico realizado pela própria enzima. B) Representação da estrutura da L- asparaginase humana 1, evidenciando asparaginas nos sítios catalíticos (em esferas) e alostéricos (em esferas). Monômero A em cinza, B em vermelho, C em verde e D em azul.



Fonte: Elaborado pela autora.

As L-asparaginases são classificadas em várias subclasses, definidas com base em critérios como a sequência de aminoácidos, especificidade pelo substrato, organismo de origem, além de suas propriedades estruturais e biofísicas (LUBKOWDKI, WLODAWER, 2021). Elas são classificadas em três grupos principais: vegetal, *Rhizobium etli* e bacteriano. O grupo bacteriano é ainda subdividido em dois tipos: tipo I e tipo II. As enzimas do tipo I são expressas constitutivamente, localizadas no citoplasma e possuem um Km relativamente alto para a L-asparagina, o que limita seu uso terapêutico. Em contraste, as enzimas do tipo II são periplásmicas, apresentam alta afinidade pela L-asparagina e ampla especificidade de substrato, exibindo potente atividade antitumoral. As L-asparaginases são encontradas em uma variedade de organismos incluindo animais, plantas e microrganismos (bactérias, fungos, algas, leveduras e actinomicetos). Com isso torna-se fácil a produção dessa enzima em larga escala, principalmente a partir dos microrganismos, devido aos seus métodos de produção mais fáceis (BATOOL et al, 2016). Devido a essas características, somadas à alta afinidade e catálise, duas isoformas do tipo II, provenientes de *Escherichia coli* e *Erwinia chrysanthemi*, foram amplamente estudadas nas últimas décadas por suas propriedades terapêuticas no tratamento da LLA.

Estudos revelaram que o genoma humano codifica três tipos distintos de L-asparaginases. A primeira é a aspartilglucosaminidase lisossomal (AGA), uma enzima com função primária de remover asparagina ligada à grupos de carboidratos, não sendo capaz de hidrolisar asparagina livre, caracteriza-se como uma enzima do tipo vegetal. A segunda, denominada hASNase3, exibe alta homologia com a L-asparaginase tipo II de *Escherichia coli*. Por fim, a terceira, conhecida como lisofosfolipase de 60 kDa ou hASNase1, é uma enzima que compartilha características estruturais e funcionais com as L-asparaginases bacterianas, especialmente aquelas do tipo I. A hASNase1 possui um domínio N-terminal ativo que lhe confere atividade de L-asparaginase, permitindo a hidrólise de lisofosfolipídios e L-asparagina (KARAMITOS; KORAND, 2014; NOMME; SU; LAVIE, 2014).

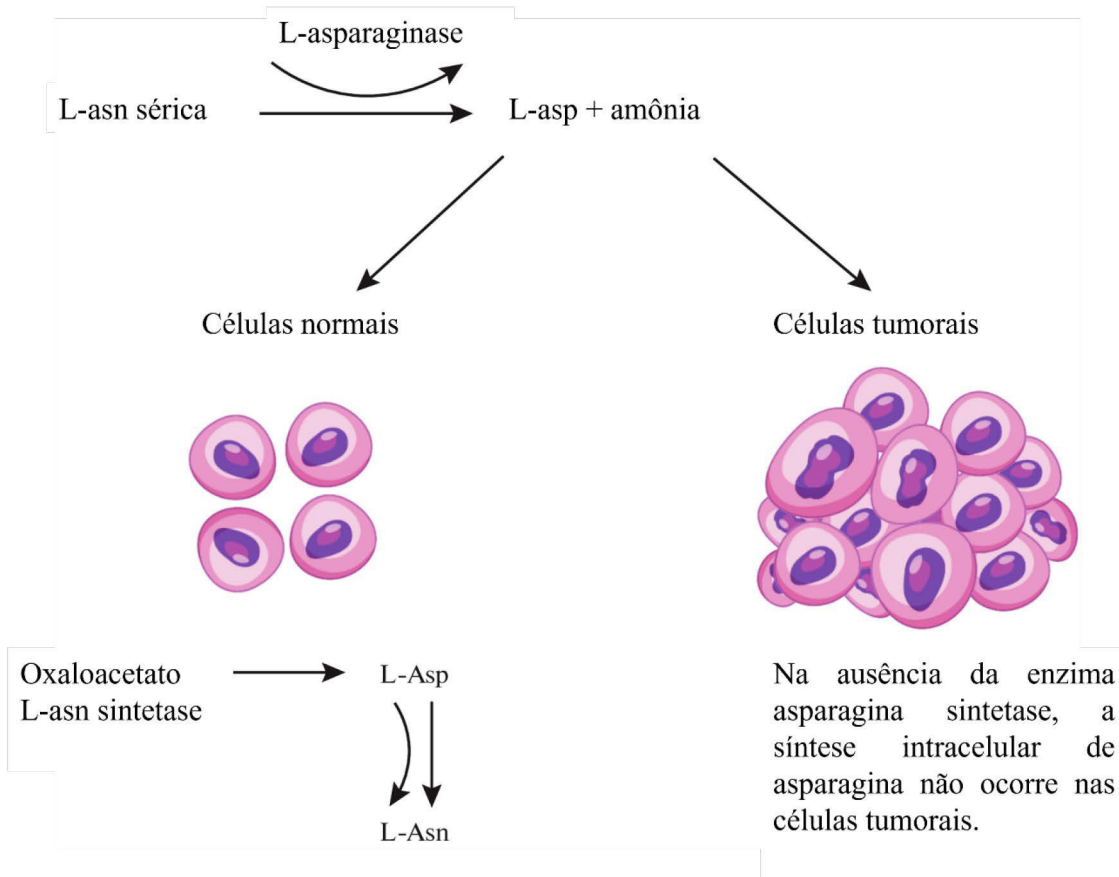
#### **1.4 Ação das L-asparaginases no tratamento da LLA**

A L-asparaginase foi a primeira enzima descoberta com efeitos antineoplásicos e, desde então, tem sido amplamente estudada por pesquisadores ao redor do mundo. Sua primeira observação ocorreu em 1904, e, a partir daí, as investigações continuaram. Em 1922, Clementi

identificou a presença de L-asparaginase no soro sanguíneo do porquinho-da-índia. Posteriormente, em 1953, Kidd demonstrou, por meio de uma série de experimentos, que o soro de cobaia possuía atividade inibidora de tumores. Em um desses experimentos, o linfossarcoma foi induzido por via subcutânea em camundongos, que não apresentaram proliferação tumoral quando receberam injeções do soro de cobaia, enquanto os camundongos do grupo controle sucumbiram aos carcinomas. Esses resultados foram confirmados pelas pesquisas de Broome, em 1961, que demonstraram o potencial antitumoral da L-asparaginase (BROOME, 1963; OLD et al., 1963; WANG et al., 2022). No entanto, o soro do porquinho-da-índia não era viável para produção em larga escala, o que levou à busca por outras fontes da enzima. Paralelamente, diversos estudos identificaram a atividade de L-asparaginase em bactérias. Pesquisas com *Escherichia coli* revelaram que a enzima produzida por essa bactéria também apresentava atividade antitumoral promissora. Investigações posteriores mostraram que *E. coli* codifica duas isoformas de L-asparaginase, denominadas EcI e EcII, sendo que apenas a isoforma tipo II demonstrou atividade farmacologicamente relevante (BATOOL et al. 2015; EGLER; AHUJA; MATLOUB, 2016).

A L-asparaginase atua catalisando a degradação da asparagina em ácido aspártico e amônia e por isso é eficaz no tratamento da LLA. Em indivíduos saudáveis, a maioria das células é capaz de suprir suas necessidades de asparagina por meio da biossíntese endógena, mediada pela enzima asparagina sintetase. Esse processo envolve a transaminação do oxaloacetato, gerando um intermediário aspartato, que recebe um grupo amino do glutamato, formando  $\alpha$ -cetogluturato e aspartato; este, por sua vez, é convertido em asparagina. Em contraste, muitas células leucêmicas apresentam deficiência ou ausência da asparagina sintetase, o que as torna incapazes de sintetizar esse aminoácido de forma eficiente e, portanto, dependentes de sua disponibilidade exógena para manter a viabilidade e a proliferação celular. A administração sistêmica de L-asparaginase leva à rápida depleção dos níveis plasmáticos de asparagina, que caem de aproximadamente 50  $\mu$ M para menos de 3  $\mu$ M, induzindo um estado de privação metabólica que inibe a síntese proteica e culmina em apoptose e bloqueio da multiplicação das células leucêmicas (Figura 2) (BATOOL et al. 2015; EGLER; AHUJA; MATLOUB, 2016).

Figura 2 - Mecanismo de ação da L-asparaginase em células normais e tumorais. A enzima degrada a asparagina (L-Asn) sérica em ácido aspártico (L-Asp) e amônia. Células normais sintetizam L-Asn endogenamente via asparagina sintetase, mantendo sua viabilidade. As células leucêmicas, deficientes nessa enzima, não conseguem sintetizar asparagina, tornando-se suscetíveis à depleção extracelular promovida pela L- asparaginase.



Fonte: Adaptado de Hosseini et al. 2024.

Na área da saúde, a L-asparaginase é amplamente reconhecida por suas propriedades antileucêmicas, sendo um agente quimioterápico de grande relevância terapêutica. Utilizada em combinação com outros fármacos, essa enzima é essencial no tratamento de diversas neoplasias, com destaque para a leucemia linfoblástica aguda, especialmente em crianças. Além disso, a L- asparaginase tem sido aplicada no tratamento de outras doenças malignas, como doença de Hodgkin, leucemia mielocítica aguda, leucemia mielomonocítica aguda, leucemia linfocítica crônica, linfossarcoma, reticulossarcoma e melanossarcoma (SHAFQAT et al, 2023, BATOOL, et al. 2016, BROME, 1963). Apesar de ser amplamente utilizada na terapia antileucêmica, seu uso é frequentemente limitado por efeitos adversos

relacionados à imunogenicidade. Como uma proteína de origem bacteriana, ela possui alto potencial de desencadear respostas imunológicas em pacientes. Após sua administração, a enzima pode ser degradada por proteases lisossomais, como catepsina B e asparagina endopeptidase, presentes em linfoblastos normais e leucêmicos. Esse processamento proteolítico aumenta a apresentação de antígenos e promove o desenvolvimento de anticorpos anti-L- asparaginase, resultando em reações que variam de alergias leves a manifestações sistêmicas graves, potencialmente fatais (RADADIYA et al., 2020; PATEL et al., 2009; ASSELIN; FISHER, 2014; EGLER; AHUJA; MATLOUB, 2016).

Para minimizar esses efeitos adversos, diferentes formulações de L- asparaginase foram desenvolvidas. Entre elas, destacam-se Erwinase e Rylaze, derivadas de *Erwinia chrysanthemi*, e três variantes obtidas de *Escherichia coli*. Dentre estas, uma é a forma nativa, enquanto as outras duas são versões peguiladas, nas quais a enzima é modificada com polietilenoglicol (PEG). A peguilação tem como objetivo aumentar a meia-vida da enzima no organismo e reduzir sua imunogenicidade, tornando-a uma opção preferencial em muitos protocolos terapêuticos. No entanto, mesmo com essa modificação, ainda são relatados eventos adversos em alguns pacientes, como reações alérgicas e outros efeitos indesejados (KHABADE; SIRIGIRI; RAM, 2024; KOPRIVNIKAR; MCCLOSKEY; FADERL, 2017).

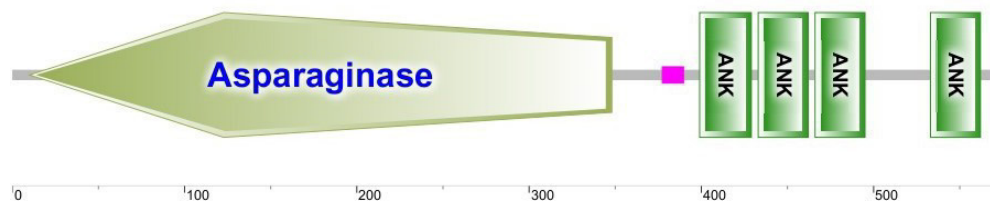
Apesar de estar em uso clínico há mais de quatro décadas, a L- asparaginase continua associada a uma série de efeitos colaterais, incluindo pancreatite, hipercoagulabilidade, disfunção hepática, neurotoxicidade e reações de hipersensibilidade. Esses desafios têm impulsionado o desenvolvimento de variantes com perfis de toxicidade melhorados, visando maior segurança e eficácia terapêutica (LUBKOWDKI; WLODAWER, 2021; SENGUPTA et al., 2024).

### **1.5 Enzima hASNase1**

A hASNase é uma L-asparaginase citoplasmática caracterizada por uma organização em dois domínios. O domínio N-terminal (hASNase1) está localizado entre os resíduos 1 e 369 de uma proteína maior conhecida como lisofosfolipase, que possui 60 kDa e é composta por 573 resíduos de aminoácidos. Já o domínio C-terminal, que se estende do resíduo 370 ao 573, corresponde a uma sequência de repetições ankyrin, cuja função permanece desconhecida (KARAMITROS; KONRAD, 2014). No entanto, em diversas outras proteínas, essas repetições foram associadas à mediação de interações proteína-proteína, desempenhando

papéis importantes em processos de sinalização celular (Figura 3). A hASNase1 é uma enzima relativamente pouco estudada, uma vez que sua estrutura tridimensional não foi resolvida experimentalmente e seus mecanismos de catálise e regulação alostérica permanecem pouco compreendidos. Sua denominação está relacionada ao fato de apresentar propriedades cinéticas semelhantes às da L- asparaginase tipo II de *Escherichia coli* (EcII), incluindo comportamento alostérico e parâmetros cinéticos caracterizados por valores baixos de  $K_{cat}$  e  $K_m$  na faixa milimolar. Além disso, ensaios indicaram que a hASNase1 possui regulação alostérica positiva, com coeficiente de Hill variando entre 2,5 e 3,9 (KARAMITROS; KONRAD, 2014).

Figura 3 - Representação esquemática da estrutura da 60-kDa-lisofosfolipase, mostrando o domínio N-terminal que possui atividade asparaginásica (hASNase1-resíduos 1-369) e domínio C-terminal composto de várias repetições de ankyrin (resíduos 370-573).



Fonte: Adaptado de LETUNIC; BORK, 2018; LETUNIC; DOERKS; BORK, 2015

<[https://smart.embl.de/smart/show\\_motifs.pl?ID=Q86U10](https://smart.embl.de/smart/show_motifs.pl?ID=Q86U10)>

Dados experimentais mostram que a hASNase1 possui alta afinidade pelo substrato L-asparagina (Asn), com  $K_m$  de  $2.960 \pm 131 \mu\text{M}$ , valor que, embora elevado, ainda reflete uma afinidade significativa (KARAMITROS; KONRAD, 2014). Para comparação, a L-asparaginase tipo II de *Escherichia coli* (EcII), amplamente utilizada em terapia clínica, apresenta um  $K_m$  de  $14,9 \pm 1,3 \mu\text{M}$ , evidenciando uma afinidade muito maior pela Asn (SCHALK et al., 2014). Embora ambas as enzimas possuam afinidade pelo substrato, o  $K_m$  da hASNase1 é aproximadamente duzentas vezes superior ao da EcII, o que compromete sua eficiência para hidrólise da Asn em concentrações fisiológicas, que no sangue humano são em torno de  $50 \mu\text{M}$  (SCHALK et al., 2014). Diante disso, o desenvolvimento de variantes da hASNase1 com  $K_m$  na faixa micromolar surge como uma estratégia promissora para obter uma L-asparaginase humana com aplicação clínica. Uma variante otimizada poderia oferecer atividade terapêutica eficiente sem os riscos de imunogenicidade associados às enzimas bacterianas atualmente utilizadas (NOMME et al., 2012).

Outra propriedade cinética fundamental da hASNase1 é o  $K_{cat}$ , que foi determinado em  $14,4 \pm 0,4 \text{ s}^{-1}$ , um valor significativamente inferior ao observado para a EcII ( $48,9 \pm 0,6 \text{ s}^{-1}$ ). Esse parâmetro representa o número máximo de mols de substrato que uma enzima é capaz de converter em produto por unidade de tempo, refletindo sua capacidade catalítica. Portanto, a hASNase1 converte menos substrato em produto por mol de enzima em comparação com a EcII. Além disso, a constante de especificidade ( $K_{cat}/K_m$ ), que indica a eficiência catalítica de uma enzima em baixas concentrações de substrato, é de  $0,005 \text{ s}^{-1} \mu\text{M}^{-1}$  para a hASNase1 e  $4,4 \text{ s}^{-1} \mu\text{M}^{-1}$  para a EcII. Esses valores demonstram que a hASNase1 possui menor especificidade e eficiência catalítica em comparação com a enzima bacteriana (SCHALK et al., 2014). Dessa forma, em sua forma nativa, a hASNase1 não é adequada como biofármaco substituto devido à sua baixa eficiência enzimática.

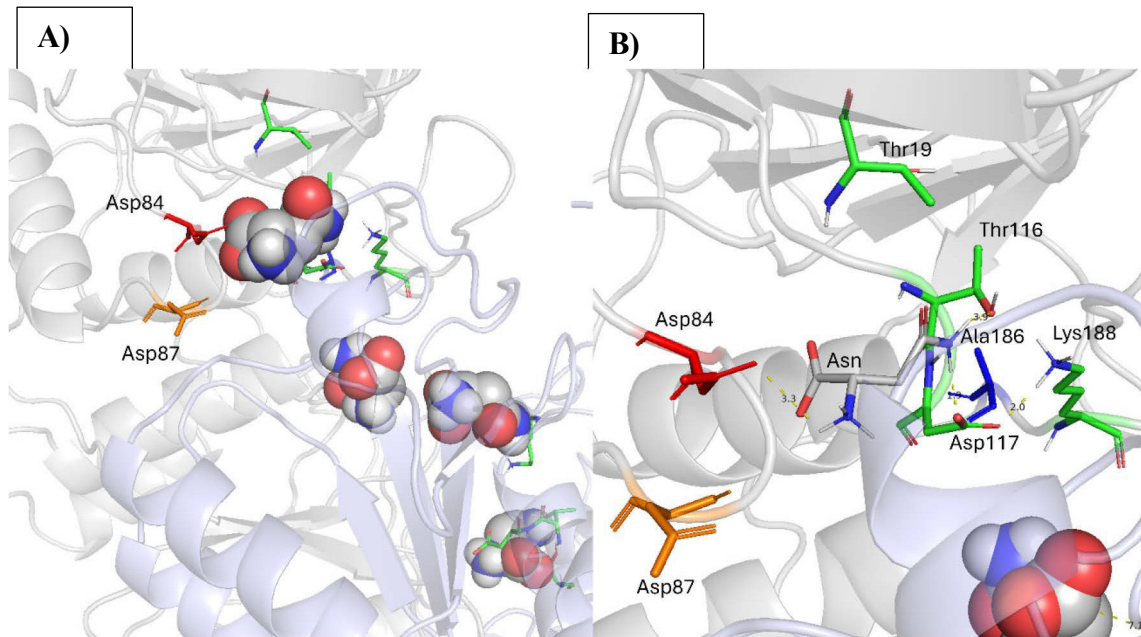
## 1.6 Mutações na hASNase1

Há trabalhos na literatura mostrando, tanto a importância de resíduos do sítio catalítico e alostérico, bem como trabalhos com variantes da hASNase1 para realçar a atividade catalítica (KARAMITROS; KONRAD, 2014; GUIMARÃES; FROTA; LOURENZONI, 2021; GUIMARÃES 2019, 2024; PINHEIRO, 2024). A hASNase1 possui um sítio catalítico composto pelos resíduos Thr19, Thr116, Asp117 e Lys188, que se alinham com alta precisão aos resíduos catalíticos da EcII (Thr14, Thr91, Asp92 e Lys163). Na EcII, os resíduos Thr14 e Thr91 são nucleofílicos essenciais para a ligação e catálise do substrato L-asparagina. Estudos de mutagênese na hASNase1 confirmaram a importância desses resíduos, pois as substituições T19A e T116A resultaram em perda completa da atividade enzimática, evidenciando seu papel catalítico. Além do sítio catalítico, a hASNase1 apresenta um sítio alostérico, onde os resíduos Glu266 e Ser327 interagem diretamente com o substrato L-asparagina. Esses resíduos são homólogos a Arg240 e Val302 na EcII (KARAMITROS; KONRAD, 2014) Todas as mutações realizadas por Karamitros e Konrad (2014) resultaram em perda de atividade da hASNase1, comprovando a importância dos resíduos estudados para a manutenção da atividade catalítica.

Embora a estrutura cristalográfica da hASNase1 ainda não tenha sido resolvida experimentalmente, estudos *in silico* indicam que ela compartilha mais de 73% de identidade de sequência com a gpASNase1, uma enzima de *Cavia porcellus* conhecida por sua alta eficiência catalítica. Esses estudos também identificaram que as regiões 1 e 2, e os resíduos

Asp84 e Asp87 (Figura 4), são críticos para o desempenho enzimático da hASNase1 (GUIMARÃES; FROTA; LOURENZONI, 2021).

Figura 4 - Representação em A) Resíduos 84 e 87 (em bastão vermelho e laranja, respectivamente) escolhidos para as mutações e em esferas as ASN dos sítios catalíticos e alostéricos. B) Resíduos do sítio catalítico em verde, e resíduo 186 escolhido para a mutação.



Fonte: Elaborado pela autora.

Em trabalhos anteriores do grupo GEPeSS (Grupo de Engenharia de Proteínas e Soluções para a Saúde), foram realizados estudos *in silico* para investigar os determinantes estruturais da hASNase1, comparando-os com as enzimas de *Escherichia coli* (EcII) e *Cavia porcellus* (gpASNase1). O objetivo foi identificar fatores estruturais que pudessem explicar as diferenças de atividade catalítica entre essas enzimas (GUIMARÃES, 2019; GUIMARÃES; FROTA; LOURENZONI, 2021).

Com base nos resultados obtidos por Guimarães (2019), foram propostas mutações na hASNase1, que foram posteriormente estudadas *in vitro*. Essas mutações foram inseridas no gene da hASNase1 por meio de técnicas de mutagênese sítio-dirigida, e as variantes resultantes foram expressos em sistema procariótico. A atividade enzimática foi avaliada utilizando o ensaio colorimétrico de Nessler, revelando variantes com atividades catalíticas superiores em comparação à enzima nativa (GUIMARÃES, 2024; PINHEIRO, 2024). Além disso, os estudos de Guimarães (2024) e Pinheiro (2024) incluíram análises *in silico* para compreender o impacto dessas mutações nos sítios ativos da enzima.

Resultados do trabalho de Pinheiro (2024), revelaram que todas as variantes testadas, com exceção da variante 8, apresentaram atividade catalítica superior à da hASNase1 nativa. Dentre eles, a variante 4 demonstrou a maior atividade, sendo 52 vezes mais ativo que a enzima nativa, mostrado no Quadro 1. Outras variantes também se destacaram, como a variante 3, com atividade 19 vezes superior, e a variante 1, com atividade 17 vezes maior (PINHEIRO, 2024).

No estudo de Guimarães (2024), outras mutações foram avaliadas e apresentaram resultados promissores. A variante 9 se destacou, exibindo uma atividade catalítica 50 vezes superior à da enzima nativa (Quadro 1). Na discussão desse trabalho, foi levantada a hipótese de que essa mutação poderia ter eliminado o caráter alostérico da enzima. Evidências *in silico* indicaram que as moléculas de asparagina presentes no sítio alostérico mostraram instabilidade, afetando também a estabilidade das asparaginas no sítio catalítico (GUIMARÃES, 2024).

Quadro 1: Concentração e atividade específica de cada variante avaliada no trabalho de Pinheiro (2024) e Guimarães (2024). Evidenciando as variantes 4 e 9 como as que resultaram em maior aumento de atividade catalítica comparado à enzima nativa.

Enzima	Mutação	Quantificação (µg/mL)	Concentração (µM)	Atividade Específica (U/mg)	Comparação com hASNase1
hASNase1	nativa	243,40	4,53	0,21 ± 0,01	Referência
Variante 1	D87S	465,94	8,67	3,67 ± 0,20	17 vezes
Variante 3	D84N	349,04	6,50	3,82 ± 0,18	19 vezes
Variante 4	D87N	321,87	5,99	10,87 ± 0,15	52 vezes
Variante 9	A186V	425,54	8,03	10,48 ± 0,02	50 vezes

Fonte: Adaptado de Pinheiro (2024) e Guimarães (2024). As proteínas foram quantificadas por fluorimetria utilizando o Qubit™ 4, com os resultados expressos em µg/mL e convertidos para concentração molar (µM). A atividade enzimática (U/mL) corresponde à quantidade de enzima capaz de liberar 1 µmol de amônia por minuto, a 37 °C. \*O valor de 3,5 µM foi utilizado como referência para a normalização da concentração total de proteína nas amostras submetidas ao ensaio de Nessler. A quantificação relativa da banda correspondente à hASNase1 e seus mutantes foi estimada em 0,55 µM. Os valores de atividade específica são apresentados como média ± desvio padrão (D.P.) de experimentos realizados em triplicata.

## 1.7 Dinâmica molecular

A dinâmica molecular (DM) é uma metodologia computacional fundamental na modelagem de sistemas biomoleculares, permitindo a simulação do movimento de átomos e moléculas ao longo do tempo com base nas leis clássicas da mecânica newtoniana (ALLEN; TILDESLEY, 1987; FRENKEL; SMIT, 2002). Por meio de funções de força que descrevem interações interatômicas (como ligações covalentes, forças de van der Waals e interações eletrostáticas), a DM permite explorar o comportamento conformacional de biomoléculas em resolução atômica (LEACH, 2001). Essa abordagem é especialmente valiosa em contextos nos quais técnicas experimentais, como cristalografia de raios X, RMN ou espalhamento de nêutrons, enfrentam limitações espaciais ou temporais (MCCAMMON; HARVEY, 1987). A simulação computacional de proteínas em solvente, por exemplo, permite compreender mecanismos dinâmicos associados à função biológica, como o reconhecimento molecular entre enzimas e seus substratos, variações conformacionais induzidas por ligação, e efeitos alostéricos (KARPLUS; MCCAMMON, 2002). Além disso, a DM possibilita a obtenção de dados quantitativos sobre estabilidade estrutural, e interação intermolecular, contribuindo para a validação e interpretação de resultados experimentais.

Em um estudo enzimático a DM se torna uma ferramenta interessante, para entender como ocorre a aproximação entre enzima e substrato e as mudanças conformacionais envolvidas nessa interação, pelos detalhes fornecidos sobre a estrutura tridimensional do complexo, equilibrado com o solvente, facilitando o entendimento da ligação entre ambos (KOLLMAN et al., 2000).

Os dados gerados na DM fazem parte de um conjunto de configurações (chamado ensemble), na qual as propriedades (pressão, volume, entropia, temperatura, energia interna, energia livre) desses arquivos podem ser determinadas de acordo com o objetivo do estudo, tudo isso tendo como base a mecânica estatística (BRAUN et al., 2019; VAN GUNSTEREN; DOLENC; MARK, 2008). Sendo assim, a DM permite, portanto, estudar a evolução temporal das configurações dos constituintes do sistema, e a partir das sequências das posições geradas, determinar as propriedades macroscópicas do sistema, conforme os princípios fundamentais de mecânica estatística. Nesse processo partículas que estavam inicialmente em uma posição movimentam-se sob influência de potenciais intermoleculares (VAN GUNSTEREN; DOLENC; MARK, 2008).

Na DM, as moléculas são modeladas através de funções matemáticas que descrevem uma coleção de átomos conectados por forças elásticas ou harmônicas. Tanto as

forças quanto os potenciais envolvidos, são expressos por equações matemáticas que incluem parâmetros específicos para simular deformações em ligações e ângulos entre átomos. Além disso, átomos que não estão diretamente conectados também interagem entre si, exigindo um potencial adequado para representar essas interações. Dessa forma, o conjunto de parâmetros que define as interações entre os átomos, sejam eles ligados ou não, é conhecido como campo de força. Como mostrado na Equação 5, por meio das equações de potencial, que empregam diversos parâmetros do campo de força, é possível calcular a energia potencial total,  $V$ , de um sistema. Esse cálculo é realizado a partir da estrutura tridimensional (3D) do sistema, utilizando as coordenadas cartesianas dos átomos (ALLEN; TILDESLEY, 2017; FRENKEL; SMIT, 2002).

A energia potencial total sobre um átomo (Equação 5) é a soma de vários componentes de potenciais nos quais o átomo está envolvido, incluindo tanto interações entre átomos ligados quanto não ligados. Para átomos não ligados, o potencial total resulta do somatório de outros potenciais, tais como: potencial entre átomos não ligados que incluem as interações eletrostáticas e de van der Waals (Equações 6 e 7). Já para átomos ligados, os potenciais são determinados por modelos que simulam comprimentos de ligações químicas, ângulos e diedros torcionais (FORSTER, 2002).

$$\begin{aligned}
 V = & \frac{1}{2} \sum_{\text{ligações}} K_b (b_{eq} - b)^2 + \frac{1}{2} \sum_{\text{ângulos}} K_\theta (\theta_{eq} - \theta)^2 + \\
 & \frac{1}{2} \sum_{\text{torções}} K_\phi [(1 + \cos(n\phi))] + \\
 & \sum_{\text{pares não-ligados } i-j} \left[ \frac{A}{r_{ij}^{12}} - \frac{B}{r_{ij}^6} + \frac{q_i q_j}{D r_{ij}} \right]
 \end{aligned} \tag{5}$$

Em um determinado momento ( $t$ ),  $b$  é o comprimento de ligação (instantâneo) que representa o desvio em relação ao comprimento de equilíbrio  $b_{eq}$  da ligação;  $\theta$  é o ângulo instantâneo entre duas ligações químicas consecutivas que descreve o desvio em relação ao ângulo de equilíbrio  $\theta_{eq}$  entre as duas ligações químicas;  $K_b$  é a constante de Hooke associada à deformação da ligação química específica, e  $K_\theta$  é a constante de Hooke para a restituição do ângulo de equilíbrio ( $\theta_{eq}$ ) entre as duas ligações químicas, visto que as distâncias de ligações e as amplitudes dos ângulos podem oscilar, considerando um modelo de oscilador harmônico, entre as posições de deformação máxima e a posição de equilíbrio;  $\phi$  representa o ângulo de torção, e  $n$  é a multiplicidade do ângulo quando este passa por  $360^\circ$ .  $A$  e  $B$  representam os parâmetros de van der Waals,  $q$  representa as cargas parciais;  $r_{ij}$  é a distância entre os átomos  $i$  e  $j$  (ALLEN; TILDESLEY, 2017; FRENKEL; SMIT, 2002).

O potencial de Lennard-Jones ( $V_{vdW}$ ), descrito na Equação 6, modela a interação de van der Waals, responsável por interações de curto alcance. Interações eletrostáticas, consideradas a longo alcance, são modeladas pelo potencial de Coulomb ( $V_{elet}$ ), descrito na Equação 7.

$$V_{vdW} = 4 \epsilon_{ij} \left[ \left( \frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}} \right)^{12} - \left( \frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}} \right)^6 \right] \quad (6)$$

$$V_{elet} = \frac{q_i q_j}{4\pi\epsilon_0\epsilon_r r_{ij}} \quad (7)$$

Na Equação 6,  $\sigma_{ij}$  é a distância finita entre os átomos  $i$  e  $j$ , distância em que o potencial entre átomos é zero, sendo que  $\epsilon_{ij}$  é a profundidade do potencial entre a barreira repulsiva e atrativa entre os átomos  $i$  e  $j$ . Esses são parâmetros ajustados por cálculos teóricos ou experimentalmente. Na Equação 7,  $V_{elet}$  é referente às interações eletrostáticas,  $r_{ij}$  corresponde à distância entre os átomos  $i$  e  $j$  com as cargas,  $q_i$  e  $q_j$  pontuais,  $\epsilon_r$  é a constante dielétrica relativa do meio e  $\epsilon_0$  a permissividade do espaço livre. A partir disso é possível se obter a força ( $\mathbf{F}_i$ ) exercida sobre cada átomo do sistema, por meio do cálculo da derivada primeira do potencial ( $V$ ) (Equação 5) em relação a posição ( $\mathbf{r}$ ) de cada átomo (Equação 8).

$$\mathbf{F}_i = - \frac{\partial V(\mathbf{r}_1, \mathbf{r}_2, \mathbf{r}_3, \dots, \mathbf{r}_N)}{\partial \mathbf{r}_i} \quad (8)$$

Conhecendo então a força ( $\mathbf{F}_i$ ) que atua sobre determinado átomo de massa conhecida ( $m_i$ ), se faz possível calcular a aceleração desse átomo ( $\mathbf{a}_i$ ) no sistema através da equação de movimento de Newton (Equação 9) (ABRAHAM *et al.*, 2015).

$$\mathbf{F}_i(t) = m_i \mathbf{a}_i = m_i \cdot \frac{d^2 \mathbf{r}_i}{dt^2} \quad (9)$$

Após obter-se a aceleração, pode-se conseguir a mudança da posição de cada átomo, usando algoritmos como o de Verlet (VERLET, 1967), que são utilizados para realizar a

integração das equações de movimento. Na Equação 10, as posições e acelerações dos átomos no tempo  $t$  são utilizadas para calcular  $\mathbf{r}(t - dt)$ , posição no tempo anterior, e  $(t + dt)$ , a nova posição, sendo  $dt$  o intervalo temporal para evoluir o sistema.

$$\mathbf{r}(t + dt) = 2\mathbf{r}(t) - \mathbf{r}(t - dt) + \mathbf{a}(t)dt^2 \quad (10)$$

Portanto, ao conhecer as posições iniciais de cada átomo que compõe o objeto de estudo da Dinâmica Molecular (DM), calcula-se as novas posições em intervalos de tempo ( $dt$ ) sucessivos. Esse processo continua até que se obtenha a trajetória dos átomos ao longo do período total estimado para a simulação. Após a conclusão da simulação de DM, as posições dos átomos são registradas em arquivos de trajetória, permitindo a posterior análise de aspectos estruturais e energéticos relevantes.

Para obter a trajetória completa de uma molécula em solução, é essencial seguir algumas etapas. Primeiramente, deve-se preparar o sistema, estabelecendo a configuração inicial na caixa de simulação. Em seguida, seleciona-se o campo de força ideal para o sistema em questão, utilizando os parâmetros mais adequados para calcular as forças atuantes sobre cada átomo. Posteriormente, realiza-se a minimização de energia com o objetivo de otimizar a geometria das proteínas e reduzir os conflitos estereoquímicos entre as moléculas.

A etapa seguinte envolve a termalização ou equilíbrio do sistema, buscando atingir um estado termodinâmico de interesse. Isso pode ser feito em um ensemble canônico (NVT), onde se controla o número de átomos, o volume e a temperatura, ou em um ensemble isotérmico-isobárico (NPT) (ALLEN; TILDESLEY, 2017), no qual se controla o número de átomos, a pressão e a temperatura (HUANG, 1987; BERENDSEN et al., 1995). Após essa fase, a trajetória completa do sistema é obtida por meio de simulação, que pode ser realizada tanto em ensemble NVT quanto NPT. Com a trajetória completa, é possível proceder às análises estruturais e energéticas do sistema.

## 1.8 Cálculos de energia livre de ligação

Os cálculos de energia livre buscam determinar as energias livres de sistemas moleculares com base nos fundamentos da termodinâmica estatística. Para isso, utilizam campos de força e algoritmos consolidados de mecânica molecular, que descrevem tanto a dinâmica quanto a energética do sistema. Dessa forma, esses cálculos incorporam, de maneira

automática, a flexibilidade tanto do ligante quanto do receptor (GAPSYS; DE GROOT, 2014; HANSEN; GUNSTEREN, 2014).

Duas premissas podem ser consideradas quando se utiliza esse método de estudo: (a) qual é o modo de ligação? (ou seja, onde o ligante se liga ao receptor?) e (b) qual é a força de ligação? (energia livre de ligação). Como exemplo pode ser citado a questão das enzimas, em que a inibição enzimática pode ocorrer por diferentes mecanismos. Em que um inibidor pode se ligar ao sítio ativo da enzima, caracterizando a inibição competitiva, ou a um sítio exo/alostérico, resultando em inibição não competitiva. Estudos cinéticos realizados para investigar a redução da atividade enzimática em função de um inibidor fornecem parâmetros como a constante de equilíbrio de inibição ( $K_i$ ) e a concentração inibitória meia-máxima ( $IC_{50}$ ). Esses dois parâmetros estão relacionados entre si no caso de inibição competitiva, sendo iguais em condições específicas (AKKUS et al., 2022). A constante de equilíbrio termodinâmico  $K_i$  e, portanto,  $IC_{50}$  podem ser aproximadas à energia livre de ligação experimental do sistema para os inibidores competitivos pela Equação 11:

$$\Delta\Delta G = - RT \ln (IC_{50 \text{ lig1}}/IC_{50 \text{ lig2}}) \quad (11)$$

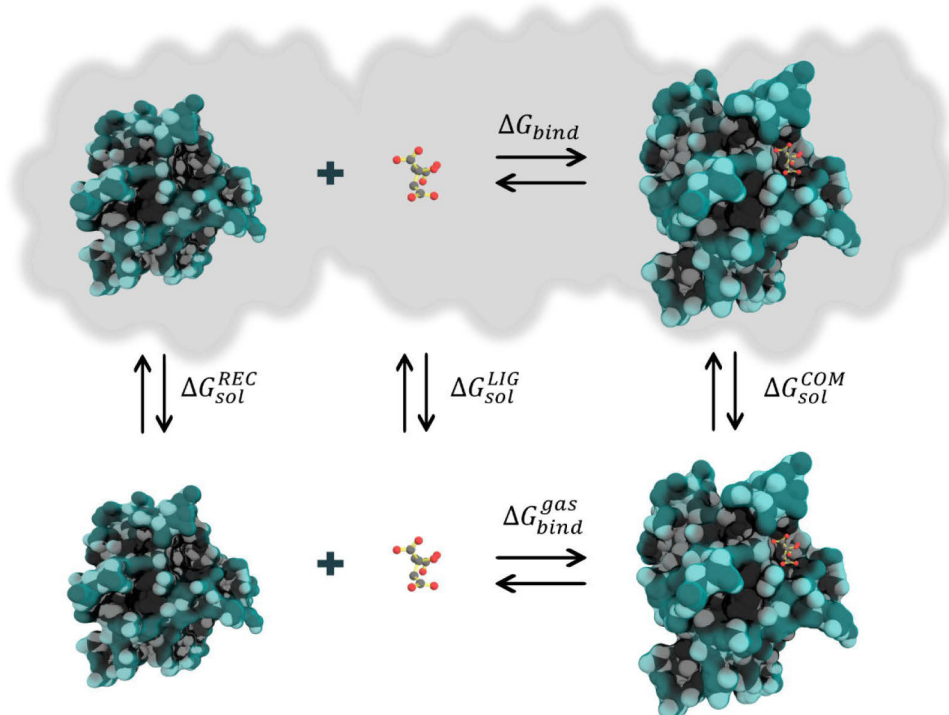
A diferença de energia livre de ligação relativa entre dois inibidores competitivos, representada por  $\Delta\Delta G$ , pode ser calculada a partir do potencial termodinâmico. Dessa forma, é possível comparar as energias livres de ligação determinadas experimentalmente, com base nos valores de  $IC_{50}$ , e as calculadas teoricamente a partir de potenciais termodinâmicos por meio de métodos computacionais para séries de inibidores competitivos. Em razão disso, diversos esforços têm sido direcionados ao desenvolvimento de estratégias que permitam prever, com maior precisão, as energias livres de ligação (AKKUS et al., 2022).

Um dos métodos mais precisos para estimar a energia livre, e afinidade de ligação, é a Mecânica Molecular de *Poisson-Boltzmann com Solvatação da Área de Superfície (MM/PBSA)*, o qual foi escolhido para esse estudo. Além disso o referido método já foi utilizado no estudo de enzimas, principalmente na busca de inibidores enzimáticos, contra doenças humanas (KARAMI; JALALI; MIRZAIE, 2017; SAHA, JHA, 2023; YOUSAF; NAVID; AZAM, 2022).

## 1.9 Mecânica Molecular de Poisson-Boltzmann com Solvatação da Área de Superfície (MM/PBSA)

O método de Mecânica Molecular de *Poisson-Boltzmann com Solvatação da Área de Superfície (MM/PBSA)*, calculam energias livres de ligação para macromoléculas combinando cálculos de mecânica molecular e modelos de solvatação contínua. Este método foi desenvolvido por Kollman e colaboradores no final dos anos 90 e tem desfrutado de grande popularidade desde então, pelo fato de ser um dos mais precisos do que a maioria das funções de pontuação de encaixe molecular e menos exigentes computacionalmente do que os métodos de energia livre alquímica. O MM/PBSA têm sido amplamente utilizado em estudos biomoleculares, como dobramento de proteínas, ligação proteína-ligante, interação proteína-proteína etc. (GENHEDEN; RYDE, 2015; WANG et al., 2019). Como a energia livre de ligação é uma grandeza de estado, sua variação pode ser descrita por meio de um ciclo termodinâmico, no qual  $\Delta G_{total}$  é igual a zero (Figura 5), (VALDÉS-TRESANCO et al., 2021).

Figura 5 - Ciclo termodinâmico para cálculos de energia livre de ligação. Exemplo esquemático de como ocorre o processo de ligação entre uma proteína (em azul e cinza) e um ligante (estrutura colorida em laranja, verde e amarelo) com base na variação da energia da energia livre de ligação.



Fonte: Adaptado de VALDÉS-TRESANCO et al. (2021). LIG: ligante; REC: receptor; e COM: complexo. Bind: Ligação; Gas: contribuição energética na fase gasosa (vácuo);  $\square G_{bind}$ : energia livre de ligação total;  $\square G_{bind}^{gas}$ : energia livre de ligação no vácuo;  $\square G^{REC}$ : energia livre de solvatação do receptor;  $\square G^{LIG}$ : energia livre de solvatação do ligante;  $\square G_{sol}^{COM}$ : energia de solvatação do complexo. Setas duplas: indicam a reação de ligação reversível entre a proteína e o ligante. Na parte superior, o sistema completo é ilustrado no contexto termodinâmico (representado pela nuvem cinza). Na parte inferior o sistema completo é ilustrado no contexto envolvendo a contribuição energética na fase gasosa.

O cálculo de energia livre pelo método MM/PBSA pode ser definido de acordo com a Equação 12:

$$\Delta G_{\text{Bind}} = G_{\text{COM}} - G_{\text{REC}} - G_{\text{LIG}} \quad (12)$$

Onde a contribuição energética do complexo (COM), receptor (REC) e ligante (LIG) é dada conforme Equação 13:

$$G = E_{\text{MM}} + G_{\text{sol}} - T \cdot \Delta S \quad (13)$$

Por sua vez,  $\Delta G_{\text{bind}}$  também pode ser representado conforme Equação 14:

$$\Delta G_{\text{bind}} = \Delta H - T \cdot \Delta S \quad (14)$$

O termo  $\Delta H$  representa a entalpia de ligação, enquanto  $-T\Delta S$  está relacionado à entropia conformacional gerada após a interação do ligante e o alvo. Ao desconsiderar o componente entrópico, obtém-se a energia livre efetiva, um parâmetro frequentemente adequado para comparar as energias livres de ligação relativas entre ligantes relacionados (VALDÉS-TRESANCO *et al.*, 2021). O  $\Delta H$  pode ser decomposto nos seguintes termos, conforme a Equação 15:

$$\Delta H = \Delta E_{\text{MM}} + \Delta G_{\text{sol}} \quad (15)$$

A componente  $\Delta E_{\text{MM}}$  representa a contribuição energética resultante da interação entre moléculas na fase gasosa, sendo calculada com base no campo de força empregado na simulação de DM (VALDÉS-TRESANCO *et al.*, 2021). Como também inclui as energias referentes aos comprimentos, ângulos e torções de ligações, assim como as interações eletrostáticas e de van der Waals, conforme a Equação 16:

$$\Delta E_{\text{MM}} = (\Delta E_{\text{ligação}} + \Delta E_{\text{ângulos}} + \Delta E_{\text{diedros}}) + (\Delta E_{\text{elet}} + \Delta E_{\text{vdW}}) \quad (16)$$

Já o termo  $\Delta G_{sol}$  se refere soma da energia de solvatação polar e solvatação apolar, conforme a Equação 17:

$$\Delta G_{sol} = \Delta G_{solpolar} + \Delta G_{solapolar} \quad (17)$$

Na equação, o componente polar está associado à transferência de uma partícula carregada entre dois meios com diferentes constantes dielétricas (como vácuo e solvente), sendo calculado por métodos como Poisson-Boltzmann (PB) ou Generalized Born (GB). Por outro lado, o componente apolar está relacionado à formação de uma cavidade no solvente para acomodar o soluto. Esse processo envolve uma combinação de energias desfavoráveis, decorrentes da ruptura das interações solvente-solvente, e energias favoráveis, resultantes das interações entre o soluto e o solvente.

Atualmente, diversos programas estão disponíveis para realizar cálculos de energia livre com base no método MM/PBSA, entre eles `g_mmpbsa`, `GMXPBSA2.1`, `MMPBSA.py` e `gmx_MMPBSA`. Neste trabalho, foi utilizado o `gmx_MMPBSA` (VALDÉS-TRESANCO et al., 2021).

## 2 JUSTIFICATIVA

O câncer é uma preocupação significativa de saúde pública em todo o mundo, sendo uma das principais causas de morte, segundo a OMS (2025). Entre os diferentes tipos de câncer, as leucemias se destacam por sua gravidade, especialmente a leucemia linfóide aguda (LLA), que afeta células sanguíneas e medula óssea. Embora essa neoplasia possa ocorrer em qualquer faixa etária, é particularmente prevalente na infância, representando cerca de 30-35% dos casos de câncer pediátrico.

Atualmente, o tratamento da LLA depende de protocolos quimioterápicos que incluem a L-asparaginase, uma enzima amplamente utilizada para privar as células leucêmicas do aminoácido L-asparagina, essencial para sua sobrevivência. No entanto, a L-asparaginase derivada de *Escherichia coli* tipo II (EcII), amplamente empregada na prática clínica, apresenta limitações significativas, incluindo alta imunogenicidade e reações adversas graves. Aproximadamente 60% dos pacientes tratados desenvolvem reações de hipersensibilidade, resultantes da rápida neutralização da enzima pelo sistema imunológico (AVRAMIS, 2012).

Além das questões relacionadas à segurança, o acesso à L-asparaginase enfrentou desafios no Brasil. O governo brasileiro enfrentou dificuldades para garantir o abastecimento contínuo desse medicamento essencial no Sistema Único de Saúde (SUS). O problema esteve relacionado à dificuldade das pequenas empresas em obter o registro junto à ANVISA, devido à complexidade do processo regulatório. As grandes farmacêuticas, por sua vez, desistiram da produção em razão do baixo valor agregado do fármaco, o que agravou ainda mais a escassez do produto no país. Em resposta a essa situação, o Ministério da Saúde lançou iniciativas para fomentar a pesquisa e o desenvolvimento local de novas L-asparaginase, além da produção do produto clássico de mercado, visando garantir o fornecimento contínuo e explorar o desenvolvimento de produtos inovadores e competitivos no mercado internacional.

Diante dos desafios associados à disponibilidade e aos efeitos adversos das L-asparaginases bacterianas, o desenvolvimento de variantes da L-asparaginase humana (hASNase1) tem sido considerado uma alternativa promissora para o cenário nacional. Embora não solucione todas as limitações clínicas existentes, uma enzima de origem humana poderia representar um novo produto local, com potencial para reduzir eventos adversos relacionados à imunogenicidade, frequentemente observados com as enzimas bacterianas. No entanto, a hASNase1 apresenta eficiência catalítica inferior em sua forma nativa, o que restringe sua aplicação clínica direta. Para contornar essa limitação, a engenharia de enzimas surge como uma estratégia relevante, voltada à modificação de propriedades como eficiência catalítica, especificidade de substrato e estabilidade, por meio de abordagens como design racional, evolução dirigida e design semirracional (DINMUKHAMED et al., 2021).

A bioinformática e a biologia computacional desempenham um papel fundamental nesse processo, permitindo a análise e a otimização de variantes enzimáticas com maior precisão. Técnicas de modelagem estrutural, simulações de dinâmica molecular e cálculos de energia livre têm sido amplamente aplicadas para investigar a hASNase1 e suas variantes, visando identificar mutações que possam aumentar sua eficiência catalítica e reduzir sua imunogenicidade (XIA, 2017; LUTZ; IAMURRI, 2018).

Diante desse cenário, este projeto tem como justificativa analisar, por meio de simulações de dinâmica molecular, os determinantes estruturais e energéticos de variantes da hASNase1 que apresentaram atividade catalítica superior, conforme proposto por Pinheiro (2024) e Guimarães (2024). Além disso, serão realizados cálculos de energia livre utilizando o método MM/PBSA, comparando as variantes com a L-asparaginase de *E. coli*. Esse estudo permitirá avaliar como as alterações nos sítios de interação com o substrato e na estabilidade

enzimática impactam o desempenho da enzima, fornecendo subsídios para o desenvolvimento de uma L-asparaginase humana com propriedades terapêuticas aprimoradas.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo geral

Desenvolver, por meio de simulações de dinâmica molecular e análises, um protocolo para avaliar os efeitos estruturais e energéticos de variantes de hASNase1, identificando características estruturais e energéticas que levam a aumentos de atividade.

#### 3.2 Objetivos específicos

- Simular, através de Dinâmica Molecular, as variantes mais promissoras, com relação à atividade enzimática, para comparar com hASNase1.
- Realizar análises estruturais para as variantes com base nas trajetórias provenientes das simulações de DM;
- Realizar análises estruturais e energéticas, por meio de cálculo de energia livre de ligação, para a hASNase1, as variantes e a *Ecll*.

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Obtenção das estruturas das variantes estudados e definição dos sistemas de estudo

Conforme descrito na seção 1.6 da introdução, as mutações analisadas neste estudo são provenientes dos trabalhos de Pinheiro (2024) e Guimarães (2024). Com base nos resultados experimentais de Pinheiro (2024), as variantes 1 e 3 foram selecionados para análises estruturais e energéticas. A variante 1 é caracterizado pela substituição do resíduo aspartato (D) por serina (S) na posição 87 (D87S) (Quadro 1). A variante 3 apresenta a substituição do resíduo aspartato (D) por asparagina (N) na posição 84 (D84N). Para isso, foi empregada a estrutura tridimensional da hASNase1 (Figura 6) previamente modelada por Guimarães et al. (2021), na qual os resíduos específicos foram modificados *in silico*, utilizando o software PyMOL 1.7.4.5 (DeLano Scientific), para gerar as variantes da hASNase1. Tendo em vista que simulações de

DM já foram realizadas para o sistema hASNase1 em meio aquoso iônico, conforme o trabalho de Guimarães et al. (2021), o sistema de simulação das variantes D87S e D84N utiliza as posições atômicas e as velocidades da configuração termalizada do sistema hASNase1. A única alteração no sistema das variantes D87S e D84N, em relação ao hASNase1, foi a modificação dos resíduos relacionados à mutação proposta, mantendo as posições atômicas tridimensionais do sistema original para preservar um número similar de moléculas de água entre os sistemas.

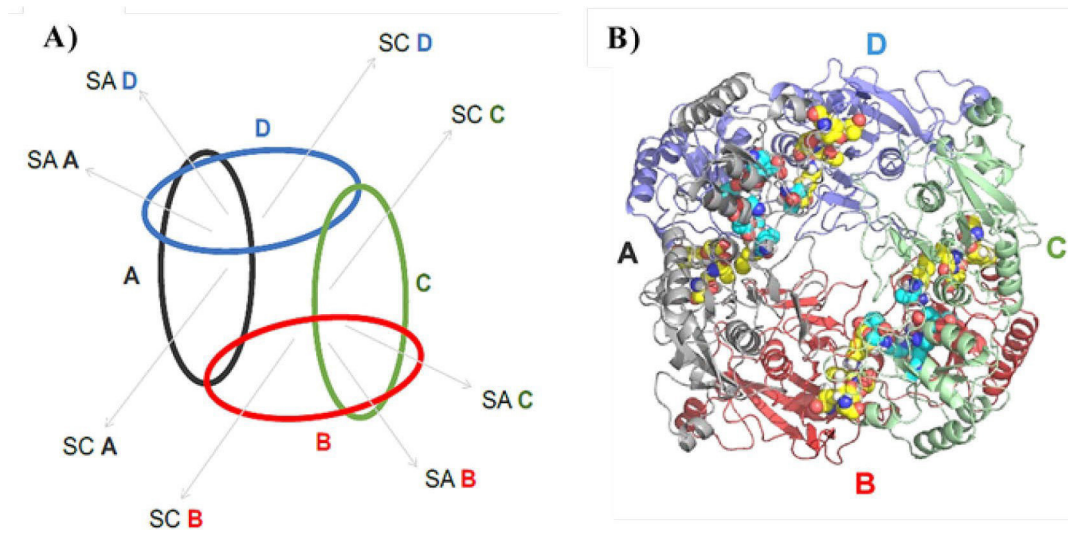
A variante 4, descrito por Pinheiro (2024), embora não seja novamente simulado neste estudo, será submetido a análises adicionais e comparações detalhadas com a EcII e a hASNase1. Essa variante é caracterizada pela substituição do resíduo aspartato (D) por asparagina (N) na posição 87 (D87N) (Quadro 1). O sistema previamente simulado será reanalisado de maneira mais aprofundada e robusta, visando explorar de forma abrangente seus determinantes estruturais e energéticos.

Para a variante 9, estudado por Guimarães (2024), a proteína com quatro moléculas de asparagina nos sítios catalíticos foi obtida a partir do sistema previamente montado por Guimarães, que originalmente continha oito moléculas de asparagina, distribuídas entre os quatro sítios catalíticos e os quatro sítios alostéricos. A variante 9 é caracterizado pela substituição do resíduo alanina por valina na posição 186 (A186V) (Quadro 1).

O sistema já simulado por Guimarães para a variante 9 (A186V), contendo oito asparaginas, será submetido a uma nova avaliação, com uma abordagem mais detalhada e criteriosa, visando investigar de forma abrangente seus aspectos estruturais e energéticos.

Portanto, três sistemas foram simulados (Quadro 2). Os sistemas contendo as variantes 1 e 3, que tiveram mutação inserida a partir do sistema hASNase1 nativa foram denominados de D87S e D84N, respectivamente. Esses sistemas contam com a presença de aminoácidos Asn nas posições dos sítios catalítico e alostérico, totalizando 8 resíduos de Asn. O terceiro sistema foi construído para a variante 9, A186V, com quatro asparaginas somente nos sítios catalíticos. Este foi denominado A186V-4ASN. Os sistemas hASNase1, D87N, A186V e EcII (previamente simulado por Guimarães (2019)) não foram simulados neste trabalho, mas serão reanalisados para comparação com as variantes aqui estudadas.

Figura 6 - Representação da estrutura tetramérica da hASNase1. A) Representação esquemática evidenciando a formação dos dímeros A-D e B-C. B) Representação evidenciando os sítios catalíticos (amarelo) e alostéricos (azul claro) em esferas.



Fonte: Guimarães (2021). Legenda - monômero A: preto; monômero B: vermelho; monômero C: verde; monômero D: azul; esferas com átomos de carbono em amarelo: sítios catalíticos em cada monômero; esferas com átomos de carbono em azul claro: sítios alostéricos em cada monômero; SC: sítio catalítico; SA: sítio alostérico. As cores atribuídas a cada monômero são as mesmas utilizadas nas curvas dos gráficos de RMSD e PII, mantendo a correspondência visual entre os monômeros e suas respectivas análises.

## 4.2 Simulação de dinâmica molecular e definições dos sistemas

Com o objetivo de compreender os aspectos estruturais e energéticos das variantes de hASNase1 aqui estudados, eles foram submetidos a simulações de dinâmica molecular, permitindo uma análise detalhada de suas propriedades e comportamento em solução. Para tanto, depois de realizados as mutações na estrutura tridimensional de hASNase1, e feito a preparação dos sistemas, seguiu-se para a minimização de energia dos sistemas com as variantes.

A preparação dos sistemas em solução aquosa e condições salinas de  $\text{Na}^+$  e  $\text{Cl}^-$ , em quantidade para manter o sistema neutro está descrito no (Quadro 2), juntamente com as variantes de hASNase1, D87S, D84N e A186V, que foram submetidas no programa H++ (pH 7,4) (ANANDAKRISHNAN; AGUILAR; ONUFRIEV, 2012; GORDON et al., 2005; MYERS et al., 2006) para verificar a protonação das histidinas. Os grupos N- e C- terminais de todas as variantes foram definidos como carregados ( $-\text{NH}_3^+$  e  $-\text{COO}^-$ ). Foi utilizado o pacote GROMACS versão 2018 para realizar a minimização, as simulações de DM e as análises subsequentes. As simulações seguiram protocolos, que incluíram etapas de minimização de energia, termalização e a fase de aquisição da trajetória da DM.

A minimização de energia foi conduzida utilizando o algoritmo *steepest descent* (ARFKEN; WEBER, 1985; MENZEL, 1960; MORSE; FESHACH, 1953), com o objetivo de aprimorar a geometria da proteína e diminuir a energia potencial total.

Posteriormente, foi realizada a termalização dos sistemas, que permite estabilizar a temperatura do sistema em um valor desejado, garantindo uma distribuição adequada de energia cinética entre os átomos. Esta etapa foi realizada empregando simulações curtas e sucessivas, em ensemble (conjunto) canônico (NVT), representado por número de partículas e volume fixos e temperatura controlada, e em ensemble isotérmico- isobárico (NPT), no qual o número de partículas é constante e a pressão e temperatura são controladas para convergir com os parâmetros de referência. O protocolo de termalização no ensemble NVT começa com três etapas onde as posições atômicas da proteína são mantidas "congeladas", exceto para os resíduos trocados, que permanecem livres, juntamente com um resíduo antes e um após os trocados, para evitar forçar a ligação peptídica. Depois disso, duas etapas no ensemble NPT são realizadas, agora com restrição de posições atômicas na proteína. Finalmente, uma etapa adicional em NPT é executada, mantendo a restrição de posição apenas nas asparaginas dos sítios catalíticos e alostéricos.

No primeiro ensemble NVT, foram realizados 5.000 passos, com cada passo tendo a duração de 0,0005 ps (dt). Nas duas etapas seguintes, também no ensemble NVT, foram executados 10.000 passos, com  $dt = 0,001$  ps na primeira etapa e  $dt = 0,002$  ps na segunda, assim como nas duas etapas subsequentes no ensemble NPT. Na terceira e última etapa, também no ensemble NPT, foram utilizados 10.000 passos com  $dt = 0,002$  ps. Posteriormente, foi realizada a etapa de aquisição da trajetória no ensemble NPT, que durou 300 ns para cada sistema. Os parâmetros usados nas etapas de termalização foram os mesmos empregados na fase de aquisição de trajetória, assim como os utilizados para o sistema da hASNase1 nativa simulado por Guimarães (2019).

O programa GROMACS foi utilizado com os seguintes parâmetros para termalização e aquisição de trajetória dos sistemas: temperatura controlada em 310K pelo algoritmo V-rescale (BUSSI, DONADIO, PARRINELLO, 2007) e pressão mantida em 1 atm usando o algoritmo de Berendsen (BERENDSEN et al., 1984). O controle de pressão foi realizado pelo método de Berendsen, com o integrador Leap-frog (HOCKNEY, GOEL, EASTWOOD, 1974) e um raio de corte de 1,3 nm. O campo de força utilizado foi o GROMOS54a7 (SCHMID et al., 2011). Para manter a geometria da proteína e das moléculas de água, foram aplicados os algoritmos de restrição LINCS (HESS, 2008; HESS et al., 1997) e SHAKE (VAN GUNSTEREN, BERENDSEN, 1977), respectivamente. Para manter o sistema

neutro e alcançar uma concentração iônica de 0,15 M, de íons Na<sup>+</sup> e íons Cl<sup>-</sup>. Condições periódicas de contorno foram aplicadas ao sistema. As correções para interações eletrostáticas foram calculadas utilizando o método PME (ESSMANN et al., 1995).

As moléculas de água utilizadas foram do tipo SPC (BERENDSEN et al., 1981). As trajetórias foram coletadas a cada 1000 passos. A caixa de simulação foi dodecaédrica, com uma distância de 1,8 nm entre as bordas da proteína e as arestas da caixa em todos os eixos, preenchida com água em modelo explícito. Os sistemas foram termalizados e, posteriormente, submetidos à simulação de DM para a aquisição de trajetória. Os dados obtidos foram plotados em gráficos, utilizando o programa OriginPro 9.0 (ORIGINLAB CORPORATION, 2007).

**Quadro 2:** Descrição dos sistemas variantes de hASNaseI submetidos à DM, com a quantidade de moléculas de água e íons em cada sistema, além da identificação dos sistemas previamente analisados, conforme a referência citada.

Sistema	Descrição	N <sub>águas</sub>	N <sub>íons</sub> (Na <sup>+</sup> /Cl <sup>-</sup> )
D84N	Variante de hASNaseI com 8 Asn, 1 em cada sítio catalítico e 1 em cada sítio alostérico, do tetrâmero.	50435	161/161
D87S	Variante de hASNaseI com 8 Asn, 1 em cada sítio catalítico e 1 em cada sítio alostérico, do tetrâmero.	50435	161/161
A186V-4ASN	Variante de hASNaseI com 4 Asn, 1 em cada sítio catalítico do tetrâmero.	50431	165/161
Sistemas previamente simulados		Referência	
<b>hASNaseI</b> (ASPG-ASN-CAT-ALO)	hASNaseI com 8 Asn, 1 em cada sítio catalítico e 1 em cada sítio alostérico, do tetrâmero.	(Guimarães, 2019, 2021)	
<b>D87N</b> (MUT4-ASN-CAT-ALO)	Variante de hASNaseI com 8 Asn, 1 em cada sítio catalítico e 1 em cada sítio alostérico, do tetrâmero.	(Pinheiro, 2024)	
<b>A186V</b> (Mut9-8asn)	Variante de hASNaseI com 8 Asn, 1 em cada sítio catalítico e 1 em cada sítio alostérico, do tetrâmero.	(Guimarães, 2024)	
<b>EcII</b> (ECOLI-ASN)	L-asparaginase de E. coli tipo II (PDB 3eca) com 4 Asn em cada sítio catalítico do tetrâmero	(Guimarães, 2019)	

Fonte: Elaborado pela autora. Estruturas simuladas na forma de tetrâmero. Cada sistema foi simulado por 300 ns.

### 4.3 Root Mean Square Deviation

Para analisar as mudanças estruturais nas variantes, foi utilizado o programa `gmx rms` do pacote GROMACS para determinar o Desvio Quadrático Médio Quadrático Médio (DQMD ou RMSD – Root Mean Square Deviation) (Equação 18), entre as estruturas de proteínas coletadas na trajetória ao longo do tempo, com uma referência, que normalmente é a inicial. No cálculo de RMSD para uma proteína, utilizam-se as posições dos átomos da proteína de referência em um tempo inicial  $t_1$ , por exemplo, os átomos de carbono mais internos na cadeia principal (átomos de carbono alfa -  $C\alpha$ ), como base para uma sobreposição maximizada das posições cartesianas correspondentes das estruturas coletadas ao longo da trajetória ( $N$ ) no tempo  $t_2$ . Assim, gera-se uma curva de RMSD versus tempo de simulação, permitindo a análise da variação estrutural em comparação com a estrutura inicial, original, do sistema, ao longo do tempo de dinâmica molecular (DM). Considera-se a massa ( $m$ ) do  $C\alpha$ , uma vez que os átomos da estrutura da proteína de referência são idênticos. O tempo inicial ( $t_1$ ) representa a estrutura de referência no tempo  $t$ , enquanto  $t_2$  corresponde às estruturas coletadas ao longo da DM para comparações, par a par de átomos. O tempo  $t_2$  varia ao longo do tempo total de DM.

$$\text{RMSD}(t_1, t_2) = \left[ \frac{1}{M} \sum_{i=1}^N m_i \| \mathbf{r}_i(t_1) - \mathbf{r}_i(t_2) \|^2 \right]^{\frac{1}{2}} \quad (18)$$

Onde  $m_i$  corresponde à massa do átomo  $i$ ,  $\mathbf{r}_i(t)$  é a posição do átomo  $i$  no tempo  $t$  de referência,  $t_1$ , e nos tempos posteriores,  $t_2$ .

As curvas de RMSD representam a variação estrutural da proteína em relação à referência ao longo de toda a simulação. O momento em que ocorre o equilíbrio estrutural é denominado  $t_{eq}$  (tempo de equilíbrio). Após esse ponto, as propriedades estruturais são calculadas, geralmente em forma de médias e desvios-padrão.

#### 4.4 Potencial de Interação Interatômico

O programa `gmx energy` do GROMACS foi utilizado para calcular o Potencial de Interação Interatômica (PII) entre os átomos do sistema ao longo da simulação, utilizando um raio de corte de 1,3 nm. Este potencial é calculado para pares específicos de átomos pertencentes a grupos distintos, e o valor total do PII é obtido pela soma dos potenciais de Lennard-Jones, que modela as interações de van der Waals, e do potencial de Coulomb, que descreve as interações eletrostáticas entre partículas carregadas, conforme as Equações 7 e 8. Os PIIs podem ser categorizados para representar potenciais intermoleculares, como, por exemplo, a interação proteína-água, proteína-proteína ou entre grupos de resíduos. Nessas categorias, os potenciais atômicos são agregados para resultar no potencial de interação entre os grupos de átomos correspondentes, como os grupos de átomos que formam os resíduos do sítio catalítico e os átomos do substrato.

#### 4.5 Cálculo de energia livre de ligação pelo `gmx_MMPBSA`

O método de cálculo de energia livre de ligação MM/PBSA, foi empregado para análise da hASNase1, das variantes D84N e D87S e da EcII de *E. coli*, com o objetivo de estimar a afinidade de ligação entre a enzima e seu respectivo ligante de cada sítio catalítico. Para essa análise, foi empregado o software `gmx_MMPBSA` (VALDÉS-TRESANCO et al., 2021), que pode ser instalado como um pacote integrado ao programa GROMACS 2018 (BERENDSEN et al., 1995). Assim, as trajetórias geradas durante as simulações de DM dos sistemas foram utilizadas como entrada para o `gmx_MMPBSA` (VALDÉS-TRESANCO et al., 2021).

O funcionamento do `gmx_MMPBSA` é organizado em três etapas principais. A primeira etapa, denominada preparação, consiste na geração das topologias e trajetórias necessárias para os cálculos, além de outros arquivos de entrada. Na segunda etapa, ocorre o cálculo propriamente dito, em que são estimadas as energias livres de ligação e, opcionalmente, as contribuições entrópicas, com base nos modelos previamente definidos. Por fim, na etapa de análise, os resultados são processados e organizados em um arquivo no formato CSV, permitindo sua visualização e interpretação. Esse arquivo pode ser facilmente importado e

plotado em gráficos por meio do software OriginPro 9.0. (ORIGINLAB CORPORATION, 2007).

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Análise de RMSD e comportamento estrutural das variantes de hASNase1 nos sistemas D84N, D87S e A186V-4ASN

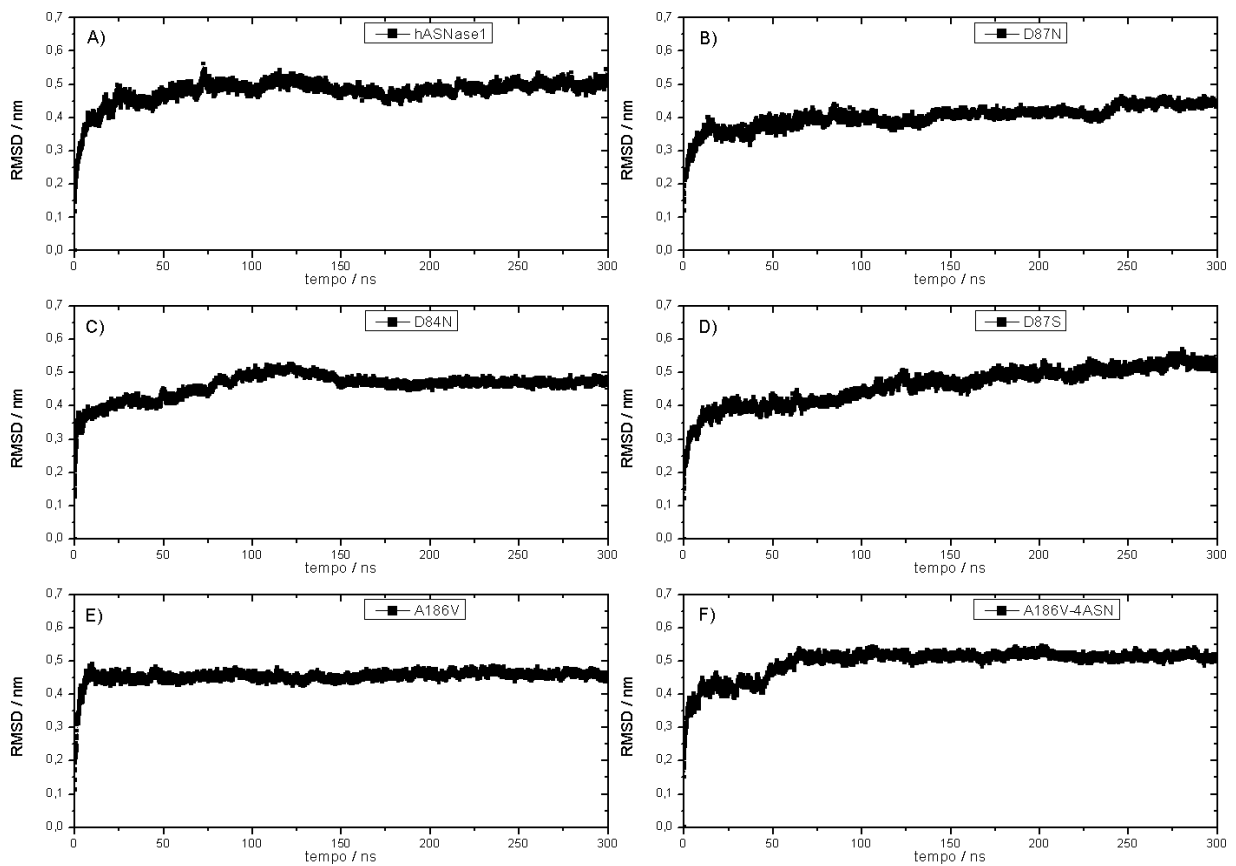
Em trabalhos anteriores realizados por membros do GEPeSS, foi possível elucidar através de estudos *in silico* de determinantes estruturais em nível atômico, da enzima hASNase1, bem como um melhor entendimento do mecanismo de catalise e identificação de resíduos chaves para alta atividade catalítica da mesma, que contribuíram para a proposição de mutações no trabalho de Pinheiro (2024) e Guimarães (2024). Porém algumas das novas mutações propostas não foram avaliadas *in silico*, sendo analisadas nesse trabalho, as características estruturais e energéticas desses novos sistemas variantes. Para avaliar o RMSD entre os átomos de carbono alfa ( $C\alpha$ ) da estrutura de referência, inicial, em relação as estruturas ao longo da DM das variantes D84N, D87S e A186V (no sistema A186V-4ASN), foram calculados os perfis de RMSD, como mostrado na Figura 7. As estruturas de referência utilizadas para comparação foi a inicial da DM da hASNase1 (Guimarães; Frota; Lourenzoni, 2021), A186V (Guimarães, 2024) e D87N (Pinheiro, 2024). Os perfis de RMSD revelaram que as estruturas das variantes atingem o equilíbrio por volta de 50 ns (tempo de equilíbrio,  $teq$ ) e permanecem estáveis até o final da simulação. Os valores médios de RMSD obtidos para cada sistema estão apresentados na Tabela 1.

Como ilustrado na Figura 7, as variantes D84N, D87S e A186V-4ASN apresentam um crescimento suave nas curvas de RMSD até aproximadamente 50 ns, ponto definido como o tempo de equilíbrio ( $teq$ ). A partir desse ponto, foram calculadas as médias de RMSD:  $0,46 \pm 0,03$  nm para D84N,  $0,46 \pm 0,05$  nm, para D87S e  $0,49 \pm 0,03$  nm para A186V-4ASN. Em uma análise comparativa, observa-se que a variante A186V-4ASN apresentou um RMSD médio maior em relação à hASNase1, sugerindo que a ausência das quatro moléculas de asparagina nos sítios alostéricos desfavoreceu a estabilidade da estrutura. Por outro lado, a variante A186V, com oito moléculas de asparagina (4 catalíticas e 4 alostéricas), mostrou um

RMSD médio inferior ao da hASNase1, indicando maior estabilidade estrutural. Para as variantes D84N e D87S, os valores médios de RMSD foram semelhantes aos da hASNase1, com variações apenas nos desvios padrão. Isso sugere que essas mutações não causam alterações significativas na estabilidade estrutural da enzima. No entanto, a variante D87N apresentou o menor RMSD médio ( $0,42 \pm 0,02$  nm), evidenciando um efeito positivo na estabilidade estrutural da hASNase1.

Os RMSD mostram que as variantes permanecem em sua forma tetramérica ao longo das simulações. Sendo uma característica de hASNase1 observada e descrita por outros trabalhos (AVRAMIS, 2012; MICHALSKA; JASKOLSKI, 2006; SCHALK et al., 2014; SWAIN et al., 1993).

Figura 7 - Curvas de RMSD entre as configurações estruturais das variantes de hASNase1 em água, ao longo do tempo de simulação, comparadas com a estrutura de referência inicial.



Fonte: Elaborado pela autora. Dados para hASNase1, A186V e D87N foram obtidos de Guimarães (2019, 2024) e Pinheiro (2024).

Tabela 1: Médias e desvios padrão de RMSD calculados para as estruturas das variantes de hASNase1, após atingir teq.

ESTRUTURA	RMSD (nm)
hASNase1	0,46 ± 0,01
D87N	0,42 ± 0,02
D84N	0,46 ± 0,03
D87S	0,46 ± 0,05
A186V	0,45 ± 0,01
A186V-4ASN	0,49 ± 0,03

Fonte: Elaborado pela autora. Dados para hASNase1, A186V e D87N foram obtidos de Guimarães (2019, 2024) e Pinheiro (2024).

## 5.2 Análise dos PII dos resíduos dos sítios catalíticos das variantes de hASNase1 com os respectivos substratos

A partir das simulações de dinâmica molecular (DM), foi avaliado o potencial de interação interatômico (PII) entre os resíduos do sítio catalítico e suas respectivas moléculas de asparagina (Asn) nas variantes D87S, D84N e A186V. Os quatro sítios catalíticos, dos monômeros (A, B, C e D) foram monitorados separadamente, e os resíduos constituintes do sítio catalítico incluem Thr19, Thr116, Asp117 e Lys188.

Para o cálculo do PII, foi aplicado um raio de corte de 1,3 nm em todos os sistemas, garantindo a inclusão dos quatro resíduos do sítio catalítico e da respectiva molécula de Asn. Os PII entre as curvas e entre todos os sistemas mostram energias variando entre  $-80 \text{ kcal mol}^{-1}$  e  $\sim 5 \text{ kcal mol}^{-1}$ . Enquanto a hASNase1 mostrou potenciais que aumentam rapidamente e vão a zero (Figura 8A), denotando saída da Asn do sítio, a variante D87N mostrou somente PII abaixo de zero para todos os sítios ao longo da DM (Figura 8B). A Figura 8C apresenta as curvas de PII para a variante D84N, o sítio A e B apresentam PII negativo que vai a zero ou próximo desse valor, causado pela má orientação da Asn no sítio ou deslocamento completo.

No caso da variante D87S (Figura 8D), a interação com a Asn no sítio mostrou ser nula a partir de 170 ns, implicando em dissociação do substrato do sítio.

Ao comparar os sistemas D84N e D87S com a enzima nativa hASNase1 (Figura 8A), foi possível observar que as variantes apresentaram maior tempo de permanência das Asn em seus respectivos sítios catalíticos. Em hASNase1, apenas o sítio B mostrou uma acomodação estável da Asn, até 250 ns o que é consistente com os dados relatados por Guimarães (2019). A variante D87N (Figura 8B), foi a única variante que manteve a atratividade entre Asn e o sítio, enquanto as variantes D84N e D87S exibiram uma menor estabilidade em suas interações com Asn, embora ainda tenham superado o desempenho da enzima nativa. Foi observado que os sítios A e B são menos estáveis em relação a atração pelo Asn que C e D.

No sistema D84N (Figura 8C), foi observado que a Asn associada ao sítio catalítico A se desloca para fora da região catalítica ao longo da simulação, confirmado pela visualização da trajetória da Asn (Figura 9). Esse comportamento parece estar relacionado à proximidade do resíduo Asp87 que mantém a interação com Asn vista par hASNase1. Em contraste, no sítio D, onde a Asn permaneceu no sítio, Asp87 estava mais afastada, sugerindo que a distância com Asn desempenha um papel crucial na estabilidade da interação Asn e o sítio catalítico (Figura 10).

O sistema D87S (Figura 8D) também exibiu um padrão de saída das Asn dos sítios catalíticos, especialmente nos sítios C e D. No sítio C, em particular, a saída da Asn parece estar diretamente associada à interação com o Ser87, como evidenciado na Figura 12B. Essa interação sugere que o Asp87 em hASNase1, mesmo após a mutação para serina, continua a exercer atratividade pela Asn. Já para o sítio A, durante todo o tempo de simulação a Asn desse sítio segue afastada, como indicado na Figura 11.

Uma questão central deste estudo foi investigar se as mutações nos resíduos 84 e 87 poderiam impactar a estabilidade das Asn nos sítios catalíticos. Estudos anteriores (Guimarães, 2021) demonstraram que esses resíduos competem diretamente com os resíduos catalíticos pela ligação com as Asn. Os resultados de PII para os resíduos 84 e 87 (Figuras 15 e 16) indicam que, de fato, ocorreram interações atrativas significativas entre esses resíduos e as Asn nos sítios catalíticos. No entanto, essas interações não foram suficientes para comprometer a ligação das Asn com os respectivos sítios catalíticos, como evidenciado pelos perfis de PII.

Para a variante A186V-4ASN (Figura 8E), o perfil de PII revelou curvas de PII distintos entre (A, D) e (C, B). As curvas mostram PII oscilando ao redor de  $\sim -40$  kcal mol<sup>-1</sup> para C e B enquanto as Asn abandonam o sítio catalítico com potenciais oscilando ao redor de zero. No

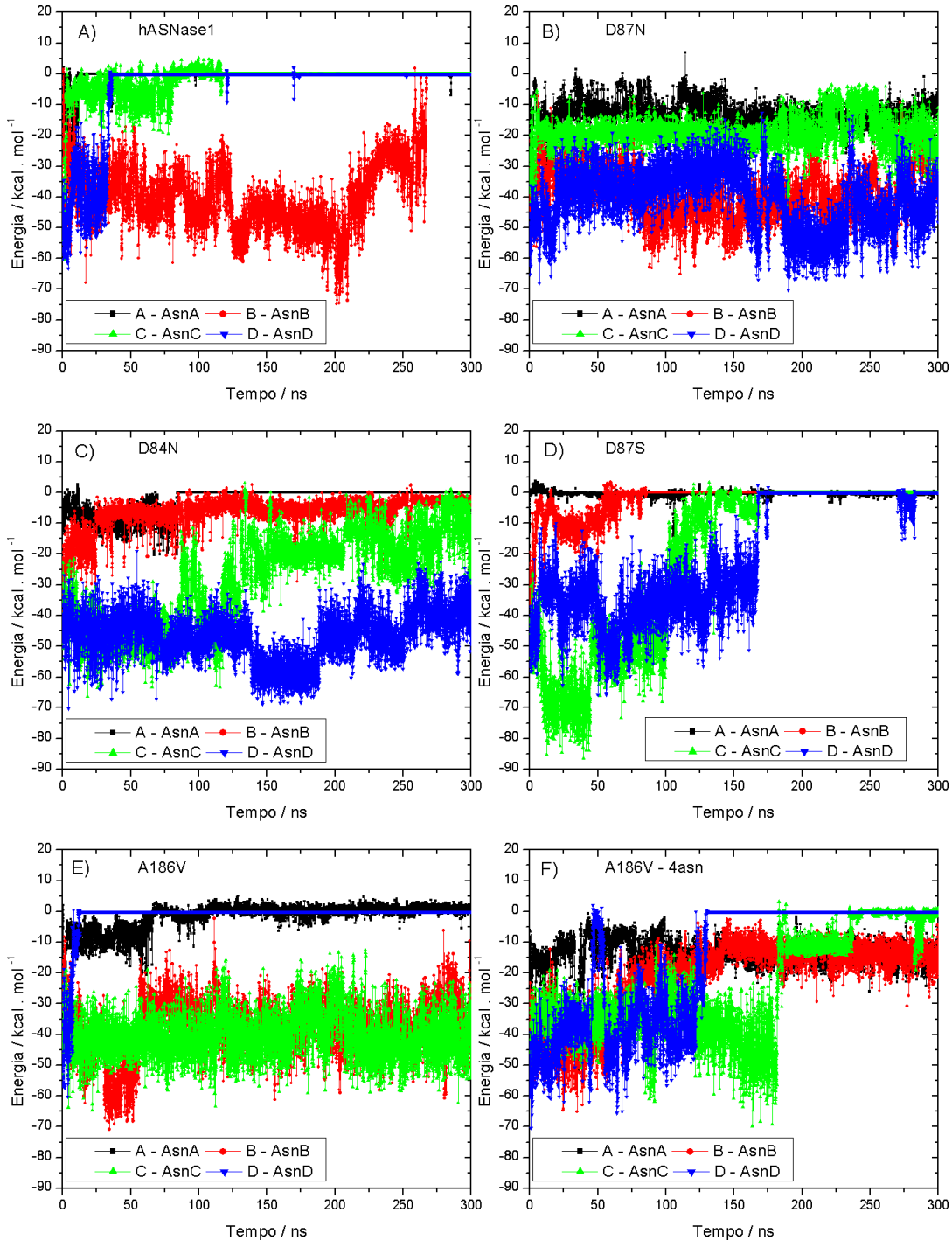
caso de A186-4ASN os sítios A e B, mantiveram PII próximo de zero e C e D foram a zero em ~200 ns. Esses resultados indicam que a ausência das quatro moléculas de Asn nos sítios alostéricos da variante A186V-4ASN compromete a estabilidade do sítio e interfere na interação atrativa com Asn. Em comparação com a A186V, as 4 moléculas de Asn no sítio alostérico (Figura 8E), mostrou que a presença dessas Asn favoreceu a acomodação do substrato nos sítios B e C, garantindo posição estável no sítio das Asn. Também revelou que os sítios de um dímero B e C podem estar ocupados enquanto o outro rapidamente dispensa a Asn.

No trabalho de Guimarães (2024), foi desenvolvido uma variante da hASNase1 com base em uma análise filogenética, resultando na substituição A186V, localizada próxima ao sítio alostérico da enzima. A expectativa inicial é que esse resíduo, presente em ancestrais da enzima, seja responsável por estabilizar o sítio alostérico e conferir alta atividade catalítica para a enzima. Os resultados experimentais confirmaram que essa mutação conferiu uma atividade específica 50 vezes maior para a variante em comparação com a enzima nativa (GUIMARÃES, 2024). As análises *in silico* para essa variante revelaram que, em alguns sítios alostéricos, as interações com as Asn alostéricas foram praticamente inexistentes, com algumas dessas moléculas sendo expulsas dos sítios. Esse achado diferiu do observado para hASNase1, onde as Asn alostéricas permanecem adequadamente acomodadas. Ao comparar os sítios alostéricos com os catalíticos, observou-se que, enquanto os resíduos de Asn nos sítios catalíticos permaneciam bem- posicionados e estáveis, os resíduos de Asn nos sítios alostéricos do mesmo monômero apresentavam deslocamento ou ausência completa. Esses achados sugerem uma possível perda do alosterismo da enzima, uma vez que, nessa variante, as Asn alostéricas já não se mantinham estáveis em seus respectivos sítios (GUIMARAES, 2024).

Diante dessa observação, foi levantada a hipótese de que a variante A186V poderia apresentar maior estabilidade na ausência das Asn alostéricas, o que justificou o estudo do sistema A186V- 4ASN, no qual as Asn alostéricas foram removidas. Os resultados das simulações não foram favoráveis à essa hipótese. As análises do potencial de interação revelaram que a remoção das Asn alostéricas impactou negativamente as interações nos sítios catalíticos, especialmente nos sítios B e C, os mesmos que, na variante A186V original, apresentavam os maiores potenciais de interação. A ausência das Asn alostéricas parece ter comprometido a capacidade da enzima de manter as Asn catalíticas adequadamente posicionadas, resultando em uma perda de estabilidade e eficiência de ligação. Esses achados demonstram que a remoção das Asn alostéricas não conferiu a estabilidade esperada ao sistema, mas, pelo contrário, prejudicou sua funcionalidade. Isso destaca a importância da comunicação

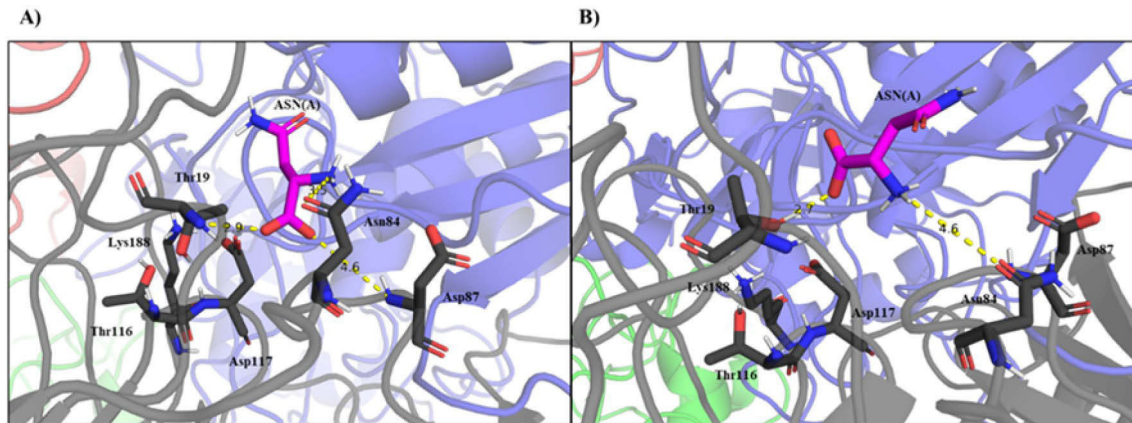
entre os sítios alostéricos e catalíticos na hASNase1 e reforça a complexidade de seu mecanismo alostérico.

Figura 8 - Curvas de PII entre os resíduos dos sítios catalíticos nos monômeros (A, B, C, D) e a Asn residente nesses sítios em cada estrutura simulada. A) hASNase1, B) D87N, C) D84N, D) D87S, E) A186V e F) 186V-4ASN.



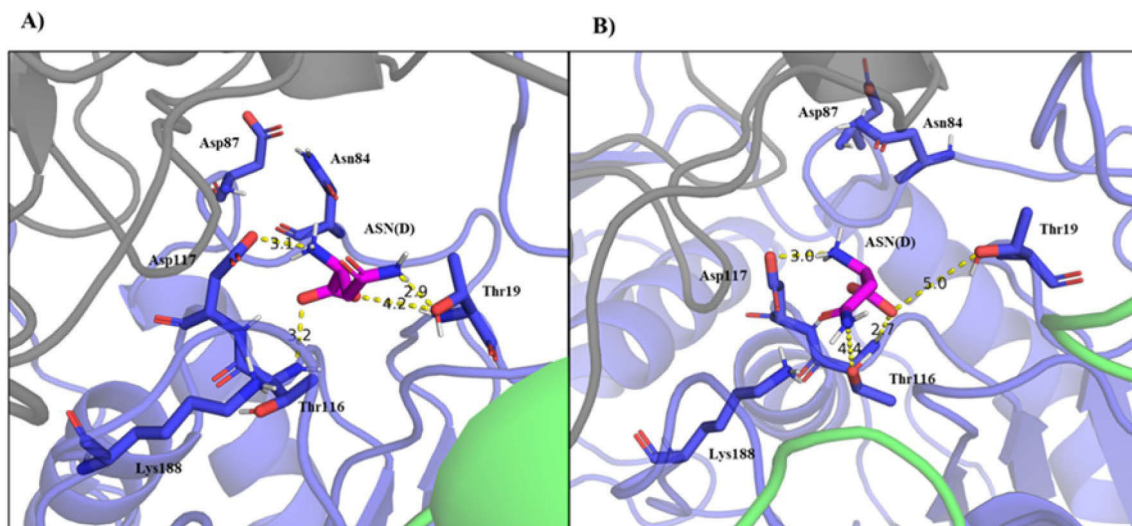
Fonte: Elaborado pela autora. Dados para hASNase1, A186V e D87N foram obtidos de Guimarães (2019, 2024) e Pinheiro (2024).

Figura 9 - Sistema D84N, representação em bastão do sítio catalítico do monômero A e resíduos 84 e 87 (em preto), na estrutura secundária representada em fita, nos tempos A) 47 ns, B) 84 ns de DM.



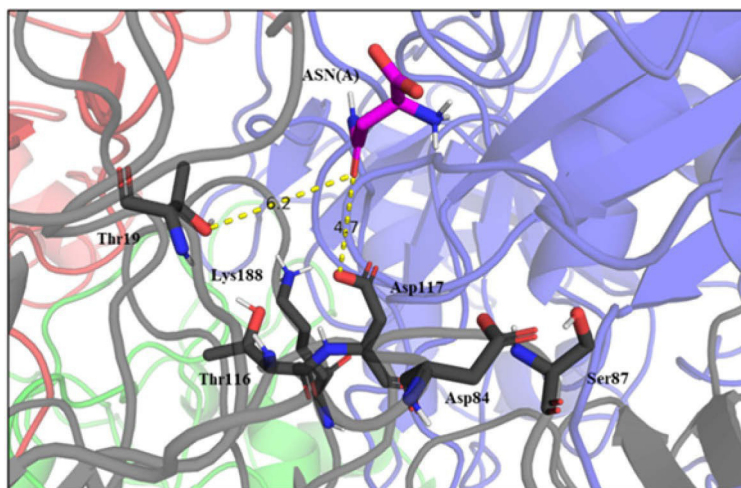
Fonte: Elaborado pela autora.

Figura 10 - Sistema D84N, representação em bastão do sítio catalítico do monômero D e dos resíduos 84 e 87 (em azul), na estrutura secundária representada em fita, nos tempos A) 55 ns, B) 188 ns de DM.



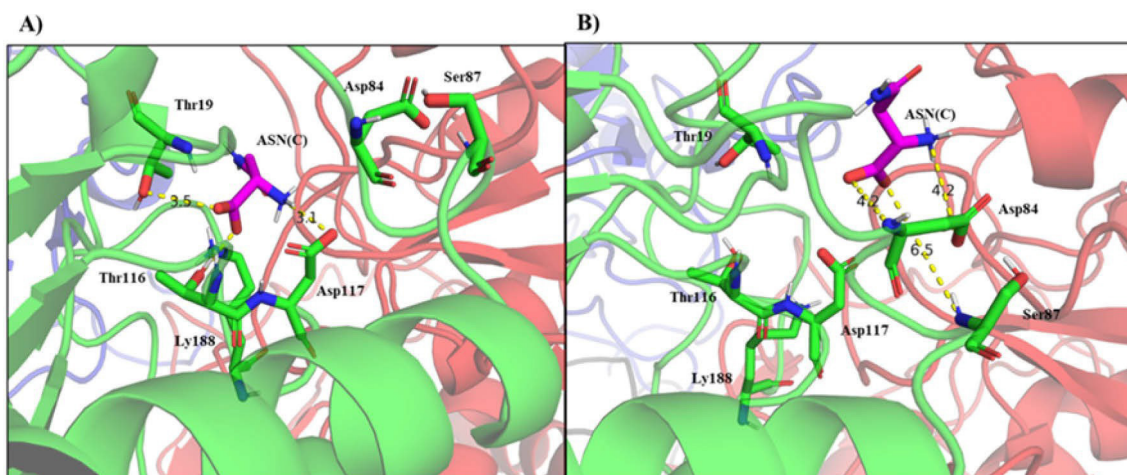
Fonte: Elaborado pela autora.

Figura 11 - Sistema D87S, representação em bastão do sítio catalítico do monômero A e resíduos 84 e 87 (em preto), na estrutura secundária representada em fita, no tempo 105 ns.



Fonte: Elaborado pela autora.

Figura 12 - Sistema D87S, representação em bastão do sítio catalítico do monômero C e resíduos 84 e 87 (em verde), na estrutura secundária representada em fita, no tempo A) 44 ns e B) 142 ns.



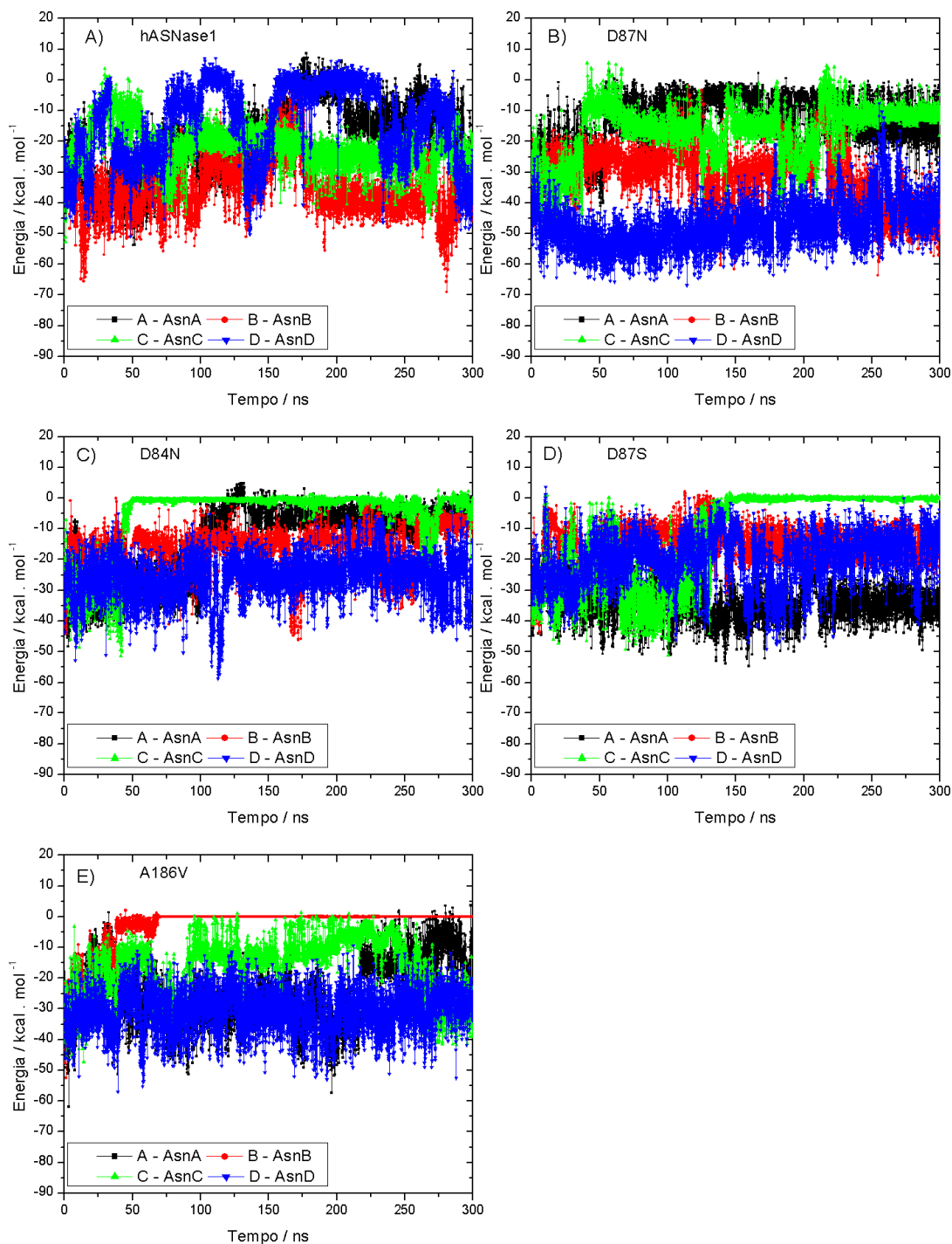
Fonte: Elaborado pela autora.

### 5.3 Análise de PII dos resíduos dos sítios alostéricos das variantes de hASNase1 com os respectivos substratos

A análise do potencial de interação interatômico (PII) para os sítios alostéricos das variantes D84N, D87S e D87N são apresentadas na Figura 13. As curvas mostram atratividade entre os resíduos do sítio alostérico e as Asn, com exceção de D87N, a hASNase1 e outras variantes mostram que Asn, em alguns sítios, alcançam zero ou variam muito próximo. Entre as variantes com interação atrativa, PII varia  $-30-35 \text{ kcal mol}^{-1}$ , enquanto para D87N as energias são ligeiramente mais baixas. Comparando as curvas de PII entre Asn do sítio catalítico (Figura 8) e do Asn com sítio alostérico (Figura 13), sugere uma correlação entre os momentos que a Asn no sítio alostérico apresenta PII próximo ou zero, ou seja, em posição desfavorável a estabilização local e, por consequência, alteração na posição de Lys188 à subsequentemente saída do sítio catalítico da Asn com  $\text{PII} \geq 0$ . Curiosamente, a variante A186V revela que a Asn no sítio alostérico tem uma tendência de se afastar e sair do sítio, com mostra as curvas para os monômeros B e C. Esses monômeros mostraram os PII entre resíduos do sítio catalítico e Asn mais estáveis entre as variantes, sugerindo que o distanciamento das Asn nos sítios alostérico beneficiam a estabilidade de Asn no sítio catalítico.

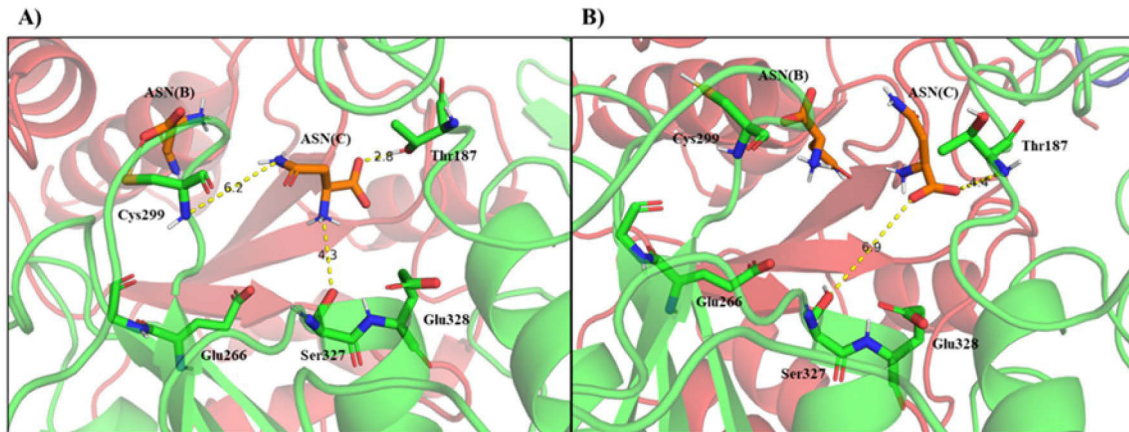
Um exemplo de correlação sugerida pode ser observado no sistema D87S, identificada entre a instabilidade da posição da Asn do sítio catalítico C e o sítio alostérico C. A saída da Asn do sítio catalítico C, após aproximadamente 150 ns (Figura 14B) mostra diferença na posição da Asn (Figura 14 A) em 65 ns, coincidiu com a saída da Asn do sítio alostérico C (Figura 8B).

Figura 13 - Curvas de PII entre os resíduos dos sítios alostéricos nos monômeros (A, B, C, D) e a Asn residente nesses sítios em cada estrutura simulada. A) hASNase1, B) D87N, C) D84N, D) D87S, E) A186V.



Fonte: Elaborado pela autora. Dados para hASNase1, A186V e D87N foram obtidos de Guimarães (2019, 2024) e Pinheiro (2024).

Figura 14 - Sistema D87S, representação em bastão do sítio alostérico do monômero C (em verde) e respectivos substratos (em laranja), na estrutura secundária representada em fita, no tempo A) 65 ns e B) 142 ns.



Fonte: Elaborado pela autora.

#### 5.4 Análise de PII do resíduo 84 com as Asn nos sítios catalíticos, nas variantes D84N, D87S, A186V e A186V-4ASN

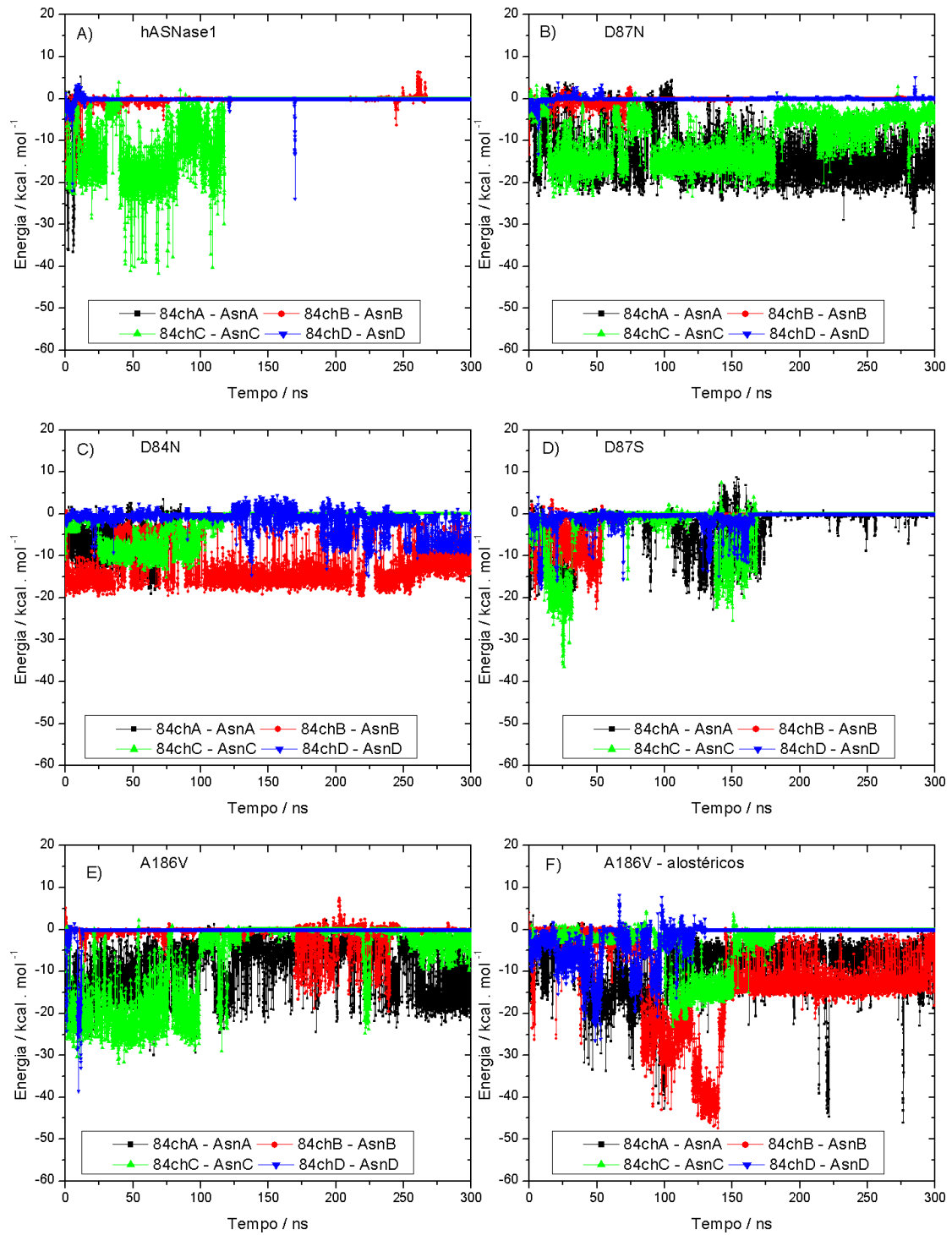
As curvas de PII para a variante D84N (Figura 15) revelam interações atrativas entre o resíduo na posição 84 das cadeias A, B, C e D e as respectivas moléculas de Asn nos sítios catalíticos. A mutação D87N revela duas regiões energéticas bem definidas para os monômeros A e C em interação da Asp87 com a Asn. Da mesma forma, essas diferenças energéticas são observadas para as outras variantes, com menor definição e variando o PII para valores mais ou menos atrativos.

No caso da Asn84 (um resíduo polar mas não carregado como a Asp) em interação com a Asn, na cadeia A, a interação é de curta duração, com um mínimo em aproximadamente  $-20 \text{ kcal mol}^{-1}$  até  $\sim 95 \text{ ns}$ , seguido a zero, causado pela saída da Asn do sítio, confirmado pela inspeção visual na Figura 9. Na cadeia B, a interação permanece atrativa e estável ao longo de toda a simulação (300 ns), com valores médios em torno de  $-19 \text{ kcal mol}^{-1}$  e baixas flutuações, refletindo uma ligação mais atrativa. Na cadeia C, a interação atrativa é mantida até  $\sim 120 \text{ ns}$ , com mínimos de até  $-15 \text{ kcal mol}^{-1}$ , mas desaparece após esse período. Já na cadeia D, as os PII oscilam entre valores positivos e negativos, denotando interação fraca com a Asn. A Figura 8 mostrou que essa Asn está bem posicionada no sítio catalítico, revelando que essa condição não favorece a interação com a Asn84.

Na variante D87S (Figura 15D), as interações atrativas entre o resíduo 84 e as Asn foram mais fracas e menos consistentes. Ao comparar as variantes D84N e D87S com a hASNase1 (Figura 15A), observa-se que a Asn84 apresenta maior duração na interação atrativa com a Asn devido está mais próxima, enquanto na hASNase1 essas interações atrativas ocorrem mais no início com a Asn dissociando do sítio. Curiosamente, esperava-se que a mutação D84N reduzisse a interação com a Asn no sítio catalítico, facilitando a entrada e manutenção da Asn no sítio. No entanto, isso não comprometeu a função catalítica para o monômero D, uma vez que o PII do sítio catalítico apresentou curvas com baixo PII, indicando um efeito positivo da mutação. Resultados semelhantes foram observados para a variante D87N (Figura 15B) monômeros B e D, no qual o resíduo 84 contribui para a retenção da Asn próximo ao sítio catalítico, em interação com a Asp84.

As análises de PII do resíduo 84 foram estendidas as variantes A186V e A186V-4ASN. No A186V (Figura 15E), o resíduo 84 das cadeias A, B e C interage com suas respectivas Asn, enquanto na cadeia D a interação é ausente. No A186V-4ASN (Figura 15F), o resíduo 84 interage com as Asn, especialmente nas cadeias A e B, que apresentaram interações atrativas mais intensas. É importante destacar que, nas variantes A186V e A186V-4ASN, as mutações são próximas ao sítio alostérico.

Figura 15 - Curvas de PII entre os resíduos 84 nos monômeros (A, B, C, D) e as respectivas Asn dos sítios catalíticos. A) hASNase1, B) D87N, C) D84N, D) D87S, E) A186V e F) 186V-4ASN.



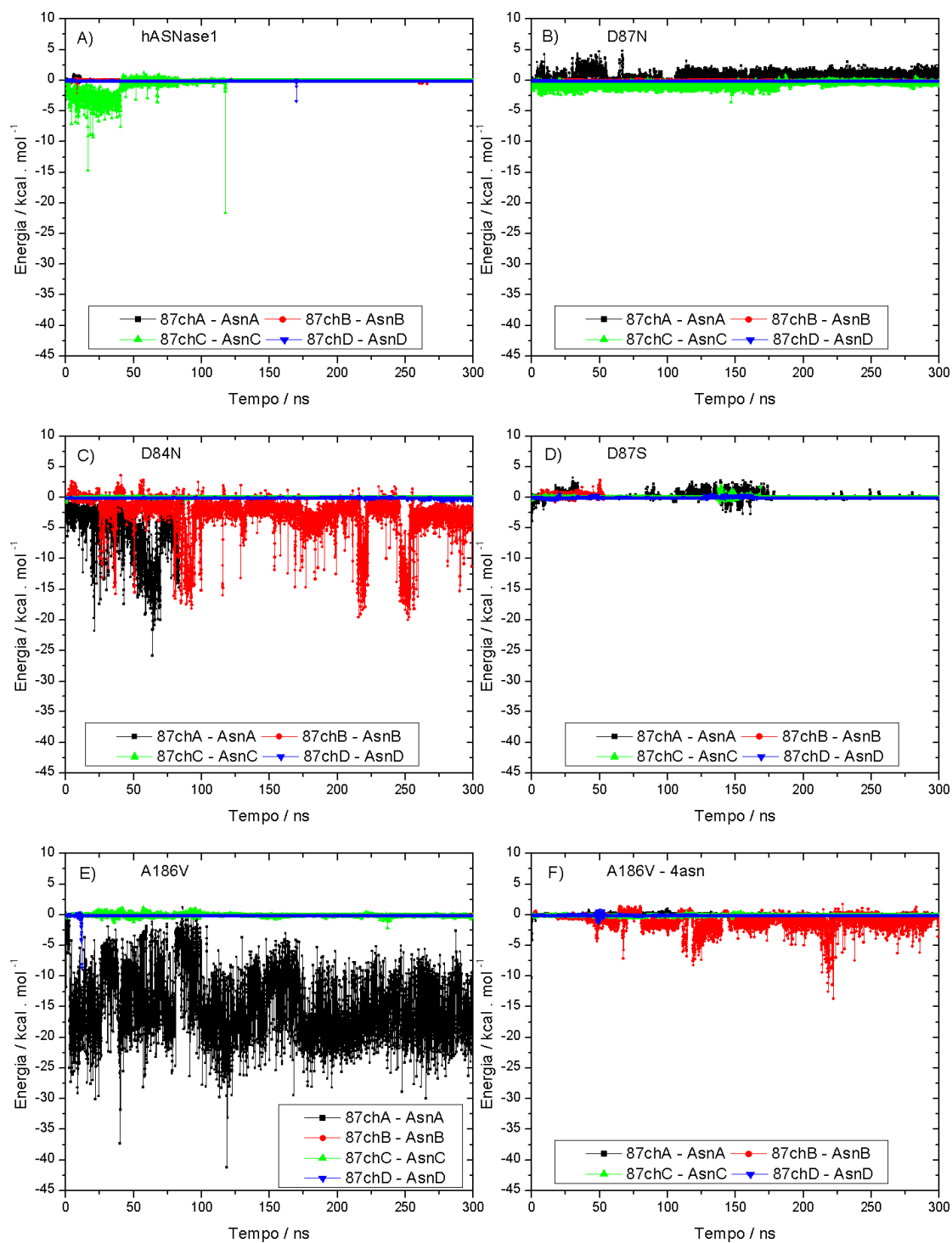
Fonte: Elaborado pela autora. Dados para hASNase1, A186V e D87N foram obtidos de Guimarães (2019, 2024) e Pinheiro (2024).

### 5.5 Análise de PII do resíduo 87 com as Asparaginas, nas variantes D84N, D87S, A186V e A186V-4ASN

A variante D87N (Figura 16B) assim como D87S mostra que não há interação da Asn com os resíduos Asn87 e Ser87 nessas variantes, ou seja, se a Asn sair do sítio não está fazendo interação com esses resíduos. Essa observação é ratificada pelas curvas de PII entre Asn e sítio catalítico (Figura 8) as mutações nessa posição ajudam a estabilizar Asn nos sítios catalíticos, pois permaneceram inseridas por mais tempo, diferente do observado em D84N, onde a Asn para monômeros A e B interagem com a Asp87.

Na variante A186V (Figura 16E), apenas o Asp87 da cadeia A estabeleceu uma interação atrativa significativa com a Asn, com amplitudes de até  $\sim -43$  kcal mol<sup>-1</sup>. Nesse caso a Asn saiu do sítio e permaneceu ligada a Asp87. Nas outras três cadeias, o resíduo 87 não apresentou interação com o substrato. Vale destacar que essa interação na cadeia A parece ter afetado a ligação da Asn ao sítio catalítico, pois o PII catalítico indicou uma redução na interação do substrato com o sítio. Por fim, na variante A186V-4ASN (Figura 16F), apenas o resíduo 87 da cadeia B mostrou interação com a Asn, com amplitudes na curva atingindo  $\sim -14$  kcal mol<sup>-1</sup>. As demais cadeias não apresentaram interações significativas.

Figura 16 - Curvas de PII entre os resíduos 87 nos monômeros (A, B, C, D) e as respectivas Asn dos sítios catalíticos. A) hASNase1, B) D87N, C) D84N, D) D87S, E) A186V e F) 186V-4ASN.



Fonte: Elaborado pela autora. Dados para hASNase1, A186V e D87N foram obtidos de Guimarães (2019, 2024) e Pinheiro (2024).

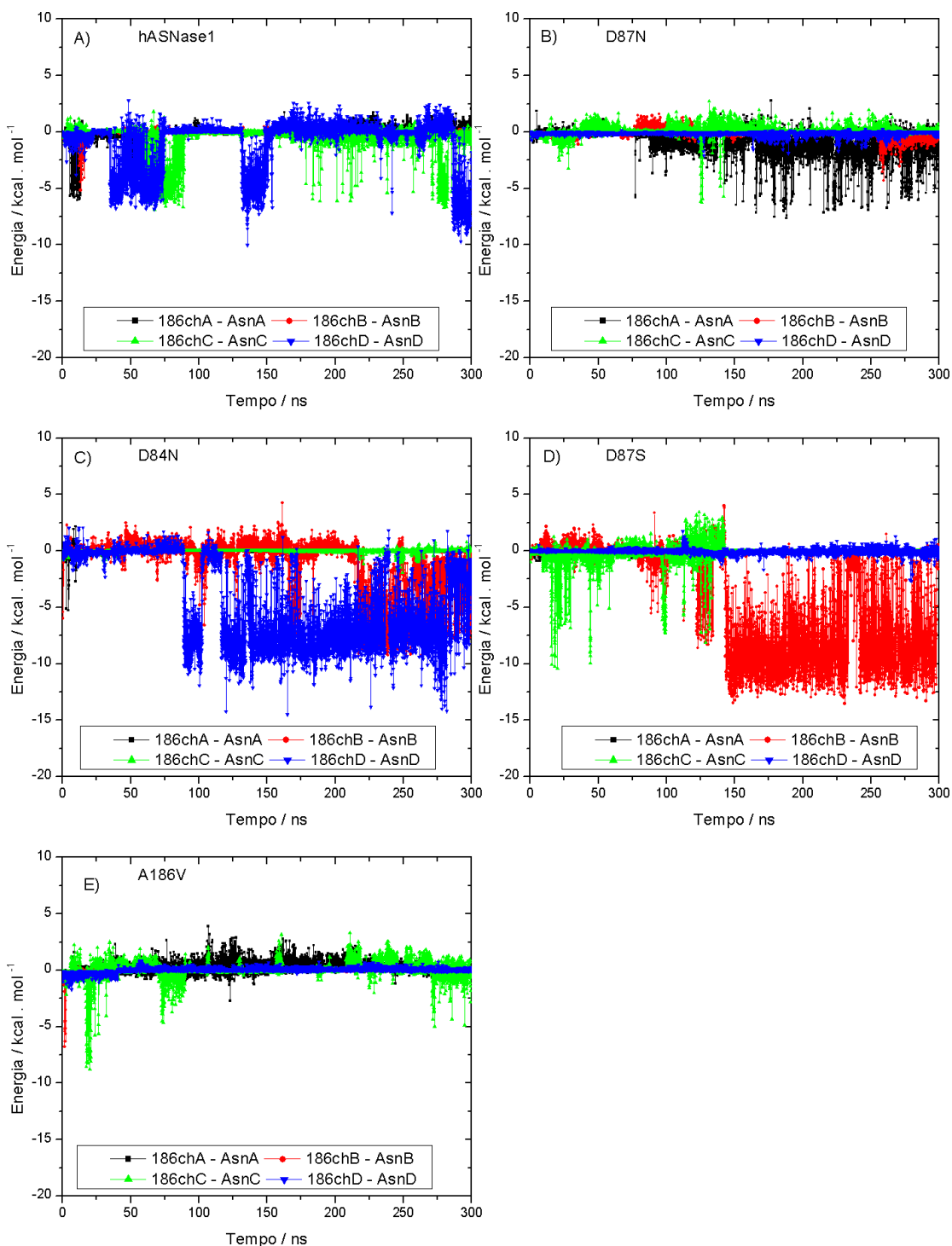
## 5.6 Análise de PII do resíduo 186 com as asparaginas alostéricas, nas variantes D87N, D84N, D87S, A186V e hASNase1

Na hASNase1 (Figura 17A), as interações atrativas entre o resíduo 186 e as Asn alostéricas são fracas. Apenas nas cadeias C e D são observados breves mínimos que representam interação atrativa, aproximadamente  $-10 \text{ kcal mol}^{-1}$ .

Na variante D87N (Figura 17B), foram identificadas interações breves entre o resíduo 186 da cadeia A e a Asn alostérica, com amplitudes de  $\sim -7 \text{ kcal mol}^{-1}$ . Já nas cadeias B e C, as interações foram predominantemente repulsivas, com amplitudes de  $\sim 3 \text{ kcal mol}^{-1}$ . Para a variante D84N (Figura 17C), as interações do resíduo 186 com as Asn alostéricas foram nulas nas cadeias A e C, com as curvas mantendo-se próximas de zero. Na cadeia B, observaram-se flutuações que alternaram entre interações atrativas ( $\sim -10 \text{ kcal mol}^{-1}$ ) e repulsivas ( $\sim 3 \text{ kcal mol}^{-1}$ ). Na cadeia D, até aproximadamente 80 ns, não houve interação, mas a partir de  $\sim 110 \text{ ns}$ , o resíduo 186 estabeleceu uma interação atrativa com a Asn, com mínimos de até  $-15 \text{ kcal mol}^{-1}$ . Na variante D87S (Figura 17D), o resíduo 186 das cadeias A e D não apresentou interação significativa com as Asn alostéricas, mantendo perfis de interação próximos de zero. Na cadeia C, houve uma breve interação atrativa até  $\sim 125 \text{ ns}$ . Já na cadeia B, a interação inicial foi fraca, mas após 150 ns, observou-se uma interação atrativa com amplitude de  $\sim -15 \text{ kcal mol}^{-1}$ .

Na variante A186V (Figura 17E), não foram detectadas interações entre o resíduo 186 e as Asn alostéricas em nenhuma das cadeias, com as curvas mantendo-se em perfil nulo ao longo de toda a simulação. Esse comportamento é consistente com resultados anteriores para esta variante, onde foi relatado que a mutação A186V favoreceu a expulsão das Asn dos sítios alostéricos, estabilizando-as nos sítios catalíticos. De maneira geral, os resultados indicam que, em todos os sistemas, o resíduo 186 apresentou interações fracas com as Asn alostéricas, sugerindo uma baixa afinidade dessa região pela Asn.

Figura 17 - Curvas de PII entre os resíduos 186 nos monômeros (A, B, C, D) e as respectivas Asn alostéricas. A) hASNase1, B) D87N, C) D84N, D) D87S, E) A186V.



Fonte: Elaborado pela autora.

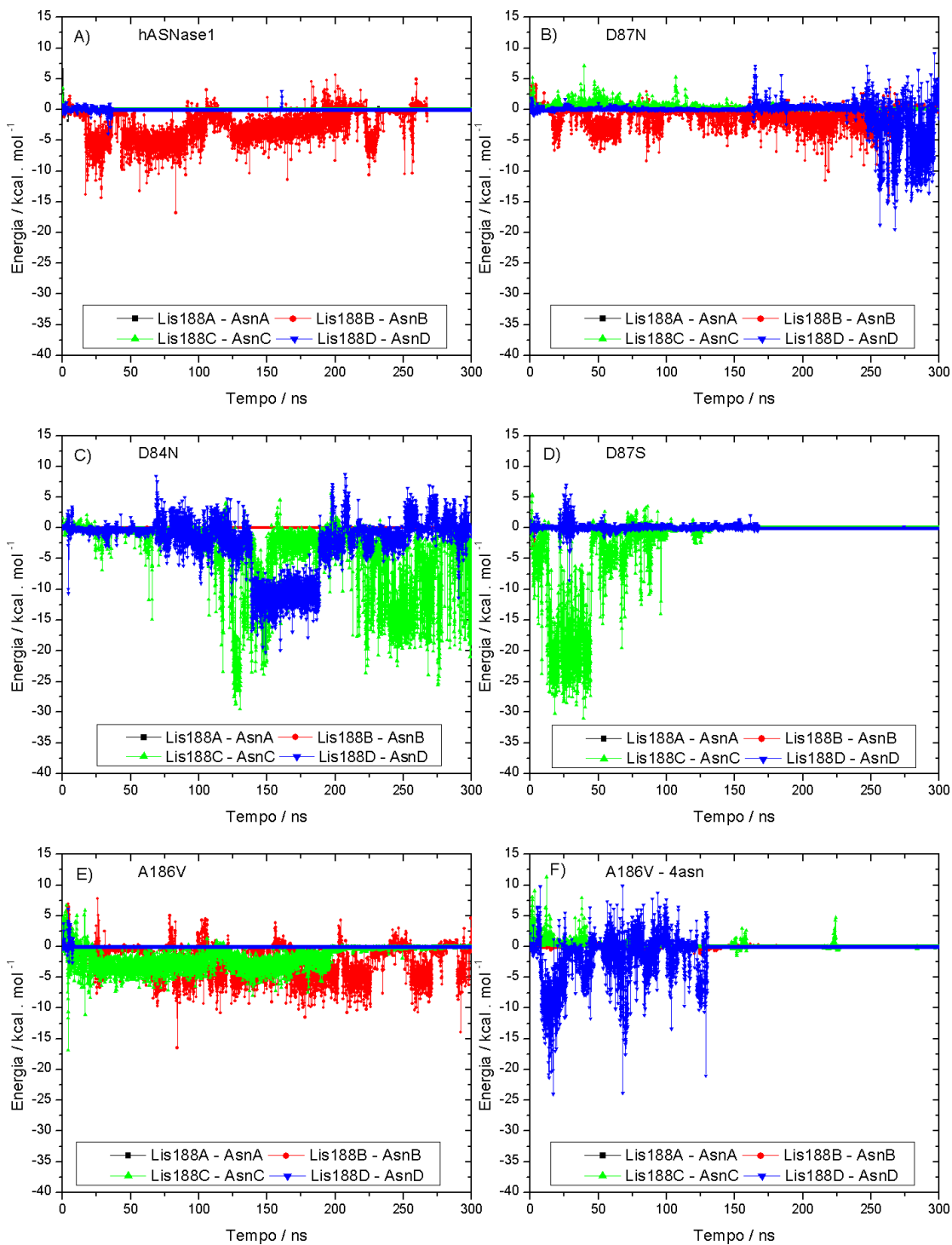
### 5.7 Análise de PII da lisina 188 com as asparaginas catalíticas, nas variantes D87N, D84N, D87S, A186V, A186V-4ASN e hASNase1.

A análise do PII para o resíduo Lys188 em hASNase1 (Figura 18A) mostrou PII que possibilita atração entre Asn e o sítio catalítico B, aproximadamente  $-15 \text{ kcal mol}^{-1}$ . Nos demais sítios catalíticos, não foram observadas interações significativas. As mutações na posição 87, D87N e D87S (Figuras 18 B e D) mostraram interações atrativas em maior número de monômeros que a hASNase1, como resultado de manutenção da Asn no sítio catalítico, mantendo a proximidade com a Lys188. Esse fato é realçado em D84N (Figura 18C) curva D, onde comparando com Figura 8D, que apresenta PII entre a Asn e sítio catalítico, mostra períodos idênticos de redução de PII. Os PII entre 150-200 ns chegam a um mínimo de  $-70 \text{ kcal mol}^{-1}$  (Figura 8C), enquanto um mesmo decréscimo, no mesmo período, é observado na Figura 18C, em monômero D,  $\sim -17 \text{ kcal mol}^{-1}$ .

A variante A186V (Figura 18E) apresentou interações entre Lys188 e Asn nos sítios B e C. No sítio B, a interação foi estável ao longo dos 300 ns, com amplitudes atrativas ( $\sim -17 \text{ kcal mol}^{-1}$ ) e breves picos repulsivos ( $\sim 7 \text{ kcal mol}^{-1}$ ). No sítio C, a interação foi mantida até  $\sim 190 \text{ ns}$ , com pico de  $\sim -10 \text{ kcal mol}^{-1}$ . Nos sítios A e D, as interações foram nulas. Isso foi observado anteriormente, a mutação estabilizou a posição de Lys188, mantendo-o orientado ao substrato que permaneceu no sítio nesses dois monômeros. No caso da variante A186V-4ASN (Figura 18F), a Lys188 do sítio D formou interações com Asn, com potenciais atrativos ( $\sim -25 \text{ kcal mol}^{-1}$ ) e repulsivos ( $\sim 10 \text{ kcal mol}^{-1}$ ), mas apenas até  $\sim 126 \text{ ns}$ . No sítio C, foi observado picos de curta duração de interação repulsiva ( $\sim 10 \text{ kcal mol}^{-1}$ ). As interações repulsivas nesses casos são indicativas que a Asn está rotacionado no sítio orientando os grupos amônio do aminoácido em direção ao da Lys188 e quando atrativo o grupo carboxila da Asn está mais próximo.

Ao comparar esses dados com o PII dos sítios catalíticos, fica evidente a importância da Lys188 na função catalítica e revela que a Asn rotaciona no sítio, em função da observação de PII positivos alternado com negativo. Os sítios com maior potencial de interação catalítica coincidem com aqueles onde Lys188 forma interações atrativas, reforçando seu papel como um resíduo-chave no mecanismo de catálise. Esses achados estão de acordo com Guimarães (2021), que relatou que a presença da Asn é fundamental para manter a posição da Lys188 e promover a reação no sítio catalítico.

Figura 18 - Curvas de PII entre os resíduos 188 nos monômeros (A, B, C, D) e a Asn residente nesses sítios em cada estrutura simulada. A) hASNase1, B) D87N, C) D84N, D) D87S, E) A186V e F) A186V-4ASN.



Fonte: Elaborado pela autora.

## 5.8 Análise de energia livre de ligação

### 5.8.1 EcII de *E. Coli*

A EcII é a enzima usada comercialmente com ótimas constantes cinéticas  $k_{cat}$  ( $48,9 \pm 0,6 \text{ s}^{-1}$ ) e  $K_m$  ( $14,9 \pm 1,3 \text{ }\mu\text{M}$ ) (SCHALK, 2014) para utilização em cânceres leucêmicos LLA. Portanto, é importante gerar os dados de energia livre de EcII para comparação com os de hASNase1 ( $k_{cat} = 14,4 \pm 0,4 \text{ s}^{-1}$  e  $K_m \sim 2980 \text{ }\mu\text{M}$ ).

Na EcII de *E. coli*, a análise de energia livre de ligação (Figura 19A) mostrou que, no monômero A com a Asn, a curva de energia se manteve ao longo dos  $\sim 300$  ns, apresentando valores de afinidade que variam de  $\sim -7 \text{ kcal mol}^{-1}$  (final da DM) a  $\sim 35 \text{ kcal mol}^{-1}$  indicando na região do  $\Delta G$  negativo com um valor que pode ser um bom balizador para comparação com hASNase1 e variantes. O  $\Delta G$  negativo indica que a Asn estabelece ligação mais apropriada com resíduos do monômero, favorecendo sua permanência no sítio catalítico. Em concordância com as análises de PII descritas por Guimarães (2019), o sítio catalítico A apresentou interações fortemente atrativas com a Asn. A média do  $\Delta G$  de ligação para este complexo foi de  $10,42 \pm 7,12 \text{ kcal mol}^{-1}$ , assim como para os outros monômeros que mostra que a água está presente no sítio e tem papel importante, como visto na Figura 1A, apoiando o modelo de reação em enzimas hidrolases que precisa da água para o ataque nucleofílico.

No monômero B, a interação com a Asn foi observada até  $\sim 200$  ns. Nos 50 ns iniciais, os valores de energia foram predominantemente negativos ( $\sim -10 \text{ kcal mol}^{-1}$ ), refletindo interações energeticamente estáveis. No entanto, após esse período, a curva apresentou valores de  $\Delta G$  positivos, sugerindo uma possível mudança conformacional que afetou as interações. A partir de  $\sim 200$  ns, a curva atingiu zero, causado pela dissociação do complexo. Os resultados de PII descritos por Guimarães (2019) reforçam essa observação, mostrando que a Asn se dissocia do sítio catalítico B após esse tempo. A média do  $\Delta G$  de ligação para este complexo foi de  $7,84 \pm 8,89 \text{ kcal mol}^{-1}$ .

Para o monômero C, a curva de energia livre de ligação apresentou grandes flutuações, variando entre  $\sim -20 \text{ kcal mol}^{-1}$  e  $\sim 30 \text{ kcal mol}^{-1}$ , devido uma instabilidade nas interações entre a Asn e os resíduos do monômero. Esses achados sugerem que a Asn não encontra uma posição favorável para manter interações estáveis. Análises de PII descritas por Guimarães (2019) mostraram que a Asn não apresenta interações significativas com o sítio catalítico deste monômero, sugerindo que as energias de ligação observadas podem estar

associadas a ligação com outros resíduos. A média do  $\Delta G$  de ligação para este complexo foi de  $0,28 \pm 8,21$  kcal mol<sup>-1</sup>. No monômero D, a curva de energia livre de ligação indicou interações apenas até ~175 ns, com valores de  $\Delta G$  variando de ~ -5 kcal mol<sup>-1</sup> a ~ 50 kcal mol<sup>-1</sup>. Entre ~50 ns e ~170 ns, a curva mostrou um perfil energético relativamente estável, sugerindo que a Asn mantém interações consistentes com os resíduos do sítio catalítico. Esses achados são consistentes com as análises de PII de Guimarães (2019), que demonstraram interações atrativas entre a Asn e o sítio catalítico D. No entanto, após ~175 ns, o perfil de energia foi reduzido a zero, causado pela dissociação do complexo. A média do  $\Delta G$  de ligação para este complexo foi de  $6,43 \pm 7,51$  kcal mol<sup>-1</sup>.

Em resumo, os achados de energia livre de ligação são consistentes com as análises de PII obtidas na DM. O monômero A mostrou o complexo mais estável e com maior tempo de residência da Asn, enquanto as ligações entre o sítio do monômero-Asn monômeros B-AsnB e D/AsnD apresentaram menor tempo de permanência do substrato. Por outro lado, o monômero C-AsnC evidenciou uma ligação instável, com flutuações significativas nos valores de energia.

### 5.8.2 *hASNase1*

Em todos os sistemas, a energia livre de ligação foi calculada para os quatro monômeros da proteína e suas respectivas Asn nos sítios catalíticos. Na *hASNase1* (Figura 19B), a análise do monômero A revelou que a energia livre de ligação permaneceu praticamente nula, com a curva oscilando próxima de zero, o que indica ausência de ligação significativa entre a Asn e o monômero. Esses resultados são consistentes com a análise de PII descrita por Guimarães (2019), que mostrou que a Asn se dissocia do sítio catalítico A, não formando interações estáveis.

No monômero B, os valores de energia livre de ligação variaram entre aproximadamente ~ -5 kcal mol<sup>-1</sup> e ~ 47 kcal mol<sup>-1</sup>, refletindo ligações mais significativas entre a Asn e os resíduos do monômero. A média do  $\Delta G$  de ligação foi de  $10,92 \pm 8,49$  kcal mol<sup>-1</sup>, efeito de uma afinidade relativamente maior em comparação com os outros monômeros. Esses achados são consistentes com os dados de PII de Guimarães (2019), que mostraram que o sítio catalítico B é o que apresenta interações atrativas mais fortes com a Asn.

Para o monômero C, a energia livre de ligação foi perceptível apenas até ~120 ns, com valores que oscilaram entre ~ -6 kcal mol<sup>-1</sup> e ~ 44 kcal mol<sup>-1</sup>, resultando em uma média de  $\Delta G$  de ligação de  $5,04 \pm 7,59$  kcal mol<sup>-1</sup>. O curto tempo de interação sugere que a Asn se dissocia rapidamente do monômero, comportamento confirmado pelas análises de PII, onde a Asn mostrou interações atrativas fracas com o sítio catalítico (Guimarães, 2019).

No monômero D, os primeiros ~50 ns apresentaram flutuações na energia livre de ligação, com valores variando entre ~ -5 kcal mol<sup>-1</sup> e ~ 33 kcal mol<sup>-1</sup>. Após esse período, a energia livre estabilizou-se em zero, causado por uma dissociação do complexo. Esse comportamento está em acordo com os resultados de DM e PII relatados por Guimarães (2019), que demonstraram que a Asn rapidamente se afasta do sítio catalítico D. A média do  $\Delta G$  de ligação para este complexo foi de  $0,90 \pm 3,55$  kcal mol<sup>-1</sup>.

De forma geral, os resultados de energia livre de ligação corroboram os achados das análises de PII e de distâncias entre grupos em simulações de DM, destacando que apenas o sítio B mantém a Asn ligada por um período mais longo, enquanto nos outros três sítios (A, C e D), a Asn se dissocia rapidamente, refletindo interações fracas e instáveis.

### 5.8.3 Variante A186V

A análise de energia livre de ligação da variante A186V (Figura 19C) revelou curva de  $\Delta G$  ao longo do tempo de DM para monômero A com Asn, a curva de  $\Delta G$  variou entre aproximadamente -7 kcal mol<sup>-1</sup> e 43 kcal mol<sup>-1</sup>, indicando variações na capacidade de ligação entre a asparagina e os resíduos do monômero. As flutuações acentuadas sugerem instabilidade na ligação, embora picos negativos momentâneos reflitam interações atrativas, ligações fortes. Esses achados estão de acordo a análise de PII do sítio catalítico, que mostraram dissociação precoce da Asn e baixa afinidade pelo sítio. A média da energia livre de ligação foi  $8,10 \pm 7,76$  kcal mol<sup>-1</sup>.

No monômero B, os valores de  $\Delta G$  oscilaram entre -7 kcal mol<sup>-1</sup> e 50 kcal mol<sup>-1</sup>, com menores flutuações, refletindo maior estabilidade da interação. Esse comportamento corrobora análises de PII, que mostraram a Asn permanecendo por mais tempo no sítio catalítico e formando interações fortemente atrativas. A média da energia livre de ligação foi de  $12,91 \pm 7,45$  kcal mol<sup>-1</sup>. Para o monômero C, a curva de  $\Delta G$  oscila entre -10 kcal mol<sup>-1</sup> e 57 kcal mol<sup>-1</sup>, mas com menor variação que outros monômeros, o que indica que a Asn encontrou

uma posição favorável para ligação. As análises de PII confirmaram que a Asn permaneceu ligada ao sítio catalítico C ao longo de toda a simulação, formando interações atrativas consistentes e estáveis. A média da energia livre de ligação foi de  $12,96 \pm 8,98$  kcal mol<sup>-1</sup>.

No entanto, o monômero D apresentou comportamento diferente. A curva de  $\Delta G$  manteve-se próxima de zero na maior parte do tempo, sugerindo ausência de ligação. Apenas picos momentâneos foram observados, insuficientes para manter a Asn ligada durante os 300 ns de simulação, o que foi confirmado por PII que mostrou que a Asn se dissociou rapidamente. A média da energia livre de ligação foi de  $0,63 \pm 3,28$  kcal mol<sup>-1</sup>. Esses resultados indicam que, nos monômeros B e C, a Asn apresenta maior estabilidade e interação, enquanto nos monômeros A e D, a ligação é instável ou ausente. Os achados de energia livre de ligação estão em total acordo com as observações das simulações análises de PII.

#### 5.8.4 Variante A86V-4ASN

A análise de energia livre de ligação para a variante A186V-4ASN (Figura 19D) as curvas revelaram padrões distintos de ligações entre os quatro monômeros. No monômero A, a curva de  $\Delta G$  apresentou ampla variação de amplitude até os 100 ns, sugerindo que, durante esse período, a Asn estava buscando uma posição favorável para formar ligação. Após esse ponto, a curva mostrou menor variação, pelo fato de que a Asn encontrou uma posição estável e interações favoráveis. Essa estabilidade está alinhada com os resultados de PII, que demonstraram interações significativas da Asn com o sítio catalítico A. A média da energia livre de ligação para esse complexo foi de  $4,71 \pm 5,22$  kcal mol<sup>-1</sup>.

No monômero B, a curva de  $\Delta G$  também apresentou variações de amplitude até os 100 ns, refletindo o período em que a Asn estava em busca de uma posição favorável. Após esse intervalo, a curva se estabilizou até os 300 ns, causado pelas interações estáveis entre a Asn e os resíduos do monômero B. Esse comportamento é consistente com os dados de PII, que mostraram interações inicialmente atrativas e intensas no sítio catalítico, seguidas por uma estabilização. A média de  $\Delta G$  foi de  $8,54 \pm 7,33$  kcal mol<sup>-1</sup>.

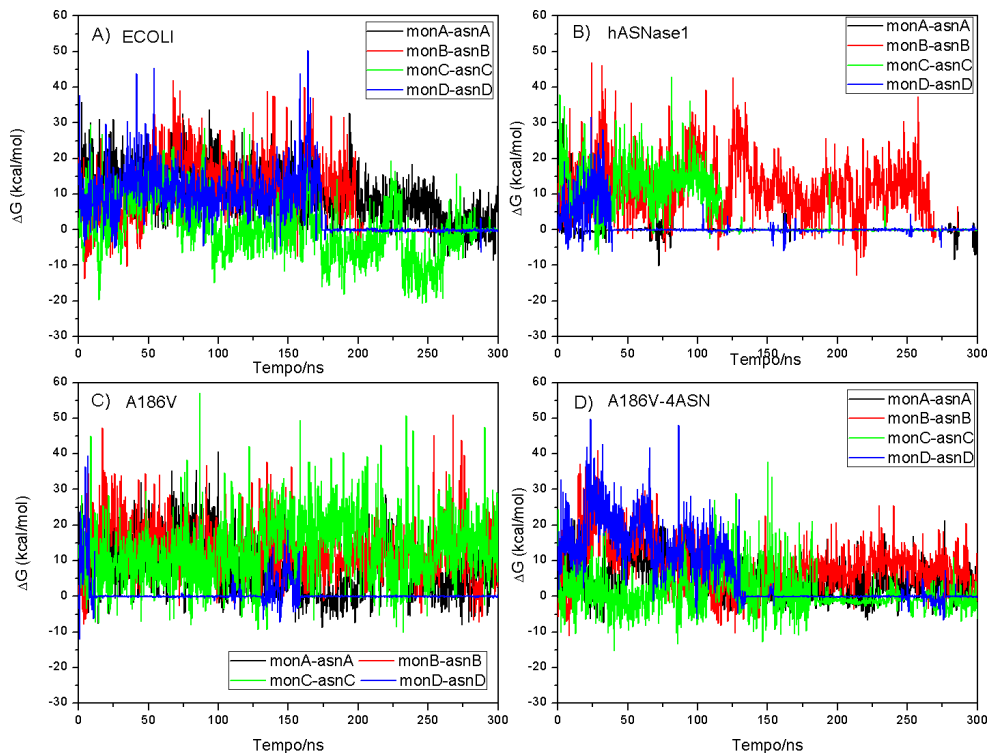
No monômero C, a curva de  $\Delta G$  exibiu flutuações significativas até aproximadamente 180 ns, com  $\Delta G$  variando de  $-15$  kcal mol<sup>-1</sup> a  $38$  kcal mol<sup>-1</sup>, sugerindo que a Asn estava ligada de maneira instável com os resíduos do monômero. Após esse período, a curva se manteve próxima de zero, causado pela ausência de interações ou dissociação do

complexo. Esses achados são confirmados pelos resultados pela análise de PII, que demonstraram que a Asn interagiu de maneira atrativa com o sítio catalítico até cerca de 180 ns, momento em que se afastou. A média da energia livre de ligação foi de  $1,10 \pm 5,70$  kcal mol<sup>-1</sup>.

No monômero D, a curva de  $\Delta G$  mostrou interações apenas até aproximadamente 130 ns, com variações de amplitude entre  $-7$  kcal mol<sup>-1</sup> e  $50$  kcal mol<sup>-1</sup>, evidenciando interações temporárias da Asn com os resíduos do monômero. Após esse período, os valores de  $\Delta G$  se mantiveram próximos de zero, causado pela ausência de ligação ou dissociação do complexo. O PII confirma que a Asn interagiu atrativamente com o sítio catalítico D até cerca de 130 ns antes de ir a zero, se afastando do sítio. A média de  $\Delta G$  foi de  $6,88$  kcal mol<sup>-1</sup>.

Em geral as curvas de  $\Delta G$  mostram o efeito da água sobre a Asn, onde  $\Delta G$  alto está correlacionado com saída do sítio catalítico, monitorado por PII (Figura 8). A Asn está no sítio e sendo solvatada, há uma competição entre a água e resíduos do sítio pelo Asn, que foi observada também para ECII.

Figura 19 - Curvas de energia livre de ligação dos monômeros A, B, C, D e suas respectivas asparaginas nos sistemas: A) ECOLI, B) hASNase1, C) A186V, D) A186V-4ASN.



Fonte: Elaborado pela autora.

### 5.8.5 Variante D87N

Os resíduos situados na borda e entrada do sítio catalítico foram avaliados em relação a influência na  $\Delta G$ , posições 84 e 87. A análise da curva de energia livre de ligação para o sistema D87N (Figura 20A) revelou padrões similares de  $\Delta G$  entre os monômeros, com oscilações. No monômero A, as interações entre a Asn e os resíduos foram estáveis refletidas por flutuações mínimas na curva de  $\Delta G$ , que variaram de aproximadamente  $-10 \text{ kcal mol}^{-1}$  a  $24 \text{ kcal mol}^{-1}$ , com apenas um pico mais pronunciado em 150 ns, efeito de ligação estável no sítio catalítico. Isso está em concordância com o observado na análise de PII, que demonstrou alta atratividade entre sítio e Asn. A média da energia livre de ligação foi de  $2,63 \pm 5,50 \text{ kcal mol}^{-1}$ .

No monômero B, o padrão foi semelhante ao do A, com a curva de  $\Delta G$  apresentando variações entre  $-13 \text{ kcal mol}^{-1}$  e  $33 \text{ kcal mol}^{-1}$ , novamente com flutuações mínimas e apenas um pico em 76 ns, sugerindo que a Asn formou ligação estável, predominantemente no sítio catalítico. Isso foi confirmado pela análise de PII, que revelou interações atrativas e estáveis. A média de  $\Delta G$  para esse complexo foi de  $11,21 \pm 6,31 \text{ kcal mol}^{-1}$ .

Em contraste, o monômero C apresentou maior instabilidade, com a curva de  $\Delta G$  oscilando entre  $3 \text{ kcal mol}^{-1}$  e  $47 \text{ kcal mol}^{-1}$ . No entanto, uma faixa de estabilidade foi observada entre 50 ns e 220 ns, indicando que, durante esse intervalo, a Asn manteve ligação favorável com o sítio catalítico. A análise de PII corroborou a observação de  $\Delta G$ , mostrando interações atrativas e consistentes. A média da energia livre de ligação foi de  $19,71 \pm 6,24 \text{ kcal mol}^{-1}$ .

Já no monômero D, a curva de  $\Delta G$  exibiu maiores amplitudes de flutuação, variando de  $7 \text{ kcal mol}^{-1}$  a  $53 \text{ kcal mol}^{-1}$ , refletindo uma baixa estabilidade de ligação. A Asn pareceu buscar constantemente posições favoráveis para se ligar, o que é consistente com os resultados de PII, que mostraram interações menos atrativas nos 150 ns iniciais e aumento da atratividade, posteriormente. Esses achados indicam que a Asn tenta se estabilizar no sítio catalítico, possivelmente mudando de posição no sítio, incluindo rotação. A média de  $\Delta G$  foi de  $13,23 \pm 8,12 \text{ kcal mol}^{-1}$ .

Assim, os resultados evidenciam que os monômeros A, B, C e D apresentaram possibilidade de ligação favorável entre a Asn e os sítios catalíticos, mas com características de ligações distintas observadas para A, B e C e o monômero D.

### 5.8.6 Variante D84N

A análise da energia livre de ligação do sistema D84N (Figura 20B) revelou diferenças marcantes nas curvas de  $\Delta G$  entre os monômeros e suas respectivas Asn. No monômero A, a curva de  $\Delta G$  mostrou que energias, até 90 ns, variação entre  $-20 \text{ kcal mol}^{-1}$  a  $37 \text{ kcal mol}^{-1}$ . Esse intervalo sugere que, inicialmente, a Asn se ligou de maneira significativa com o monômero. No entanto, após esse período, as ligações se tornaram mais fracas, em função das frequentes oscilações para  $\Delta G$  mais alto. A média da energia livre de ligação foi de  $2,69 \pm 6,89 \text{ kcal mol}^{-1}$ . Esses achados estão em concordância com o obtido pela análise de PII do sítio catalítico, que também revelou ausência de interações após 90 ns, motivo em que Asn se afasta completamente do monômero A.

Para o monômero B, a curva de  $\Delta G$  apresentou energia variando de  $17 \text{ kcal mol}^{-1}$  a  $50 \text{ kcal mol}^{-1}$  durante 300 ns da DM. Isso indica que a Asn permaneceu ligada ao monômero B com média da energia livre de ligação foi de  $13,46 \pm 7,94 \text{ kcal mol}^{-1}$ . Comparando com os dados de PII, observa-se que as interações ocorrem predominantemente no sítio catalítico, embora o perfil atrativo seja relativamente baixo, o que sugere que a Asn esteja deslocada do sítio catalítico. No monômero C, os  $\Delta G$  também foram registrados como não nulos, ao longo dos 300 ns, com flutuações que variaram de  $-10 \text{ kcal mol}^{-1}$  a  $43 \text{ kcal mol}^{-1}$ . No entanto, a partir de 130 ns, as oscilações na curva diminuem, sugerindo uma estabilização da ligação da Asn ao monômero. A média da energia livre de ligação foi de  $5,17 \pm 8,46 \text{ kcal mol}^{-1}$ . O PII para o sítio catalítico confirmou interações atrativas mais intensas até 130 ns, com redução da atratividade após esse momento, o que sugere que a Asn passa a interagir com outros resíduos do monômero C.

Por fim, no monômero D, a curva de  $\Delta G$  revelou energias contínuas entre a Asn e os resíduos ao longo dos 300 ns, com flutuações entre  $-13 \text{ kcal mol}^{-1}$  e  $50 \text{ kcal mol}^{-1}$ . No entanto, a partir de 150 ns, as oscilações diminuem, indicando que a ligação se torna mais estável. A média da energia livre de ligação foi de  $14,30 \pm 8,13 \text{ kcal mol}^{-1}$ . A análise de PII reforçou esses achados, mostrando que o sítio catalítico D foi o que apresentou a interação mais atrativa com Asn, evidenciando que o complexo se mantém estável principalmente devido às interações com os resíduos do sítio catalítico.

Esses resultados demonstram que a variante D84N apresenta interações diferenciadas entre os monômeros e as Asn, com o monômero D exibindo maior estabilidade e

interações mais atrativas, enquanto o monômero A mostrou-se o menos estável, com dissociação da Asn ao longo da simulação.

### 5.8.7 Variante D87S

A análise dos perfis de energia livre de ligação do sistema D87S (Figura 20C) revelou padrões distintos entre os monômeros e as respectivas Asn. No monômero A, os  $\Delta G$  variaram de aproximadamente  $-7 \text{ kcal mol}^{-1}$  a  $47 \text{ kcal mol}^{-1}$ , com uma média de  $2,48 \pm 7,19 \text{ kcal mol}^{-1}$ . Esses resultados indicam que houve ligação entre a Asn e o monômero A, mas uma análise apurada com avaliação do PII do sítio catalítico (Figura 8) mostrou que não ocorreram interações atrativas diretamente entre Asn e sítio catalítico. Isso sugere que a Asn se ligou a outros resíduos do monômero A, favorecendo uma ligação que não é diretamente mediada pelo sítio catalítico.

No monômero B, a curva de energia livre apresentou  $\Delta G$  que oscilaram entre  $-12 \text{ kcal mol}^{-1}$  e  $26 \text{ kcal mol}^{-1}$ , mas essas interações foram limitadas ao período inicial da simulação, até aproximadamente 80 ns. Após esse tempo, os  $\Delta G$  alcançaram zero, efeito uma perda de interação estável entre a Asn e o monômero B. Mínimos de  $\Delta G$  de curta duração foram observados, sugerindo interações momentâneas, mas sem estabilidade suficiente para se manterem. A média de  $\Delta G$  foi de  $0,92 \pm 3,48 \text{ kcal mol}^{-1}$ . A análise de PII do sítio catalítico B confirmou que essas interações ocorreram inicialmente no sítio catalítico, mas a Asn não permaneceu interagindo com o sítio.

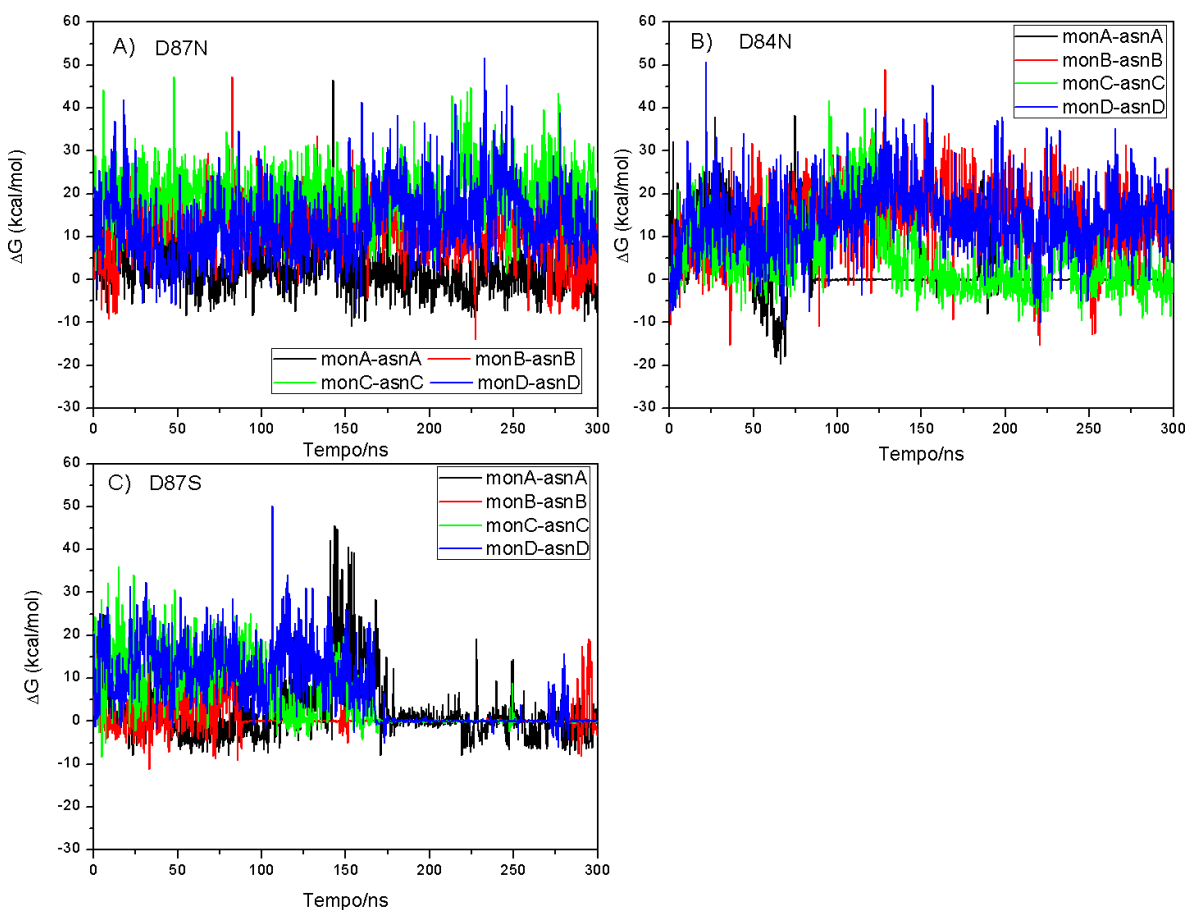
Para o monômero C, os  $\Delta G$  variaram entre  $-7 \text{ kcal mol}^{-1}$  e  $37 \text{ kcal mol}^{-1}$ , mas as energias foram observadas apenas até 175 ns. Após esse tempo, a curva energia nula ou próximo,  $\Delta G$  em torno de zero. A média de  $\Delta G$  foi de  $5,55 \pm 7,43 \text{ kcal mol}^{-1}$ . Esses resultados são coerentes com o PII do sítio catalítico, que mostrou interações inicialmente atrativas entre a Asn e o sítio catalítico, mas que se enfraqueceram com o tempo, levando à dissociação da Asn.

No monômero D, a curva de  $\Delta G$  variou de  $-3 \text{ kcal mol}^{-1}$  a  $50 \text{ kcal mol}^{-1}$ , também com interações limitadas a até 175 ns. Após esse período, os valores de  $\Delta G$  se mantiveram em zero, refletindo a perda de interação entre a Asn e o monômero. A média de  $\Delta G$  foi de  $7,10 \text{ kcal mol}^{-1}$ . A análise de PII do sítio catalítico reforçou esses achados, demonstrando que as

interações entre a Asn e o sítio D foram inicialmente atrativas, mas aumentaram, chegando a zero, levando à dissociação da Asn.

Esses resultados indicam que, para o sistema D87S, os monômeros B, C e D apresentaram interações atrativas durante um período inicial da DM, predominantemente nos sítios catalíticos, com as Asn se dissociando ao longo da simulação. O monômero A foi o único que mostrou ligação com a Asn ao longo da DM, mas não diretamente no sítio catalítico, sugerindo que outros resíduos podem ter contribuído para a estabilidade da ligação observada.

Figura 20 - Curvas de energia livre de ligação dos monômeros A, B, C, D e suas respectivas asparaginas, nos sistemas: A) D87N, B) D84N, C) D87S.



Fonte: Elaborado pela autora.

## 5.9 Relação entre energia livre de ligação e PII nos sistemas avaliados

Os resultados de energia livre de ligação obtidos pelo método MM/PBSA indicam que a solvatação exerce uma influência significativa sobre os sítios catalíticos dos sistemas analisados (Quadro 4). Essa influência torna-se evidente ao comparar os dados com os de PII. Nas análises de PII, observa-se que algumas mutações promovem interações eletrostáticas e de van der Waals mais favoráveis para interação Asn-sítio catalíticos para as variantes, em relação ao observado na enzima hASNase1, onde essas interações são mais fracas.

Dentre os sistemas avaliados, as variantes D87N, D84N e A186V destacam-se por apresentarem curvas de PII mais acentuadas, sugerindo uma melhora nas interações intermoleculares, principalmente para D87N. O resíduo polar, mas não carregado apresenta tamanho de cadeia lateral similar a Asp, apresentando PII Asn-sítio mais intensos que para o caso de D87S, onde a serina, polar, exerce um volume menor na borda do sítio. Ao comparar esses resultados com os gráficos de energia livre de ligação, verifica-se que justamente esses três sistemas apresentam os valores médios de  $\Delta G$  de ligação positivos. Esse fato reforça a interpretação de que a energia de solvatação tem um papel determinante nesses sistemas, superando os ganhos obtidos com interações eletrostáticas e de van der Waals, apresentadas em PII. Assim, a contribuição desfavorável da solvatação nos sítios catalíticos das variantes parece ser suficiente para comprometer a estabilidade, mas que isso foi menor no sistema variante D87N. Em relação a mutação A186V, essa está relacionada a melhoramento da orientação da Lys188 que compõe o sítio catalítico, alcançando e mantendo ela posicionada para melhor interação com a Asn e estabilidade da tríade catalítica.

Quadro 4:  $\Delta$ Gligação médio ( $\text{kcal mol}^{-1}$ ) e desvio padrão dos quatro monômeros nos sistemas de ECOLI, hASNase1, D87N, D84N, D87S, A186V, A186V-4ASN.

Sistema	$\Delta$ Gligação médio ( $\text{kcal mol}^{-1}$ ) e desvio padrão			
	MonA-ASN(A)	MonB-ASN(B)	MonC-ASN(C)	MonD-ASN(D)
ECOLI	$10,42 \pm 7,12$	$7,84 \pm 8,89$	$0,28 \pm 8,21$	$6,43 \pm 7,51$
hASNase1	$0,18 \pm 2,37$	$10,92 \pm 8,49$	$5,04 \pm 7,59$	$0,90 \pm 3,55$
D87N	$2,63 \pm 5,50$	$11,21 \pm 6,31$	$19,71 \pm 6,24$	$13,23 \pm 8,12$
D84N	$2,69 \pm 6,89$	$13,46 \pm 7,94$	$5,17 \pm 8,46$	$14,30 \pm 8,13$
D87S	$2,48 \pm 7,19$	$0,92 \pm 3,48$	$5,55 \pm 7,43$	$7,10 \pm 8,12$
A186V	$8,10 \pm 7,76$	$12,91 \pm 7,45$	$12,96 \pm 8,98$	$0,63 \pm 3,28$
A186V-4ASN	$4,71 \pm 5,22$	$8,54 \pm 7,33$	$1,10 \pm 5,70$	$6,88 \pm 9,67$

Fonte: Elaborado pela autora.

### 5.10 Distancias médias entre os resíduos dos sítios catalíticos nas variantes hASNase1

A fim de avaliar a estabilidade da tríade catalítica nos sistemas variantes, foram monitoradas as distâncias médias entre o resíduo Lys188 e os resíduos Asp117 e Thr116, que compõem essa tríade (Figura 21). Essa análise tem como objetivo investigar como essas distâncias variam, uma vez que, em simulações anteriores com hASNase1 (GUIMARÃES, 2021), foi observado que o resíduo Thr187, localizado próximo à Lys188, influencia seu posicionamento. Esse efeito ocorre devido à orientação da cadeia lateral da treonina em direção ao sítio alostérico, região composta por dois monômeros do dímero e que abriga duas moléculas de Asn.

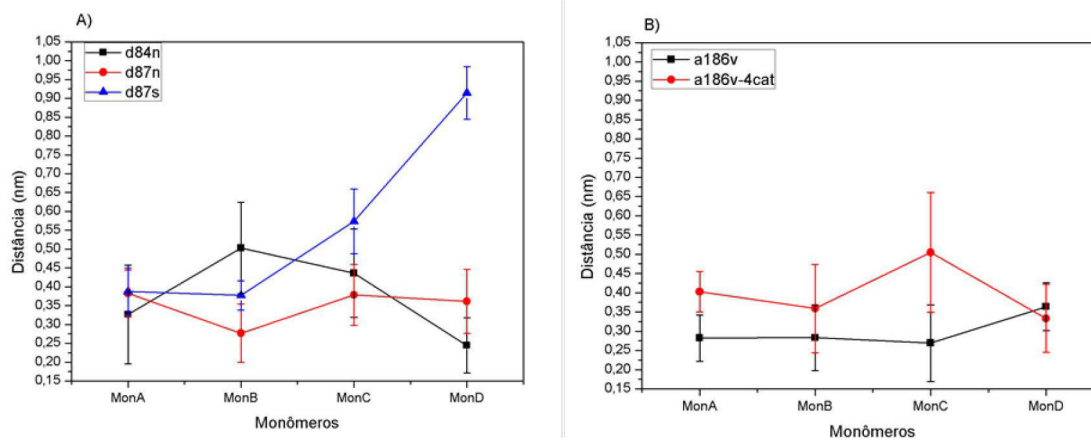
Nos sistemas variantes D84N, D87N e D87S, a variante D87N apresentou o menor distanciamento entre os resíduos da tríade catalítica em todos os monômeros, sugerindo uma maior proximidade entre esses resíduos, o que pode favorecer a estabilidade do sítio catalítico.

Em contraste, os sistemas D84N e D87S exibiram um distanciamento maior, especialmente a variante D87S, que apresentou a maior variação na média de distância no monômero D (~0,91 nm). Além disso, foi possível observar uma relação entre a proximidade dos resíduos da tríade e o tempo de permanência da Asn no sítio catalítico: nos sistemas D87N e D84N, onde as Asn permaneceram por mais tempo nos sítios, os resíduos da tríade estavam mais próximos. Já na variante D87S, em que as Asn apresentaram menor tempo de permanência, as distâncias entre os resíduos foram mais pronunciadas.

Nos sistemas A186V e A186V-4ASN, a variante A186V demonstrou uma menor média de distância entre os resíduos da tríade catalítica, apresentando um perfil de proximidade consistente nos monômeros A, B e C. Em contrapartida, o sistema A186V-4ASN mostrou distâncias mais acentuadas entre os resíduos, sugerindo que a ausência das Asn alostéricas pode ter prejudicado a estabilidade da tríade catalítica. Curiosamente, esses resultados sugerem que a mutação no resíduo 186, localizada na região alostérica, afeta diretamente a conformação da tríade catalítica. Esse efeito parece estar relacionado à proximidade do resíduo Thr187, que interage com Lys188, posicionando-o de maneira que influencia a estabilidade do sítio catalítico.

Esses achados reforçam a hipótese de que a conformação da tríade catalítica é influenciada não apenas pelas mutações no sítio catalítico, mas também por mudanças na região alostérica. A estabilidade e o tempo de permanência da Asn no sítio catalítico parecem estar diretamente relacionados à proximidade dos resíduos da tríade, o que impacta diretamente a eficiência catalítica da enzima.

Figura 21 - Distâncias mínimas médias e os desvios padrão entre Lys188 aos resíduos Asp117 e Thr116, obtida pelo programa gmx mindist, durante o tempo de DM, para cada sistema (D87N, D84N, D87S, A186V e A186V-4ASN) e cada monômero do tetrâmero (MoA, MoB, MoC e MoD).



Fonte: Elaborado pela autora.

## 6 CONCLUSÃO

Neste trabalho, desenvolvemos e validamos um protocolo integrado de simulações de dinâmica molecular (DM) e cálculos de energia livre de ligação pelo método MM/PBSA para orientar a engenharia de variantes da L-asparaginase humana (hASNase1). Aplicando esse protocolo às mutações D84N, D87S, D87N e A186V, observamos que todas as variantes mantêm a estabilidade global da estrutura terciária, com RMSDs similares à forma selvagem. A mutação D87N destacou-se por favorecer a orientação e retenção do substrato no sítio catalítico, exibindo potenciais de interação interatômica (PII) consistentemente negativos e  $\Delta G_{\text{bind}}$  médio mais favorável, explicando o aumento de 52× na atividade enzimática experimental. A variante D84N mostrou ganho moderado (19×), enquanto D87S apresentou dissociação precoce do ligante e  $\Delta G_{\text{bind}}$  menos favorável, refletindo somente 17× de incremento. A mutação alostérica A186V modulou positivamente as distâncias na tríade catalítica (Thr116–Asp117–Lys188) e manteve afinidade elevada, ressaltando o papel de sítios distantes na dinâmica do centro ativo.

Os resultados confirmam que o protocolo DM + MM/PBSA atende ao objetivo central do trabalho, permitindo prever com acurácia a estabilidade estrutural e afinidade do substrato em hASNase1 mutante. A aplicação sistemática desse fluxo computacional validou-se contra dados experimentais de atividade enzimática, demonstrando seu potencial para guiar a engenharia racional de variantes terapêuticas.

Como perspectivas, propomos explorar combinações sinérgicas das mutações D87N e A186V, visando ultrapassar ganhos de atividade de 100× em relação à enzima nativa, bem como investigar o efeito da variação no número de resíduos de asparagina alostéricos por dímero na estabilidade e dinâmica estrutural da hASNase1, ampliando o escopo do protocolo para outras enzimas de interesse biomédico.

## REFERÊNCIAS

- ABRAHAM, M. J. *et al.* Gromacs: High performance molecular simulations through multi-level parallelism from laptops to supercomputers. **SoftwareX**, [s.l.], v. 1–2, p. 19-25, 2015.
- AGARWAL, M.; SETH, R.; CHATTERJEE, T. Recent Advances in Molecular Diagnosis and Prognosis of Childhood B Cell Lineage Acute Lymphoblastic Leukemia (B-ALL). **Indian Journal of Hematology and Blood Transfusion**, [s.l.], v. 37, n. 1, p. 10-20, 2021.
- AKKUS, E. *et al.* Accurate Binding Free Energy Method from End-State MD Simulations. **Journal of Chemical Information and Modeling**, [s.l.], v. 62, n. 17, p. 4095–4106, 2022.
- ALAM, S. *et al.* Immobilization of L-asparaginase on magnetic nanoparticles: Kinetics and functional characterization and applications. **Bioresource Technology**, [s.l.], v. 339, 2021.
- ALLEN, M. P.; TILDESLEY, D. J. Computer Simulation of Liquids. Oxford: **Oxford University Press**, 1987.
- ALLEN, M. P.; TILDESLEY, D. J. Computer Simulation of Liquids. 2. ed. [s.l.]: **Oxford University Press**, 2017. 418 pp.
- ALVARNAS, J. C. *et al.* Acute lymphoblastic leukemia: Clinical practice guidelines in oncology. **JNCCN Journal of the National Comprehensive Cancer Network**. [s.l.], v. 10, n. 7, p. 858 – 914. 2012.
- ARBER, D. A. *et al.* International Consensus Classification of Myeloid Neoplasms and Acute Leukemias: integrating morphologic, clinical, and genomic data. **Blood**, [s.l.], v. 140, n. 11, p. 1200 – 1228. 2022.
- ASSELIN, B. L.; FISHER, V. Impact of clinical and subclinical hypersensitivity to asparaginase in acute lymphoblastic leukemia. **Clinical Journal of Oncology Nursing**, [s.l.], v. 18, n. 6, p. E107–E112, 2014.
- AURELI, A. *et al.* Acute Lymphoblastic Leukemia Immunotherapy Treatment: Now, Next, and Beyond. **Cancers**. [s.l.], v. 15, n. 13, 2023.
- AVRAMIS, V. I. Asparaginases: Biochemical pharmacology and modes of drug resistance. **Anticancer Research**, [s.l.], v. 32, p. 2423–2438. 2012.
- BARDELLI, V. *et al.* T-cell acute lymphoblastic leukemia: Biomarkers and their clinical usefulness. **Genes**. [s.l.], v. 12, n. 8, 2021.
- BATOOL, T. *et al.* A Comprehensive Review on l-Asparaginase and Its Applications. **Applied Biochemistry and Biotechnology**. [s.l.], v. 178, n. 5, p. 900 – 923. 2016.

BERENDSEN, H. J. C. *et al.* Interaction models for water in relation to protein hydration. **Intermolecular Forces**, [s.l.], [s.n.], p. 331-342, 1981.

BERENDSEN, H. J. C.; VAN DER SPOEL, D.; VAN DRUNEN, R. GROMACS: A message-passing parallel molecular dynamics implementation. **Computer Physics Communications**. [s.l.], v. 91, n. 1–3, p. 43 – 56, 1995.

BERG, J. M.; TYMOCZKO, J. L.; STRYER, L. **Bioquímica**. 7. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2014.

BISSWANGER, H. **Enzyme Kinetics: Principles and Methods**. 3. ed. Weinheim, Alemanha, Wiley. 2017. 336 pp.

BRAUN, E. *et al.* Best Practices for Foundations in Molecular Simulations. **Living Journal of Computational Molecular Science**, [s.l.], v. 1, n. 1, 2019.

BROOME, J. D. Evidence that the L-asparaginase of guinea pig serum is responsible for its antilymphoma effects. I. Properties of the L-asparaginase of guinea pig serum in relation to those of the antilymphoma substance. **The Journal of experimental medicine**, [s.l.], v. 118, n. 1, p. 99–120, 1963.

BROWN, J. S. *et al.* Updating the Definition of Cancer. **Molecular Cancer Research**, [s.l.], v. 21, n. 11, p. 1142 – 1147, 2023.

BROWN, P. A. *et al.* Effect of Postreinduction Therapy Consolidation with Blinatumomab vs Chemotherapy on Disease-Free Survival in Children, Adolescents, and Young Adults with First Relapse of B-Cell Acute Lymphoblastic Leukemia: A Randomized Clinical Trial. **JAMA - Journal of the American Medical Association**, [s.l.], v. 325, n. 9, p. 833 – 842, 2021.

CARACCILOLO, D. *et al.* The emerging scenario of immunotherapy for T-cell Acute Lymphoblastic Leukemia: advances, challenges and future perspectives. **Experimental Hematology and Oncology**, [s.l.], v. 12, n. 5, 2023.

COBALEDA, C. *et al.* Childhood B cell leukemia: Intercepting the paths to progression. **BioEssays**, [s.l.], v. 46, n. 9, 2024.

DE, S. K. An Overview of Cancer. Em: **Fundamentals of Cancer Detection, Treatment, and Prevention**. [s.l.: s.n.]. 2022.

DINMUKHAMED, T. *et al.* Current advances in design and engineering strategies of industrial enzymes. **Systems Microbiology and Biomanufacturing**, [s.l.], v. 1, n. 1, p. 15–23, 2021.

EGLER, R. A.; AHUJA, S. P.; MATLOUB, Y. L-asparaginase in the treatment of patients with acute lymphoblastic leukemia. **Journal of Pharmacology and Pharmacotherapeutics**, [s.l.], v. 7, n. 2, p. 62–71, 2016.

FORSTER, M. J. Molecular modelling in structural biology. **Micron**, [s.l.], v. 33, n. 4, p. 365 – 384, 2002.

FRENKEL, D.; SMIT, B. **Understanding Molecular Simulation - From Algorithms to Applications**. 2. ed. [s.l.]: Academic Press, 2002. 664 pp.

GAPSYS, V.; DE GROOT, B. Computational Thrombin Inhibitor Optimization. **Biophysical Journal**, [s.l.], v. 106, n. 2, p. 262a–263a, 2014.

GUIMARÃES, Ana Virgínia Frota. **Simulações de dinâmica molecular de L-asparaginases: estudo comparativo entre uma L-asparaginase humana, bacteriana e do porquinho da Índia**. 2019. 182 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia de Recursos Naturais) - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2019.

GUIMARÃES, A. V. F.; FROTA, N. F.; LOURENZONI, M. R. Molecular dynamics simulations of human L-asparaginase1: Insights into structural determinants of enzymatic activity. **Journal of Molecular Graphics and Modelling**, [s.l.], v. 109, 2021.

GUMARÃES, A. V, F.; **Engenharia de uma L-asparaginase humana visando o aumento da atividade asparaginásica**. [s.l.], Instituto Carlos Chagas, 2024.

HANSEN, N.; VAN GUNSTEREN, W. F. Practical aspects of free-energy calculations: A review. **Journal of Chemical Theory and Computation**, [s.l.], v. 10, n. 7, p. 2632–2647, 2014.

HOFFBRAND, A. V.; MOSS, P. A. H. **Fundamentos em hematologia**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2013.

HOSSEINI, K. *et al.* A Comprehensive Review of L-Asparaginase: Production, Applications and Therapeutic Potential in Cancer Treatment. **Applied Biochemistry and Microbiology**, [s.l.], v. 60, n. 4, p. 599–613, 2024.

HUANG, K. **Statistical Mechanics**, [s.l.], 2nd edition. Wiley, 1991.

FERLAY, J. *et al.* Cancer statistics for the year 2020: An overview. **Int J Cancer**. [s.l.] 2021.

INCA. ABC do Câncer: **Abordagens Básicas para o Controle do Câncer**. Instituto Nacional do Câncer. 6. ed. rev. atual. – Rio de Janeiro: INCA, 2020. 112p. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/sites/ufu.sti.inca.local/files/media/document/livro-abc-6-edicao-2020.pdf>. Acesso em: 9 out. 2023.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER. **Câncer. Tipos de câncer. Leucemia**. Disponível em: <<https://www.inca.gov.br/tipos-de-cancer>>.

IUBMB; IUPAC. **Enzyme Nomenclature**. Disponível em: <<https://iubmb.qmul.ac.uk/enzyme/>>. Acesso em: 22 out. 2023.

KARAMI, M.; JALALI, C.; MIRZAIE, S. Combined virtual screening, MMPBSA, molecular docking and dynamics studies against deadly anthrax: An in silico effort to inhibit Bacillus

anthracis nucleoside hydrolase. **Journal of Theoretical Biology**, [s.l.], v. 420, p. 180 – 189, 2017.

KARAMITROS, C. S.; KONRAD, M. Human 60-kDa lysophospholipase contains an N-terminal L-Asparaginase domain that is allosterically regulated by L- Asparagine. **Journal of Biological Chemistry**, [s.l.], v. 289, n. 19, p. 12962 – 12975, 2014.

KARPLUS, M.; MCCAMMON, J. A. Molecular dynamics simulations of biomolecules. **Nature Structural Biology**, New York, v. 9, n. 9, p. 646–652, 2002.

KHABADE, S. P.; SIRIGIRI, D. N. R.; RAM, A. B. l-Asparaginase from *Solanum lycopersicum* as a Nutraceutical for Acute Lymphoblastic Leukemia. **ACS Omega**, [s.l.], v. 9, n. 3, p. 3616 – 3624, 2024.

KOLLMAN, P. A. *et al.* Calculating structures and free energies of complex molecules: combining molecular mechanics and continuum models. **Accounts of chemical research**, [s.l.], v. 33, n. 12, p. 889-897, 2000.

KOPRIVNIKAR, J.; MCCLOSKEY, J.; FADERL, S. Safety, efficacy, and clinical utility of asparaginase in the treatment of adult patients with acute lymphoblastic leukemia. **OncoTargets and Therapy**, [s.l.], v. 10, p. 1413 – 1422, 2017.

KUMAR, A. *et al.* Microbial enzymes and major applications in the food industry: a concise review. **Food Production, Processing and Nutrition**, [s.l.], v. 6, n. 1, p. 1–16, 2024.

KUMAR, V.; ABBAS, A. K.; FAUSTO, N. **Robbins e Cotran: Patologia: Bases Patológicas das Doenças**. 8. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2010.

LEACH, A. R. **Molecular Modelling: Principles and Applications**. 2. ed. Harlow: Prentice Hall, 2001.

LEFIN, N. *et al.* Current state of molecular and metabolic strategies for the improvement of L-asparaginase expression in heterologous systems. **Frontiers in Pharmacology**, [s.l.], v. 14, 2023.

LETUNIC, I.; BORK, P. 20 years of the SMART protein domain annotation resource. **Nucleic Acids Research**, [s.l.], v. 46, n. D1, p. D493–D496, 2018.

LETUNIC, I.; DOERKS, T.; BORK, P. SMART: Recent updates, new developments and status in 2015. **Nucleic Acids Research**, [s.l.], v. 43, n. D1, p. D257–D260, 2015.

LI, L.; WANG, Y. Recent updates for antibody therapy for acute lymphoblastic leukemia. **Experimental Hematology and Oncology**, [s.l.], v. 9, n. 33, 2020.

LUBKOWSKI, J. *et al.* Structural and biochemical properties of L-asparaginase. **The FEBS Journal**, [s.l.], v. 288, n. 14, p. 4183–4209, 2021.

LUTZ, S.; IAMURRI, S. M. Protein Engineering: Past, Present, and Future. **Methods in Molecular Biology**, [s.l.], v. 1685, p. 1–12, 2018.

MANCINI, N. **Leucemia linfoide aguda em adultos é mais desafiadora**. *Revista Abrale*. São Paulo: Associação Brasileira de Linfoma e Leucemia, 2022. Disponível em: <https://revista.abrale.org.br/saude/2022/04/leucemia-linfoide-aguda-em-adultos-e-mais-desafiadora/>. Acesso em: 9 maio 2025.

MCCAMMON, J. A.; HARVEY, S. C. **Dynamics of Proteins and Nucleic Acids**. Cambridge: Cambridge University Press, 1987.

MAGGI, M.; SCOTTI, C. Structural Aspects of E. coli Type II Asparaginase in Complex with Its Secondary Product L-Glutamate. **International Journal of Molecular Sciences**, [s.l.], v. 23, n. 11, 2022.

MALARD, F.; MOHTY, M. Acute lymphoblastic leukaemia. **The Lancet**, [s.l.], v. 395, n. 10230, p. 1146 – 1162, 2020.

MALCZEWSKA, M. *et al.* Recent Advances in Treatment Options for Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia. **Cancers**, [s.l.], v. 14, n. 8, 2022.

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

MIRANDA, J. *et al.* Enzyme Engineering Strategies for the Bioenhancement of l-Asparaginase Used as a Biopharmaceutical. **BioDrugs**, [s.l.], v. 37, p. 793 – 811. 2023.

NAM, K. *et al.* Perspectives on Computational Enzyme Modeling: From Mechanisms to Design and Drug Development. **ACS Omega**, [s.l.], v. 9, n. 7, p. 7393 - 7412, 2024.

NDOCHINWA, O. G. *et al.* Current status and emerging frontiers in enzyme engineering: An industrial perspective. **Heliyon**, [s.l.], v. 10, n. 11, 2024.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de Bioquímica de Lehninger** 7. ed. Porto Alegre : Artmed, 2019.

National Cancer Institute. **SEER Cancer Stat Facts: Acute Lymphocytic Leukemia (ALL)**. Disponível em <https://seer.cancer.gov/statfacts/html/aly1.html>. Acesso em 23 de março de 2024.

NOMME, J. *et al.* Structures of apo and product-bound human l-asparaginase: Insights into the mechanism of autoproteolysis and substrate hydrolysis. **Biochemistry**, [s.l.], v. 51, n. 34, p. 6816 – 6826, 2012.

NOMME, J.; SU, Y.; LAVIE, A. Elucidation of the specific function of the conserved threonine triad responsible for human l-Asparaginase autocleavage and substrate hydrolysis. **Journal of Molecular Biology**, [s.l.], v. 426, n. 13, p. 2471 – 2485, 2014.

OLD, L. J. *et al.* Leukaemia-inhibiting properties and L-asparaginase activity of sera from certain South American rodents. **Nature**, [s.l.], v. 198, n. 4882, 1963.

PAGLIARO, L. *et al.* Acute lymphoblastic leukaemia. **Nature Reviews Disease Primers**, [s.l.], v. 10, n. 1, p. 1–28, 2024.

PATEL, N. *et al.* A dyad of lymphoblastic lysosomal cysteine proteases degrades the antileukemic drug l-asparaginase. **The Journal of Clinical Investigation**, [s.l.], v. 119, n. 7, p. 1964–1973, 2009.

PETRAKIS, N. L.; FRANCISCO, S. The Leukemias. **California Medicine**, [s.l.], v. 101, n. 1, p. 33, 1964.

PINHEIRO, M. P. **Desenvolvimento de L-Asparaginase Humana para Tratamento de Leucemia Linfóide Aguda**. [s.l.] Instituto Oswaldo Cruz, 2024.

POKROVSKAYA, M. V. *et al.* Molecular Analysis of L-Asparaginases for Clarification of the Mechanism of Action and Optimization of Pharmacological Functions. **Pharmaceutics**, [s.l.], v. 14, n.3, p. 599, 2022.

RADADIYA, A. *et al.* Improving the Treatment of Acute Lymphoblastic Leukemia. **Biochemistry**, [s.l.], v. 59, n. 35, p. 3193–3200, 2020.

RAFEI, H.; KANTARJIAN, H. M.; JABBOUR, E. J. Targeted therapy paves the way for the cure of acute lymphoblastic leukemia. **British Journal of Hematology**, [s.l.], v. 188, n. 2, p. 207–223, 2020.

ROBINSON, P. K. Enzymes: principles and biotechnological applications. **Essays in Biochemistry**, [s.l.], v. 59, p. 1–41, 2015.

SAHA, D.; NATH JHA, A. Computational multi-target approach to target essential enzymes of *Leishmania donovani* using comparative molecular dynamic simulations and MMPBSA analysis. **Phytochemical Analysis**, [s.l.], v. 34, n. 7, 2023.

SATTOJU, N.; MARAM, A. **Basics of Cancer: Prognosis and Diagnosis**. In: Current Progress in Medicine and Medical Research Vol. 4. [s.l.: s.n.].

SCHALK, A. M. *et al.* Identification and structural analysis of an L-asparaginase enzyme from guinea pig with putative tumor cell killing properties. **Journal of Biological Chemistry**, [s.l.], v. 289, n. 48, 2014.

SENGUPTA, S. *et al.* Preclinical evaluation of engineered L-asparaginase variants to improve the treatment of Acute Lymphoblastic Leukemia. **Translational Oncology**, [s.l.], v. 43, 2024.

SHAFQAT, I. *et al.* Characterization and applications of glutaminase free L- asparaginase from indigenous *Bacillus halotolerans* ASN9. **PLoS ONE**, [s.l.], v. 18, n. 11 November, 2023.

SHISHPARENOK, A. N.; GLADILINA, Y. A.; ZHDANOV, D. D. Engineering and Expression Strategies for Optimization of L-Asparaginase Development and Production. **International journal of molecular sciences**, [s.l.], v. 24, n. 20, 2023.

- ŚLIWA-TYTKO, P. *et al.* Neurotoxicity Associated with Treatment of Acute Lymphoblastic Leukemia Chemotherapy and Immunotherapy. **International Journal of Molecular Sciences**, [s.l.], v. 23, n. 10, 2022.
- STRAUCHEN, J. A. Acute Lymphocytic Leukemia. In: Diagnostic Histopathology of the Bone Marrow. [s.l.: s.n.].
- SWAIN, A. L. *et al.* Crystal structure of Escherichia coli L-asparaginase, an enzyme used in cancer therapy. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, [s.l.], v. 90, n. 4, p. 1474–1478, 1993.
- TERWILLIGER, T.; ABDUL-HAY, M. Acute lymphoblastic leukemia: a comprehensive review and 2017 update. **Blood Cancer Journal**, [s.l.], v. 7, n. 6, p. e577, 2017.
- VADILLO, E. *et al.* T cell acute lymphoblastic leukemia (T-ALL): New insights into the cellular origins and infiltration mechanisms common and unique among hematologic malignancies. **Blood Reviews**, [s.l.], v. 32, n. 1, p- 36-51, 2018.
- VALDÉS-TRESANCO, M. S. *et al.* gmx\_MMPBSA: A New Tool to Perform End-State Free Energy Calculations with GROMACS. **J. Chem. Theory Comput.** [s.l.], v. 17, n. 10, p. 6281–6291, 2021.
- VAN GUNSTEREN, W. F.; DOLENC, J.; MARK, A. E. Molecular simulation as an aid to experimentalists. **Current Opinion in Structural Biology**, [s.l.], v. 18, n. 2, p- 149-153, 2008.
- VELLARD, M. The enzyme as drug: application of enzymes as pharmaceuticals. **Current Opinion in Biotechnology**, [s.l.], v. 14, n. 4, p. 444–450, 2003.
- VERLET, L. Computer “Experiments” on Classical Fluids. I. Thermodynamical Properties of Lennard-Jones Molecules. **Physical Review**, [s.l.], v. 159, n. 1, p. 98, 1967.
- VETRIE, D.; HELGASON, G. V.; COPLAND, M. The leukaemia stem cell: similarities, differences and clinical prospects in CML and AML. **Nature Reviews Cancer**, [s.l.], v. 20, n. 3, p. 158 – 173, 2020.
- VLACHAKIS, D. *et al.* Current State-of-the-Art Molecular Dynamics Methods and Applications. **Advances in Protein Chemistry and Structural Biology**, [s.l.], v. 94, p. 269–313, 2014.
- VOET, D.; VOET, J. G. W. Bioquímica. 4ª edição. Porto Alegre: Artemed, 2013.
- WANG, N. *et al.* Overview of the structure, side effects, and activity assays of l- asparaginase as a therapy drug of acute lymphoblastic leukemia. **RSC Medicinal Chemistry**, [s.l.], v. 13, n. 2, p. 117-128, 2022.
- WHITELEY, A. E. *et al.* Leukaemia: a model metastatic disease. **Nature Reviews Cancer**, [s.l.], v. 21, n. 7, p. 461–475, 2021.

WILSON, K.; WALKER, J. Principles and Techniques of Biochemistry and Molecular Biology. Cambridge University Press, Cambridge. 2010.

XIA, X. Bioinformatics and Drug Discovery. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, [s.l.], v. 17, n. 15, p. 1709, 2017.

YOUSAF, R.; NAVID, A.; AZAM, S. S. Discovery of novel Glutaminase allosteric inhibitors through drug repurposing and comparative MMGB/PBSA and molecular dynamics simulation. **Computers in Biology and Medicine**, [s.l.], v. 146, 2022.

ZELIGER, H. I. Cancer. **Oxidative Stress**, [s.l.], p. 249–284, 2023.

ZLOTNICKI, M.; HASTINGS, C. Acute lymphoblastic leukaemia. The 5- Minute Pediatric Consult, 8th Edition, [s.l.], p. 22–23, 2020.