



**Estudos de *docking* molecular com Enzima Conversora de Angiotensina-like do carrapato *Rhipicephalus microplus* visando a descoberta de potenciais moléculas bioativas com aplicação biotecnológica**

Anne Cherem Peixoto da Silva

Macaé  
Novembro de 2014

Anne Cherem Peixoto da Silva

Título: Estudos de *docking* molecular com enzima conversora de angiotensina-*like* do carrapato *Rhipicephalus microplus* visando a descoberta de potenciais moléculas bioativas com aplicação biotecnológica.

Monografia Apresentada ao Curso de Farmácia da Universidade Federal do Rio de Janeiro como um dos requisitos para obtenção do título de farmacêutico

Orientadoras: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Nelilma Correia Romeiro  
Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Paula Alvarez Abreu

Macaé

Novembro de 2014

Silva , Anne Cherem Peixoto da

Estudos de *docking* molecular com Enzima Conversora de Angiotensina-like do carrapato *Rhipicephalus microplus* visando a descoberta de potenciais moléculas bioativas com aplicação biotecnológica/ Macaé, RJ, 2014

Orientadoras: Prof<sup>a</sup> Nelilma Correia Romeiro e Prof<sup>a</sup> Paula Alvarez Abreu

90 páginas

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Faculdade de Farmácia, Macaé 2014.

1. *Enzima Conversora de Angiotensina.*
2. *Modelagem molecular.*
3. *Inibidores da ECA.*

## **AGRADECIMENTOS**

Primeiramente a Deus por todos os momentos vividos nos 5 anos e por ter me dado a força necessária para concluir o curso.

À minha família, principalmente aos meus pais, meu irmão e meus avós pelo apoio, pela dedicação e por sempre acreditarem no meu potencial.

Aos meus colegas de turma pelo carinho, apoio e pela amizade que levarei para sempre.

Aos amigos que fiz nesses anos, principalmente João Henrique, Kamilla Trajano e Thiago Chelles. Obrigada pela amizade, pelo apoio e pelos inúmeros momentos de alegria e companheirismo.

Aos meus amigos, que mesmo nos momentos de afastamento, sempre se mostraram presentes me oferecendo palavras de força e carinho.

À minha orientadora de Iniciação Científica profa. Nelilma Romeiro pela oportunidade dada desde o início, pela dedicação e ensinamentos oferecidos. Nunca me esquecerei desses anos de alegria e aprendizado.

À profa. Paula Abreu que aceitou com todo carinho me orientar na ausência da profa. Nelilma Romeiro devido o pós-doutorado da mesma. Gostaria de dizer que sem você isso teria sido possível, você foi essencial, obrigada.

À profa. Glória Braz pela colaboração que foi essencial para a construção de um trabalho inovador e querido.

À banca por ter aceitado avaliar este trabalho.

À FAPERJ, LASSBio, NUPEM e LICC pelas ricas contribuições.

Cada um de vocês contribuiu para que esse sonho se tornasse realidade, seja no sentido acadêmico ou no sentido pessoal, agradeço imensamente a todos.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Carrapaticidas comumente utilizados. 19
- Figura 2:** Zinco coordenando com aminoácidos His383, His387, Glu411 e Asp415 na ECA humana. 22
- Figura 3:** Alinhamento das sequências da ECA humana (Código no PDB: 1O8A) (Berman *et al.*, 2000; Natesh *et al.*, 2004) e da ECA-like de *Rhipicephalus microplus*, BM91. Os resíduos conservados estão em azul ;\* Motif HHEMGGH conservado nos sítios catalíticos. 23
- Figura 4:** Esquema ilustrativo da degradação pelas Cininases-I e II, e ação nos receptores B1 e B2 e seus agonistas (Adaptado de Ramalho, 2000). 26
- Figura 5:** Inibidores da ECA. 28
- Figura 6:** Inibidores da Enzima Conversora de Angiotensina-I. Destaque para os grupamentos que fazem interação com o zinco na ECA humana. 31
- Figura 7:** Conversão do Enalapril a Enalaprilato através da hidrólise de seu grupamento éster etílico ao ácido carboxílico 31
- Figura 8:** Estruturas do substrato natural Hip-His-Leu, do nonapeptídeo inibidor de ECA de pulmão de mamíferos e do substrato natural Angiotensina-I. 32
- Figura 9:** Estrutura dos peptídeos alimentícios inibidores da ECA. 33
- Figura 10:** Características estruturais para bons candidatos à inibição da ECA (Adaptado de Mizuno *et al.*, 2004). 34
- Figura 11:** a) Vista frontal da estrutura em 3D da ECA humana. b) Vista frontal da Superfície de Potencial Eletrostático da ECA humana. c) Vista posterior da estrutura 3D da ECA humana. d) Vista posterior da Superfície de Potencial Eletrostático da ECA humana e) Vista 42

frontal da estrutura 3D da ECA-like BM91. **f)** Vista frontal da Superfície de Potencial Eletrostático da ECA-like BM91. **g)** Vista posterior da estrutura 3D da ECA-like BM91. **h)** Vista posterior da Superfície de Potencial Eletrostático da ECA-like BM91.

**Figura 12:** **a)** Superfície de Potencial Eletrostático do sítio ativo da ECA humana. **b)** Superfície de Potencial Eletrostático do sítio ativo da ECA-like, denominada BM91. **44**

**Figura 13:** **a)** Vista frontal do sítio ativo da ECA-like BM91 **b)** Vista superior do sítio ativo da ECA-like BM91. **c)** Vista frontal do sítio ativo da ECA humana. **d)** Vista superior do sítio ativo da ECA humana. **45**

**Figura 14:** Formas ionizadas dos inibidores da ECA utilizadas no estudo. **45**

**Figura 15:** Formas ionizadas dos peptídeos alimentares GKP, ALPMHIR, do substrato Hip-His-Leu e do nonapeptídeo utilizados no estudo. **46**

**Figura 16:** Valores de *score* obtidos por *docking* dos inibidores com a ECA humana e a ECA-like BM91, com o programa GOLD. **47**

**Figura 17:** Sobreposição da pose obtida no *docking* (azul) com o cristal (Natesh *et al.*, 2004, Código do PDB 1UZE) (rosa) do inibidor Enalaprilato na ECA humana. **48**

**Figura 18:** Comparação entre o cristal do Enalaprilato (Natesh *et al.*, 2004, Código do PDB 1UZE) (A) e a melhor pose obtida para a o mesmo no *redocking* (B). **48**

**Figura 19:** Melhor complexo do Enalaprilato com a ECA humana obtido por *docking*. Ligações hidrogênio e coordenação com o Zn pontilhadas em amarelo e resíduos de aminoácidos envolvidos em verde. Os átomos de hidrogênio foram omitidos para melhor visualização. Em lilás os resíduos que compõem o *motif*. **50**

**Figura 20:** Sobreposição da pose obtida no *docking* (azul) com o cristal (Natesh *et al.*, 2004, Código do PDB 1UZF) (rosa) do inibidor Captopril **50**

- Figura 21:** Comparação entre o cristal do Captopril (Natesh *et al.*, 2004, Código do PDB 1UZF) (A) e a melhor pose obtida para a o mesmo no *redocking* (B). 51
- Figura 22:** Melhor complexo do Captopril com a ECA humana obtido por *docking*. Ligações hidrogênio pontilhadas em amarelo e resíduos de aminoácidos envolvidos em verde. Os átomos de hidrogênio foram omitidos para melhor visualização. Em lilás os resíduos que compõem o *motif*. 52
- Figura 23:** Sobreposição da pose obtida (azul) com o cristal (Natesh *et al.*, 2004, Código do PDB 1O86) (rosa) do inibidor Lisinopril. 52
- Figura 24:** Comparação entre o cristal do Lisinopril (Natesh *et al.*, 2004, Código do PDB 1O86) (A) e a melhor pose obtida para a o mesmo no *redocking* (B). 53
- Figura 25:** Melhor complexo do Lisinopril com a ECA humana obtido por *docking*. Ligações hidrogênio e coordenação com o zinco pontilhadas em amarelo e resíduos de aminoácidos envolvidos em verde. Os átomos de hidrogênio foram omitidos para melhor visualização. Em lilás os resíduos que compõem o *motif*. 54
- Figura 26:** Comparação entre o cristal do Enalaprilato (Natesh *et al.*, 2004, Código do PDB 1UZE) (A) e a melhor pose do mesmo obtida para a ECA BM91 (B). 54
- Figura 27:** Melhor complexo do Enalaprilato com a ECA-like BM91 obtido por *docking*. Ligações hidrogênio e coordenação com o zinco pontilhadas em amarelo e resíduos de aminoácidos envolvidos em verde. Os átomos de hidrogênio foram omitidos para melhor visualização. Em lilás os resíduos que compõem o *motif*. 55
- Figura 28:** Comparação entre o cristal do Captopril (Natesh *et al.*, 2004, Código do PDB 1UZF) (A) e a melhor pose do mesmo obtida para a ECA BM91 (B). 56

- Figura 29:** Melhor complexo do Captopril com a ECA-like BM91 obtido por *docking*. Ligações hidrogênio e coordenação com o zinco pontilhadas em amarelo e resíduos de aminoácidos envolvidos em verde. Os átomos de hidrogênio foram omitidos para melhor visualização. Em lilás os resíduos que compõem o *motif*. 57
- Figura 30:** Comparação entre o cristal do Lisinopril (Natesh *et al.*, 2004, Código do PDB 1O86) (A) e a melhor pose do mesmo obtida com a ECA BM91 (B). 57
- Figura 31:** Melhor complexo do Lisinopril com a ECA-like BM91 obtido por *docking*. Ligações hidrogênio e coordenação com o zinco pontilhadas em amarelo e resíduos de aminoácidos envolvidos em verde. Os átomos de hidrogênio foram omitidos para melhor visualização. Em lilás os resíduos que compõem o *motif*. 58
- Figura 32:** Valores de *score* obtidos por *docking* do substrato Hip-His-Leu com a ECA humana e a ECA-like BM91. 59
- Figura 33:** Melhor complexo do Hip-His-Leu com a ECA humana obtido por *docking*. Ligações hidrogênio e coordenação com o zinco pontilhadas em amarelo e resíduos de aminoácidos envolvidos em verde. Os átomos de hidrogênio foram omitidos para melhor visualização. Em lilás os resíduos que compõem o *motif*. 60
- Figura 34:** Comparação entre a melhor pose do substrato Hip-His-Leu com a ECA humana (A) e a melhor pose do mesmo obtida com a ECA BM91 (B). 61
- Figura 35:** Melhor complexo do Hip-His-Leu com a ECA-like BM91 obtido por *docking*. Ligações hidrogênio e coordenação com o zinco pontilhadas em amarelo e resíduos de aminoácidos envolvidos em verde. Os átomos de hidrogênio foram omitidos para melhor visualização. Em lilás os resíduos que compõem o *motif*. 62
- Figura 36:** Valores de *score* obtidos por *docking* dos peptídeos e a ECA humana e ECA-like BM91. 63
- Figura 37:** Melhor complexo do nonapeptídeo com a ECA humana obtido por *docking*. Ligações hidrogênio e coordenação com o zinco pontilhadas em amarelo e resíduos de aminoácidos envolvidos em verde. Os átomos de hidrogênio foram omitidos para melhor visualização. Em lilás os resíduos que compõem o *motif*. 64



- Figura 38:** Melhor complexo do IPP com a ECA humana obtido por *docking*. Ligações hidrogênio e coordenação com o zinco pontilhadas em amarelo e resíduos de aminoácidos envolvidos em verde. Os átomos de hidrogênio foram omitidos para melhor visualização. Em lilás os resíduos que compõem o *motif*. 65
- Figura 39:** Melhor complexo do VPP com a ECA humana obtido por *docking*. Ligações hidrogênio e coordenação com o zinco pontilhadas em amarelo e resíduos de aminoácidos envolvidos em verde. Os átomos de hidrogênio foram omitidos para melhor visualização. Em lilás os resíduos que compõem o *motif*. 66
- Figura 40:** Melhor complexo do IPA com a ECA humana obtido por *docking*. Ligações hidrogênio e coordenação com o zinco pontilhadas em amarelo e resíduos de aminoácidos envolvidos em verde. Os átomos de hidrogênio foram omitidos para melhor visualização. Em lilás os resíduos que compõem o *motif*. 67
- Figura 41:** Melhor complexo do FP com a ECA humana obtido por *docking*. Ligações hidrogênio e coordenação com o zinco pontilhadas em amarelo e resíduos de aminoácidos envolvidos em verde. Os átomos de hidrogênio foram omitidos para melhor visualização. Em lilás os resíduos que compõem o *motif*. 68
- Figura 42:** Melhor complexo do GKP com a ECA humana obtido por *docking*. Ligações hidrogênio e coordenação com o zinco pontilhadas em amarelo e resíduos de aminoácidos envolvidos em verde. Os átomos de hidrogênio foram omitidos para melhor visualização. Em lilás os resíduos que compõem o *motif*. 69
- Figura 43:** Melhor complexo do ALPMHIR com a ECA humana obtido por *docking*. Ligações hidrogênio e coordenação com o zinco pontilhadas em amarelo e resíduos de aminoácidos envolvidos em verde. Os átomos de hidrogênio foram omitidos para melhor visualização. Em lilás os resíduos que compõem o *motif*. 70
- Figura 44:** Comparação entre a melhor pose do nonapeptídeo com a ECA humana (A) e a melhor pose do mesmo obtida com a ECA BM91 (B). 70
- Figura 45:** Melhor complexo do nonapeptídeo com a ECA-like BM91 obtido por *docking*. Ligações hidrogênio e coordenação com o zinco 71

pontilhadas em amarelo e resíduos de aminoácidos envolvidos em verde. Os átomos de hidrogênio foram omitidos para melhor visualização. Em lilás os resíduos que compõem o *motif*.

**Figura 46:** Comparação entre a melhor pose do IPP com a ECA humana (A) e a melhor pose do mesmo obtida com a ECA BM91 (B). 72

**Figura 47:** Melhor complexo do IPP com a ECA-like BM91 obtido por *docking*. Ligações hidrogênio e coordenação com o zinco pontilhadas em amarelo e resíduos de aminoácidos envolvidos em verde. Os átomos de hidrogênio foram omitidos para melhor visualização. Em lilás os resíduos que compõem o *motif*. 73

**Figura 48:** Comparação entre a melhor pose do VPP com a ECA humana (A) e a melhor pose do mesmo obtida com a ECA BM91 (B). 73

**Figura 49:** Melhor complexo do VPP com a ECA-like BM91 obtido por *docking*. Ligações hidrogênio e coordenação com o zinco pontilhadas em amarelo e resíduos de aminoácidos envolvidos em verde. Os átomos de hidrogênio foram omitidos para melhor visualização. Em lilás os resíduos que compõem o *motif*. 74

**Figura 50:** Comparação entre a melhor pose do IPA com a ECA humana (A) e a melhor pose do mesmo obtida com a ECA BM91 (B). 75

**Figura 51:** Melhor complexo do IPA com a ECA-like BM91 obtido por *docking*. Ligações hidrogênio e coordenação com o zinco pontilhadas em amarelo e resíduos de aminoácidos envolvidos em verde. Os átomos de hidrogênio foram omitidos para melhor visualização. Em lilás os resíduos que compõem o *motif*. 76

**Figura 52:** Comparação entre a melhor pose do FP com a ECA humana (A) e a melhor pose do mesmo obtida com a ECA BM91 (B). 76

**Figura 53:** Melhor complexo do FP com a ECA-like BM91 obtido por *docking*. Ligações hidrogênio e coordenação com o zinco pontilhadas em amarelo e resíduos de aminoácidos envolvidos em verde. Os átomos de hidrogênio foram omitidos para melhor visualização. Em lilás os resíduos que compõem o *motif*. 77

**Figura 54:** Comparação entre a melhor pose do GKP com a ECA humana (A) e a melhor pose do mesmo obtida com a ECA BM91 (B). 78

**Figura 55:** Melhor complexo do GKP com a ECA-*like* BM91 obtido por *docking*. Ligações hidrogênio e coordenação com o zinco pontilhadas em amarelo e resíduos de aminoácidos envolvidos em verde. Os átomos de hidrogênio foram omitidos para melhor visualização. Em lilás os resíduos que compõem o *motif*. **78**

**Figura 56:** Comparação entre a melhor pose do ALPMHIR com a ECA humana (A) e a melhor pose do mesmo obtida com a ECA BM91 (B). **79**

**Figura 57:** Melhor complexo do ALPMHIR com a ECA-*like* BM91 obtido por *docking*. Ligações hidrogênio e coordenação com o zinco pontilhadas em amarelo e resíduos de aminoácidos envolvidos em verde. Os átomos de hidrogênio foram omitidos para melhor visualização. Em lilás os resíduos que compõem o *motif*. **80**

## LISTA DE TABELAS E QUADROS

**Tabela 1:** Interações observadas entre os inibidores Lisinopril, Enalaprilato e Captopril e ECA humana.

**Tabela 2:** Resíduos selecionados para a análise da superfície de potencial eletrostático dos sítios ativos da ECA humana e a BM91. Em destaque os resíduos de aminoácidos não conservados.

**Quadro 1:** Características dos inibidores da Enzima Conversora de Angiotensina-I.

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIÇÕES

$\mu\text{M}$	Micromolar
3D-SAR	Relação estrutura e atividade tridimensional
Å	Ângstrom
AnCE	Enzima Conversora de Angiotensina de <i>Drosophila melanogaster</i>
	Enzima Conversora de Angiotensina de <i>Drosophila melanogaster</i>
ACEr	
BK	Bradicinina
ECA	Enzima Conversora de Angiotensina-I
HIP	Hipuril
IECA	Inibidores da Enzima Conversora de Angiotensina
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
kDa	Kilodalton

### Aminoácidos

A Ala	Alanina
C Cys	Cisteína
D Asp	Ácido Aspártico
E Glu	Ácido Glutâmico
F Phe	Fenilalanina
G Gly	Glicina
H His	Histidina
I Ile	Isoleucina
K Lys	Lisina
L Leu	Leucina
M Met	Metionina
N Asn	Asparagina
P Pro	Prolina
Q Gln	Glutamina
R Arg	Arginina
S Ser	Serina
T Thr	Treonina
V Val	Valina
W Trp	Triptofano

## SUMÁRIO

<b>1 Introdução.....</b>	<b>18</b>
1.1 Método de controle de carrapatos.....	18
1.2 Enzima Conversora de Angiotensina (ECA) e ECA- <i>like</i> : Um potencial alvo terapêutico em invertebrados.....	21
1.2.1 Inibidores da Enzima Conversora de Angiotensina (IECAs).....	25
1.2.2 Peptídeos com ações na ECA.....	31
1.3 Modelagem molecular.....	34
1.3.1 Técnica de <i>Docking</i> molecular.....	36
<b>2 Justificativa.....</b>	<b>36</b>
<b>3 Objetivos.....</b>	<b>36</b>
3.1 Objetivos gerais.....	36
3.2 Objetivos específicos.....	37
<b>4 Metodologia.....</b>	<b>39</b>
4.1 Obtenção das Estruturas das Proteínas.....	39
4.2 Análise estrutural das proteínas-alvo e seus sítios ativos.....	39
<b>5 Resultados e Discussão.....</b>	<b>41</b>
5.1 Análise estrutural das proteínas-alvo e seus sítios ativos.....	41
5.2 Estruturas de <i>Docking</i> molecular.....	45
5.2.1 Preparo dos ligantes.....	45
5.3 <i>Docking</i> de fármacos anti-hipertensivos na ECA humana e ECA- <i>like</i> BM91.....	47
5.3.1 Análise das Interações entre os fármacos anti-hipertensivos e a ECA humana.....	48
5.3.1.1 <i>Enalaprilato</i> .....	48
5.3.1.2 <i>Captopril</i> .....	50
5.3.1.3 <i>Lisinopril</i> .....	52
5.3.2 Análise das Interações entre os fármacos anti-hipertensivos e a ECA- <i>like</i> BM91.....	54
5.3.2.1 <i>Enalaprilato</i> .....	54
5.3.2.2 <i>Captopril</i> .....	55
5.3.2.3 <i>Lisinopril</i> .....	57
5.4 <i>Docking</i> do substrato Hip-His-Leu na ECA humana e ECA- <i>like</i> BM91.....	59
5.4.1 Análise das Interações entre o substrato Hip-His-Leu e a ECA humana.....	59
5.4.2 Análise das Interações entre o substrato Hip-His-Leu e a ECA- <i>like</i> BM91.....	60
5.5 <i>Docking</i> de inibidores peptídicos na ECA humana e ECA- <i>like</i> BM91..	62
5.5.1 Análise das Interações entre os inibidores peptídicos e a ECA humana.....	63
5.5.1.1 <i>Nonapeptídeo</i> .....	63
5.5.1.2 <i>IPP</i> .....	64
5.5.1.3 <i>VPP</i> .....	65
5.5.1.4 <i>IPA</i> .....	66
5.5.1.5 <i>FP</i> .....	67
5.5.1.6 <i>GKP</i> .....	68

5.5.1.7 <i>ALPMHIR</i> .....	69
5.5.2 Análise das Interações entre os inibidores peptídicos e a <i>ECA-like</i> BM91.....	70
5.5.2.1 <i>Nonapeptídeo</i> .....	70
5.5.2.2 <i>IPP</i> .....	72
5.5.2.3 <i>VPP</i> .....	73
5.5.2.4 <i>IPA</i> .....	75
5.5.2.5 <i>FP</i> .....	76
5.5.2.6 <i>GKP</i> .....	77
5.5.2.7 <i>ALPMHIR</i> .....	79
<b>6 Conclusão</b> .....	<b>80</b>
<b>7 Referências</b> .....	<b>81</b>

## RESUMO

O carrapato *Rhipicephalus microplus* é um dos maiores responsáveis pela infestação do gado bovino em regiões tropicais e subtropicais, levando a grandes perdas econômicas. Estratégias de controle deste artrópode encontram-se defasadas, sendo em sua maioria ineficientes e demandando a busca por novos alvos moleculares para o desenvolvimento de substâncias inovadoras para o controle da infestação. Baseado na importância do controle do carrapato *R. microplus* para a economia do país, este trabalho teve como objetivo o estudo estrutural comparativo de uma Enzima Conversora de Angiotensina-like (ECA-like) deste carrapato com ECA humana e a identificação de substâncias com potencial bioatividade utilizando ferramentas de Modelagem Molecular. Os resultados obtidos com inibidores conhecidos da ECA humana e peptídeos selecionados da literatura sugerem que os inibidores se ligam de modo bastante semelhante ao que é observado na ECA humana. Além disso, o *docking* realizado sugere que os peptídeos bioativos têm o potencial para inibir a ECA-like com similaridade no modo de ligação dos fármacos anti-hipertensivos, embora os peptídeos apresentem menor afinidade. Tanto os inibidores quanto os peptídeos apresentaram afinidade maior pela ECA-like de acordo com os resultados do *docking* molecular. Estes dados abrem novas perspectivas para estudos que possam mostrar afinidade entre outros tipos de inibidores conhecidos de ECA humana com a ECA-like do carrapato *Rhipicephalus microplus*, com possíveis aplicações biológicas.

Palavras-chaves: Enzima conversora de angiotensina, *Rhipicephalus microplus*, ECA-like, modelagem molecular



## ABSTRACT

The tick *Rhipicephalus microplus* is responsible for one of the largest infestations of cattle in tropical and subtropical regions, leading to major economic losses. Arthropod control strategies are outdated, in addition to being inefficient, which requires the search for new molecular targets related to the physiology of the tick, which can be innovative target substances for the control of infestation. Based on the importance of the control of the tick *R. microplus* for the country's economy, the aim of this work is to establish a comparative structural study of an Angiotensin Converting Enzyme-like (ACE-like) from this tick with human ACE and the identification of potential bioactive substances using molecular modeling tools. The results obtained with known human ACE inhibitors and selected peptides from the literature suggest that inhibitors bind molecules in a very similar manner to what is observed in human ACE. Besides this, the docking performed suggests that bioactive peptides present the potential to inhibit ACE-like with similarity in the binding mode of antihypertensive drugs, although these peptides have lower affinity for this enzyme. Both the drugs and the peptides present higher affinity for the ACE-like according to the molecular docking results. These data open new perspectives for studies that may show affinity between other known inhibitors of human ACE with ACE-like of the tick *Rhipicephalus microplus*, with possible biological applications.

Keywords: Angiotensin converted enzyme, *Rhipicephalus microplus*, ECA-like, molecular modeling

## 1. Introdução

Os ectoparasitos são considerados um grande entrave à atividade agropecuária em todo o mundo, particularmente nas zonas neotropicais, devido às condições climáticas propícias ao seu desenvolvimento e reprodução dos parasitos, com especial destaque para o carrapato dos bovinos, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Silva Filho, 2007).

Carrapatos são artrópodes hematófagos distribuídos por todo o mundo e vetores de diversas doenças. O carrapato bovino *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* é um carrapato de um só hospedeiro e considerado o mais importante parasito de animais domésticos da América Latina. O *R. microplus* causa sérios danos diretos aos bovinos, principalmente devido à espoliação de sangue, que leva à anemia e diminuição da produção de leite e do ganho de peso; e, indiretamente, via a transmissão de patógenos, como *Babesia spp.* e *Anaplasma spp.* (Reck Junior, 2009).

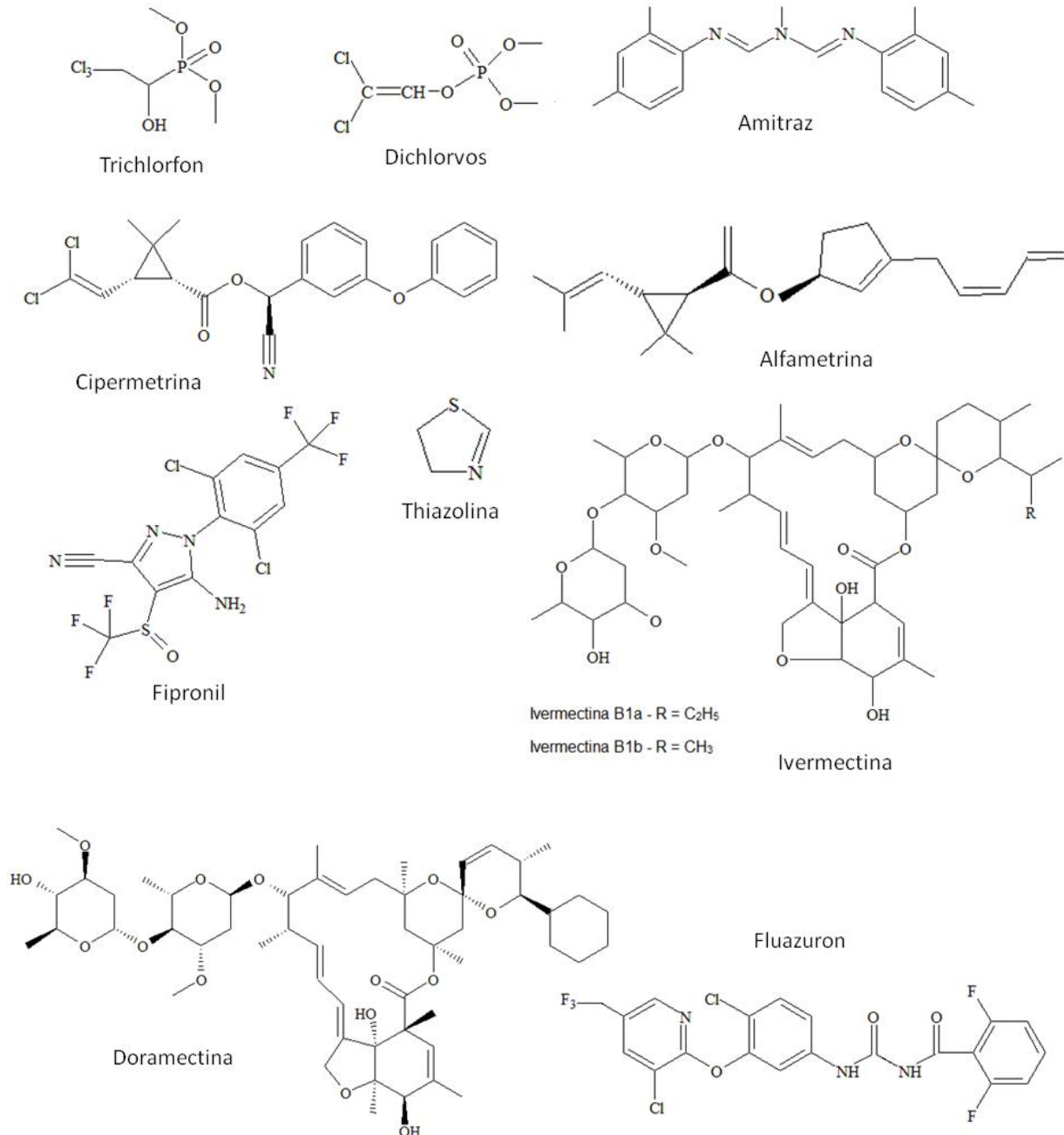
### 1.1 Métodos de controle de carrapatos

O controle do *R. microplus* se processa quase que exclusivamente pela utilização de produtos químicos durante a sua fase parasitária, o que corresponde a apenas 5% do total da população de carrapatos numa propriedade (González, 2003).

A tentativa de controle na fase parasitária foi iniciada no século passado, com a aplicação de substâncias como azeite, parafina, petróleo, cal e tabaco, de forma absolutamente empírica, e a partir de 1895, na Austrália, foram utilizados compostos arsenicais, que passaram a ser empregados no Brasil na primeira década de 1900.

O desenvolvimento industrial propiciou a descoberta de novos grupos químicos e, atualmente no mercado, encontram-se os carrapaticidas que atuam por contato, como os fosforados (trichlorfon, dichlorvos), formamidinas (amitraz), piretróides (cipermetrina, alfamestrina), fenilpirazol (fipronil) e thiazolina, e os carrapaticidas sistêmicos, como as avermectinas (ivermectina, doramectina) e fluazuron, um inibidor do crescimento (Figura 1). A aplicação desses produtos é feita por meio de aspersão, imersão, dorsal (*pour-on*) ou injetável. Cada método apresenta suas vantagens e desvantagens e a escolha depende, dentre outros

fatores, da região geográfica, tipo de criação, manejo e número de animais (Gomes, 1998; Thiesen, 1973).



**Figura 1.** Carrapaticidas comumente utilizados.

Os produtos químicos convencionais usados no controle efetivo de parasitos apresentam dois grandes problemas: o desenvolvimento acelerado da resistênci

os resíduos nos produtos de origem animal que têm provocado preocupação na sociedade e órgãos governamentais. O uso inadequado e exagerado de vermífugos, carrapaticidas e outros, faz com que o problema dos resíduos se acentue, alarmando a sociedade consumidora (Chagas, 2004). Estes dois pontos têm determinado efetivamente o rumo atual das pesquisas científicas na área da parasitologia.

A escolha de um produto comprovadamente eficaz e a racionalização do manejo são importantes e, para isso, deve-se assegurar a inexistência de resistência do carrapato ao produto utilizado. Nesse sentido, um teste de resistência denominado biocarrapaticidograma, é recomendado para a detecção da sensibilidade ou da resistência de teleóginas aos produtos carrapaticidas. Os resultados do biocarrapaticidograma são de aplicabilidade prática imediata, uma vez que a partir deles podem ser recomendadas alternativas mais eficientes (Cordovés, 1997).

A partir da necessidade de novos métodos de controle de *R. (B.) microplus* o desenvolvimento de vacinas economicamente viáveis para o combate do carrapato torna-se um desafio promissor. As vacinas são, sem dúvida, o método mais eficiente de profilaxia para as mais diversas epidemias. Além de ser um método relativamente barato de controle, a vacinação apresenta a vantagem de não deixar nenhum tipo de resíduo nos alimentos de origem animal (Guimarães *et al.*, 2001).

Como exemplo existe o antígeno recombinante BM86, uma glicoproteína de 89 kDa caracterizada a partir do intestino do carrapato (Gough *et al.*, 1993). Quando os carrapatos ingerem sangue de um animal imunizado com Bm86, as células intestinais do carrapato lisam através de mecanismos mediados por anticorpos de defesa do hospedeiro, provocando uma redução no número de carrapatos, peso e capacidade de reprodução (Kemp *et al.*, 1989). Uma vacina baseada em BM86 foi formulada como TickGARD na Austrália (Willadsen *et al.*, 1995) e como GAVACK em Cuba (Turnbull *et al.*, 1990).

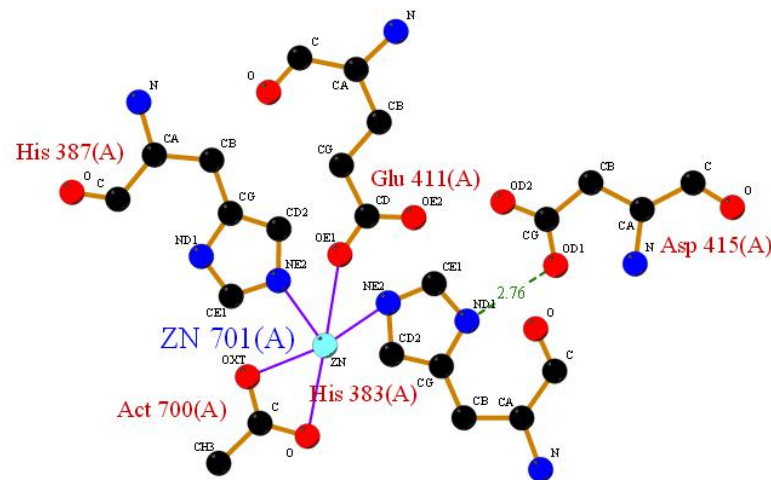
Baseado nessas observações, vários grupos de pesquisa exploram a possibilidade de proteger os animais pela indução de uma resposta imune contra proteínas do carrapato. Esses grupos de pesquisa estão engajados na tentativa de identificar novas proteínas que possam ser utilizadas para o desenvolvimento de novas vacinas capazes de induzir maior imunogenicidade do que os antígenos já

testados, através do uso de novas formulações e/ou pela incorporação de adjuvantes (Parizi *et al.*, 2009).

## 1.2 Enzima Conversora de Angiotensina (ECA) e ECA-like: Um potencial alvo terapêutico em invertebrados

Na literatura, são descritas classicamente duas formas de ECA humana: a somática e a testicular. São descritas ainda formas de ECA solúveis. A ECA somática (150-180 kDa) possui dois domínios catalíticos, N- e C- e pode ser encontrada em células endoteliais, epiteliais e neuronais (Bernstein *et al.*, 2013; Campbell, 1987). A ECA testicular ou germinal (90-110 kDa) é similar à subunidade C-terminal da ECA somática e é encontrada unicamente nos testículos, onde é expressa apenas durante a maturação na espermatogênese. A ECA solúvel é detectada no fluido ileal, seminal, na urina e no líquido amniótico (Ilgic e Behnia, 2003).

A Enzima Conversora de Angiotensina-I (ECA) é uma zinco metalopeptidase. As metalopeptidases apresentam um cátion divalente, geralmente um íon  $Zn^{+2}$ , que é responsável pela ativação da molécula de água catalítica. Este íon metálico, na maioria dos casos, coordena com três resíduos de aminoácidos que podem ser: His, Glu, Asp ou Lys. Além destes, pelo menos outro aminoácido é requerido para a catálise, geralmente outro resíduo de ácido glutâmico (Figura 2). A maioria das zinco metalopeptidases contém um único cátion em seu sítio ativo, apesar de existirem algumas famílias de enzimas nas quais dois íons  $Zn^{+2}$  são co-catalíticos (Barrett e Rawlings, 1994). O íon  $Zn^{+2}$  é um componente importante na catálise da ECA e, em parte, responsável pela força de ligação entre a ECA e seus inibidores. A inativação completa da enzima foi observada em estudos em que foram realizadas mutações de resíduos de coordenação de metais em ECA humana, fornecendo evidências para o papel relevante do íon zinco na atividade da ECA (Pina e Roque, 2008).



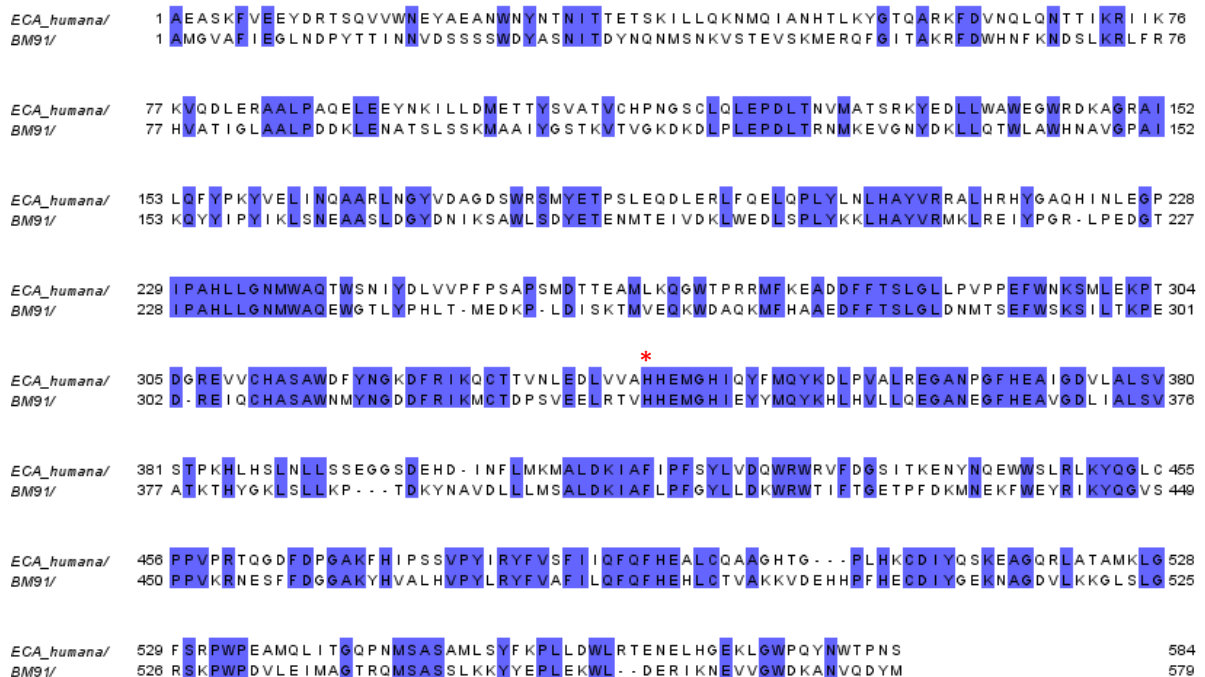
**Figura 2.** Zinco coordenando com os aminoácidos His383, His387, Glu411 e Asp415 na ECA humana.

Estudos mais recentes demonstraram a presença de dois sítios ativos denominados de domínio N e domínio C, que se referem, respectivamente, as subunidades *N*- e *C*- terminais da ECA humana (Wei *et al.*, 1991). Apesar do alto percentual de identidade entre os resíduos de aminoácidos, particularmente na região do sítio ativo, estes domínios apresentam diferenças na especificidade por substratos e em seus perfis de inibição e desnaturação (Rousseau *et al.*, 1995).

A ECA humana realiza uma clivagem do dipeptídeo *C*-terminal da Angiotensina-I (Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe-His-Leu), gerando o potente vasoconstritor Angiotensina-II (Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe) (Fernandez *et al.*, 2003). A ECA desempenha um papel fundamental na circulação, bem como na regulação local que existe em tecidos, como o miocárdio (Natesh *et al.*, 2004), além de ser um importante componente do sistema Renina-Angiotensina-Aldosterona. Sua ação clássica neste sistema compreende a conversão do peptídeo inativo Angiotensina-I no potente vasoconstritor Angiotensina-II, que por sua vez estimula a liberação do hormônio esteróide aldosterona do córtex da glândula adrenal, ocasionando a retenção de sódio e desempenhando papel fundamental na manutenção da pressão sanguínea e na homeostase hidroeletrólítica em humanos (Henriques *et al.*, 2003).

Recentemente, foi identificada pelo grupo da Professora Glória Braz, no Laboratório de Bioquímica de Vetores de Doenças (IQ-UFRJ) através de técnicas de

bioinformática uma possível sequência de ECA do carrapato *Rhipicephalus microplus* denominada BM91, a qual foi identificada pela primeira vez como um antígeno da vacina protetora do carrapato *Boophilus microplus* (Jarmey *et al.*, 1995), e observou-se que a mesma possui 43% de identidade com a ECA humana e apresentou o *motif* HHEMGH conservado nos sítios catalíticos (Figura 3).



**Figura 3.** Alinhamento das sequências da ECA humana (Código no PDB: 1O8A) (Berman *et al.*, 2000; Natesh *et al.*, 2004) e da ECA-like de *Rhipicephalus microplus*, BM91. Os resíduos conservados estão em azul;\* *Motif* HHEMGH conservado nos sítios catalíticos.

Ligantes fisiológicos dessa ECA-like ainda não foram identificados no *R. microplus*, porém, comprovou-se experimentalmente a sua inibição de maneira dose-dependente por inibidores conhecidos de ECA humana, como o Captopril, Enalapril (Enalaprilato) e Lisinopril (Vieira, 2010), estes dados são indicativos de reconhecimento molecular análogo à ECA humana.

Dados genômicos recentes mostraram a presença hipotética de ortólogos da ECA em filos distantes, como *cnidaria*, *placozoa* e vários procariontos, além de protobactérias. Isso indica que as ECAs estão presentes desde bactérias a mamíferos e apresentam características moleculares, bioquímicas e estruturais extremamente conservadas, sugerindo que esta enzima evoluiu há muito tempo, a partir de uma peptidase ancestral (Macours *et al.*, 2004; Rivière, 2009).

ECAs-*like* foram clonadas e sequenciadas a partir de alguns insetos, incluindo a mosca do chifre (*Haematobia irritans exigua*) (Wijffels *et al.*, 1996) e *Drosophila melanogaster* (Cornell *et al.*, 1995). Em todos os casos, trata-se de uma enzima de domínio único, com maior similaridade com o domínio C da ECA somática do que com o domínio N (Houard *et al.*, 1998).

Em moscas hematófagas, o amadurecimento do sistema reprodutor masculino é dependente da primeira refeição de sangue. Alguns estudos mostraram que, 26 horas após a primeira alimentação de sangue, a expressão de ECA foi detectada no sistema reprodutor masculino de *Haematobia irritans exigua* em desenvolvimento. A expressão no sistema reprodutor masculino foi detectada 2 horas após a primeira alimentação e persistiu depois (Wijffels *et al.*, 1996), o que aponta para um novo papel na maturação das células de esperma.

*Drosophila melanogaster* expressa duas enzimas conversoras de angiotensina (ECAs) distintas, denominadas AnCE e ACEr, as quais apresentam um alto nível de similaridade entre suas estruturas primárias. Em um estudo, onde foram medidas separadamente as atividades da AnCE e ACEr durante o desenvolvimento pupal da *D. melanogaster*, foi demonstrado que altos níveis de atividade da ECA são expressos e que a ACEr e AnCE são alternativamente expressas durante este processo (Houard *et al.*, 1998). A ECA parece estar envolvida também no processo de metamorfose. Isto é sugerido pelas observações de que a atividade da ECA é fortemente aumentada antes e durante o desenvolvimento da pupa de *D. melanogaster* (Wilson *et al.*, 2002).

Um estudo recente mostrou a redução na fecundidade de mosquitos *Anopheles stephensi* após o tratamento com inibidores de ECA humana Captopril e Lisinopril. Tais efeitos estão relacionados à redução na ovoposição. Esses dados mostram a importância de peptídeos reguladores na fecundidade desses insetos (Ekbote *et al.*, 2003). Em outro estudo foi relatada a presença de ECA em mosquitos fêmeas do gênero *Anopheles stephensi*, e que a enzima é induzida por uma refeição de sangue. A ECA se acumula no desenvolvimento dos ovários e passa para os ovos de mosquitos, em que pode desempenhar um papel no metabolismo de peptídeos durante a embriogênese. A ECA ovariana tem massa molecular de 70 kDa e é inibida pelo Captopril e Lisinopril, com valores de concentração inibitória (IC<sub>50</sub>) de 0,1 µM e 0,6 µM, respectivamente (Ekbote *et al.*, 1999).



A existência de homólogos dessas enzimas, também, em invertebrados, reforça a hipótese de conservação durante a evolução. A maioria dos invertebrados não possui um sistema circulatório fechado, sendo desnecessária a presença de reguladores da pressão sanguínea. Portanto, estes organismos representam modelos excelentes para a melhor compreensão do papel fisiológico destas enzimas (Macours *et al.*, 2004). Ribeiro e Mather identificaram uma carboxipeptidase ECA-*like* em *Ixodes scapularis*, em um dos relatos pioneiros de uma enzima deste tipo em aracnídeos (Ribeiro e Mather, 1998).

A ECA-*like* BM91 tem regiões com similaridade na sequência de aminoácidos com carboxidipeptidases de mamíferos. Carboxidipeptidases atuam na extremidade carboxi-terminal livre e liberam dois resíduos de aminoácidos (Oliveira, 2011). Alguns estudos demonstraram que esta proteína partilha muitas propriedades bioquímicas e enzimáticas com carboxidipeptidases de mamíferos (Jarmey *et al.*, 1995). Comparações com enzimas de mamíferos não fornecem pistas imediatas sobre a função da ECA em insetos, já que os mesmos não possuem sistema circulatório fechado, e peptídeos que estão estruturalmente relacionados à ECA de mamíferos (Angiotensina-I, Bradicinina e *N*-acetil-Ser-Asp-Lys-Pro) não foram encontrados nos seus tecidos. Porém, existem evidências de que a ECA possui um papel vital no crescimento e desenvolvimento dos insetos devido aos efeitos causados por inibidores desta enzima e também com a descoberta do fenótipo letal de duas ECAs mutantes em *Drosophila melanogaster* (Lamango *et al.*, 1997; Tatei *et al.*, 1995).

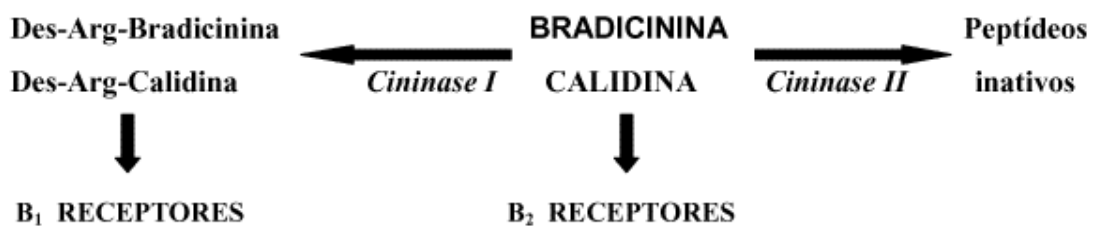
### 1.2.1 Inibidores da Enzima Conversora de Angiotensina (IECAs)

A Enzima Conversora de Angiotensina é uma cininase responsável pela degradação das cininas, como a Bradicinina (BK), que são vasodilatadoras. A ECA (cininase-II) é responsável pela síntese da Angiotensina-II, o produto final da cascata Renina-Angiotensina. Os inibidores da Enzima Conversora de Angiotensina (IECAS), utilizados no tratamento clínico da hipertensão arterial sistêmica, da insuficiência cardíaca congestiva e da nefropatia diabética, possuem dois mecanismos de ação distintos: bloqueiam simultaneamente a síntese da Angiotensina-II e inibem a degradação das cininas (Ramalho, 2000).

As cininas são rapidamente inativadas por enzimas extremamente potentes (cininases-I e II), distribuídas pelos tecidos e no plasma, de forma que sua meia-vida é extremamente curta. A cininase-I, presente no sangue, é responsável por 90% da metabolização das cininas plasmáticas, resultando na formação de metabólitos biologicamente ativos (des-Arg-Bradicinina e des-Arg-Calidina). A cininase-II, localizada na superfície das células endoteliais pulmonares, é responsável pela degradação das cininas a peptídeos inativos, e constitui-se na mesma enzima que converte a Angiotensina-I em Angiotensina-II. A degradação pulmonar pela cininase-II é significativamente mais rápida, visto que 80-95% da atividade biológica da Bradicinina é perdida durante sua passagem pelo leito vascular pulmonar. A Bradicinina é o melhor substrato natural para a cininase-II (Regoli *et al.*, 1980).

Em um trabalho recente observou-se que agentes capazes de interagir nos centros ativos da enzima com grande afinidade, tais como os inibidores da ECA, podem incrementar os efeitos endógenos da Bradicinina através de atuação no nível do receptor B<sub>2</sub>, independentemente do bloqueio da inativação enzimática (Ramalho, 2000).

A fração das cininas que escapa à inativação irá interagir com receptores (B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub>) localizados na superfície das células-alvo. A grande maioria das ações das Cininas é mediada pelo receptor B<sub>2</sub>, o qual é encontrado numa ampla variedade de tecidos, incluindo a musculatura lisa vascular e as células endoteliais. O receptor B<sub>2</sub> é caracterizado por sua elevada afinidade pela Bradicinina. Os receptores B<sub>1</sub> caracterizam-se por maior afinidade pelos metabólitos da Cininase-I (des-Arg-Bradicinina e des-Arg-Calidina), e por apresentarem distribuição limitada em tecidos normais, estando presentes em determinadas condições patológicas (Figura 4) (Regoli *et al.*, 1980).



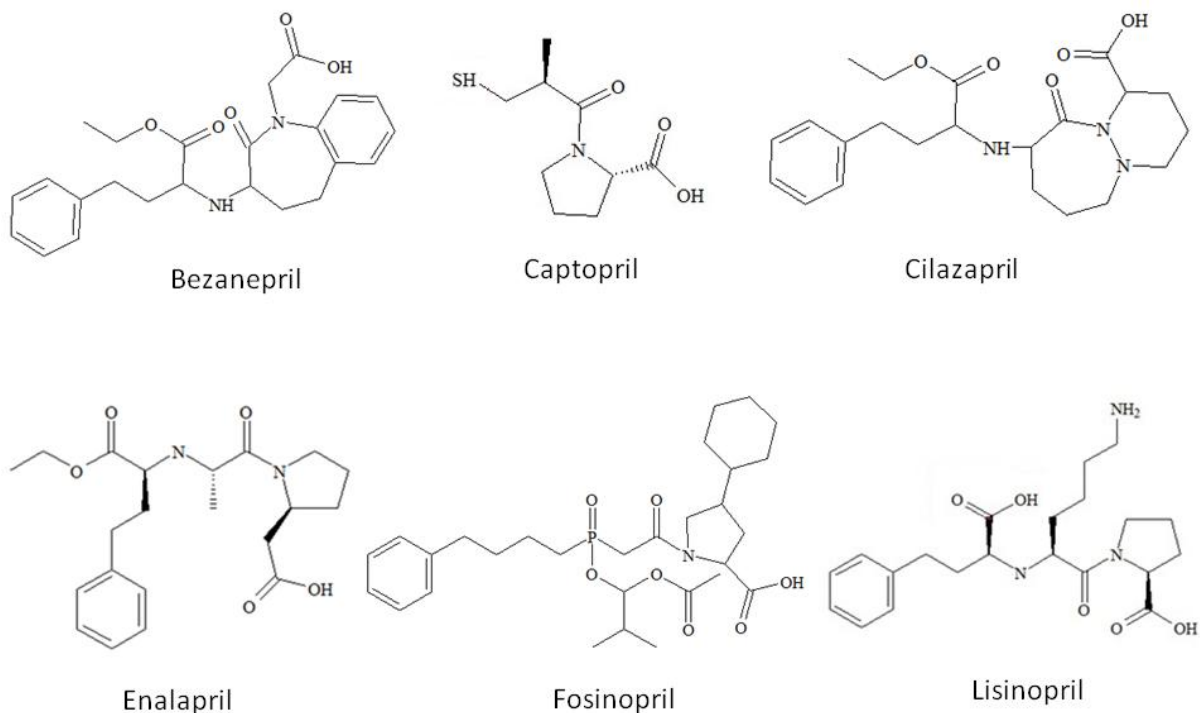
**Figura 4.** Esquema ilustrativo da degradação pelas Cininases-I e II, e ação nos receptores B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub> e seus agonistas. (Adaptado de Ramalho, 2000)

Os peptídeos potenciadores de bradicinina (BBP's) foram os primeiros inibidores da Enzima Conversora de Angiotensina (IECAs) de ocorrência natural descritos, a partir do veneno da serpente *Bothrops jararaca*. Posteriormente foram utilizados na primeira demonstração clínica no controle da hipertensão humana (Collier *et al.*, 1973). Ferreira e colaboradores (1965) mostraram que o veneno dessa serpente brasileira continha peptídeos que aumentavam as atividades contráteis do músculo liso. Durante um experimento no qual testavam a habilidade do veneno da *Bothrops jararaca* em potencializar a atividade espasmogênica da bradicinina na preparação isolada de íleo de cobaio, eles demonstraram que o veneno propriamente dito não somente gerava bradicinina, mas também, reforçava o seu efeito hipotensor através da formação de peptídeos potenciadores de bradicinina (BK).

Stewart e colaboradores (1971) observaram que a atividade hipotensora e a potenciação de BK pelo BPP da *Bothrops jararaca* BPP-9a, foi uma consequência da inibição da Enzima Conversora de Angiotensina somática (ECA) observada em experimentos *in vivo*. Esse experimento mostrou que o BPP-9a bloqueava a degradação de bradicinina e a inibição da conversão de Angiotensina-I em Angiotensina-II, sendo, portanto, caracterizados como inibidores naturais da ECA. O uso clínico do nonapeptídeo (BPP-9a) foi impedido, pois não possuía atividade por via oral para aplicação terapêutica (Ondetti *et al.*, 1981). O BPP-5a foi posteriormente utilizado como protótipo molecular para a síntese do primeiro inibidor de ECA, o Captopril (Aiken *et al.*, 1970; Stewart *et al.*, 1971; Fernandez *et al.*, 2004; Biondo *et al.*, 2006; lanzer *et al.*, 2007).

A partir do reconhecimento do potencial terapêutico da inibição da ECA e de sua estrutura molecular, uma série de inibidores da ECA potentes e ativos por via oral foi desenvolvida e usada na prática médica nos últimos 15 anos.

Diversos inibidores da ECA com aplicação clínica já foram descritos como: Bezanepiril, Captopril, Cilazapril, Enalapril, Fosinopril e Lisinopril (Figura 5).



**Figura 5.** Inibidores da ECA.

Eles diferem quanto à capacidade em se ligar ao átomo de zinco no sítio ativo; alguns são pró-fármacos, ésteres de compostos ativos que são mais lipossolúveis o que faz com que tenham absorção maior e mais rápida. A maior parte apresenta eliminação renal excetuando-se o fosinopril, além de apresentar alta relação “trough/peak” (vale-pico), o que os conferem como de administração única diária excetuando-se o Captopril, que deve ser administrado no mínimo duas vezes ao dia e o Enalapril, que também, por vezes, deve ser administrado duas vezes ao dia (Oigman *et al.*, 1998) (Quadro 1).

Esse índice, que é comumente usado no início da avaliação de novos fármacos, é uma das contribuições teóricas mais atrativas nos últimos anos em matéria de tratamento clínico da hipertensão. O trough/peak de uma droga anti-hipertensiva é simplesmente a relação aritmética entre redução da pressão arterial obtida no final do intervalo de dosagem (imediatamente antes de ingerir a nova dose) no que diz respeito à redução máxima da substância após a administração. Isto é, para um fármaco que é administrado diariamente numa dose única às oito horas da manhã, é a relação entre a pressão do sangue obtido no final do intervalo de 24 horas, às oito horas da manhã seguinte e imediatamente antes de mais uma

dose de droga que (efeito vale ou trough), no que diz respeito à redução máxima alcançada após a administração (efeito de pico ou peak) (Mora-Maciá, 1996).

**Quadro 1.** Características dos inibidores da Enzima Conversora de Angiotensina-I.

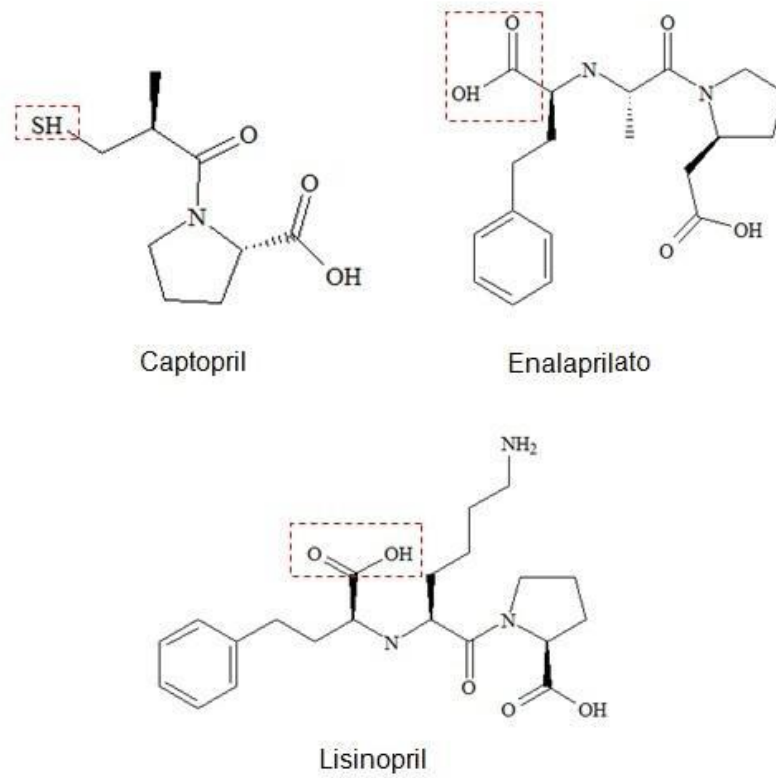
<b>Fármaco</b>	<b>Ligação ao zinco</b>	<b>Pró-fármaco</b>	<b>Via de eliminação</b>	<b>Duração de ação (horas)</b>	<b>Dose (mg)</b>
Benazepril	Carboxila	Sim	Renal	24 +	10-40
Captopril	Sulfidrila	Não	Renal	6-10	25-150
Cilazapril	Carboxila	Sim	Renal	24+	2,5-5,0
Enalapril	Carboxila	Sim	Renal	18-24	5-40
Fosinopril	Fosforila	Sim	Renal- hepática	24+	10-40
Lisinopril	Carboxila	Não	Renal	18-24	5-40

Os IECAS representam a classe de fármacos que possibilita um aumento da qualidade e da expectativa de vida dos pacientes que os utilizam. Entretanto, os efeitos indesejáveis incluem tosse induzida pelo aumento da bradicinina (que pode ser atenuada usando-se sulfato ferroso), diminuição do apetite, alterações hematológicas leves e, principalmente, rash cutâneo. Porém, são os medicamentos de primeira escolha nos portadores de hipertensão arterial sistêmica (HAS) associada à hiperinsulinemia, diabetes e doença coronariana. Estes são indicados em pacientes hipertensos diabéticos, graças aos efeitos benéficos na prevenção da glomeruloesclerose progressiva, e porque não alteram o metabolismo de carboidratos. O papel dos IECAS é conhecido no agravamento da anemia em doentes com insuficiência renal crônica (IRC) não submetidos a tratamento com eritropoetina (EPO), já que há possibilidade das IECAS induzirem um aumento das necessidades de eritropoetina nos pacientes com insuficiência renal crônica em hemodiálise (HD) (Borges *et al.*, 2010).

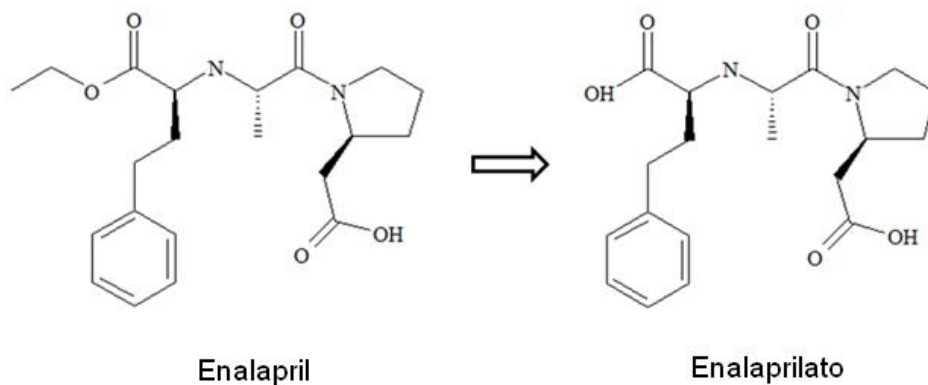
Os inibidores da ECA também são de primeira escolha nos pacientes hipertensos que não sejam negros ou idosos. Nestes pacientes esses fármacos devem ser evitados, pois apresentam uma ação terapêutica insatisfatória. Esse fenômeno se deve ao polimorfismo genético da ECA e do angiotensinogênio plasmático. Os IECAS são aparentemente menos eficazes na redução da pressão

arterial em pacientes negros, do que em pacientes não negros. Isso ocorre, possivelmente, devido a uma maior prevalência de níveis plasmáticos reduzidos de renina na população negra hipertensa. Também são contraindicados durante o 2º e 3º trimestres de gravidez devido ao risco de hipotensão fetal, anúria e insuficiência renal algumas vezes associados à má-formação fetal e morte (Borges *et al.*, 2010).

Captopril, Enalapril (Enalaprilato), e Lisinopril, como dito anteriormente, são fármacos usados no tratamento da hipertensão arterial. Estudos de cristalografia e difração de raios-X dos fármacos Captopril (Natesh *et al.*, 2004, Código do PDB 1UZF), Enalapril (Enalaprilato) (Natesh *et al.*, 2004, Código do PDB 1UZE) e Lisinopril (Natesh *et al.*, 2003, Código do PDB 1O86) complexados com a ECA já foram obtidos e revelaram que esses inibidores fazem interação direta com o sítio catalítico do zinco, existente na ECA, através dos grupos tiol no caso do Captopril e carboxilato no caso do Enalaprilato e do Lisinopril (Natesh *et al.*, 2004) (Figura 6). O Enalapril é um pró-fármaco, ou seja, após a administração oral, o mesmo é convertido em Enalaprilato através da hidrólise de seu grupamento éster etílico ao ácido carboxílico (Figura 7) por enzimas esterases do sangue. O Enalaprilato é considerado a forma ativa do fármaco. No entanto, o Enalapril é preferível ao Enalaprilato em formas farmacêuticas orais devido à sua maior absorção no trato gastrointestinal (IP *et al.*, 1987). Adicionalmente, estruturas cristalográficas de ECA de *Drosophila melanogaster* em complexo com inibidores conhecidos de ECA humana como o Captopril e outros inibidores peptídicos e peptídeo-*like* inovadores foram descritas, sendo modelos excelentes para o desenho de novos inibidores (Akif *et al.*, 2010).



**Figura 6.** Inibidores da Enzima Conversora de Angiotensina-I. Destaque para os grupamentos que fazem interação com o zinco na ECA humana.



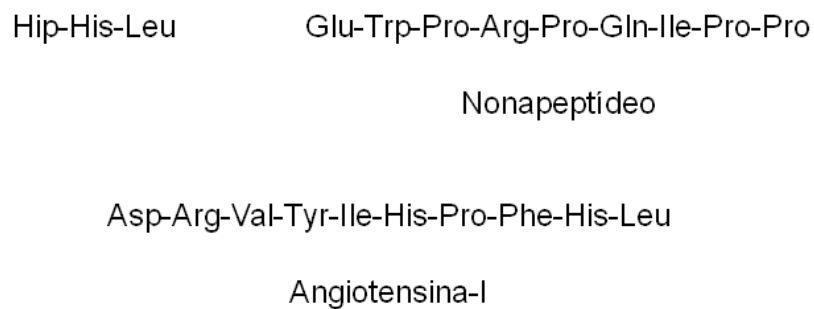
**Figura 7.** Conversão do Enalapril a Enalaprilato através da hidrólise de seu grupamento éster etílico ao ácido carboxílico.

### 1.2.2 Peptídeos com ações na ECA

Foi demonstrado na literatura que ambos os domínios N e C da ECA humana são, de fato, enzimaticamente ativos, uma vez que cada um remove o dipeptídeo C-

terminal de Hip-His-Leu (Figura 8), que é um substrato natural da ECA testicular e Angiotensina-I (Figura 8), que é o substrato principal, com um átomo de zinco como co-fator. Também foi demonstrado que o domínio C pode ter propriedades catalíticas mais elevadas do que o domínio N para estes dois substratos (Jaspard *et al.*, 1993).

Já a BM91 é inibida por dois inibidores bem caracterizados das enzimas de mamíferos, sendo eles o Captopril e um nonapeptídeo inibidor de ECA de pulmão de mamífero. Tal inibição ocorre em gamas de concentração semelhantes aos fármacos eficazes em as enzimas de mamíferos. No entanto, os substratos naturais da enzima do carrapato são desconhecidos. Estudos realizados com a ECA-*like* BM91 para observar seu comportamento diante de peptídeos (Figura 8) mostraram que a Angiotensina-I é um substrato fraco e o nonapeptídeo inibidor de ECA de pulmão de mamíferos inibiu a proteína BM91 com um  $K_i$  de 7  $\mu\text{M}$  (Jarmey *et al.*, 1995).



**Figura 8.** Estruturas do substrato natural Hip-His-Leu, do nonapeptídeo inibidor de ECA de pulmão de mamíferos e do substrato natural Angiotensina-I.

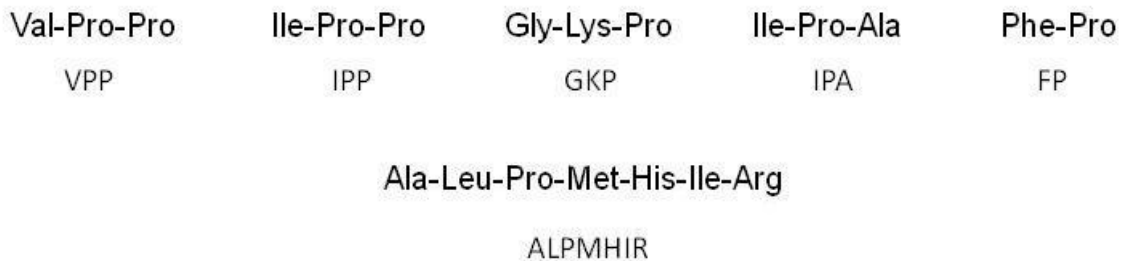
Nos últimos anos, a busca por componentes naturais em alimentos, com potenciais efeitos profiláticos e terapêuticos tem recebido um grande interesse dos pesquisadores. Peptídeos bioativos estão incluídos nesta categoria, exibindo efeitos anti-hipertensivo, antioxidante, antitrombótico, opióide, antimicrobiano e com propriedades imunomoduladoras (Pan *et al.*, 2011).

Nutracêuticos podem ser uma alternativa aos medicamentos comuns usados no tratamento de hipertensão. Peptídeos derivados do leite podem ser obtidos durante o processamento de alimentos por meio de tratamentos químicos, físicos e enzimáticas. Este último pode ser realizado através da ação de enzimas proteolíticas durante a fermentação do leite ou a hidrólise enzimática de proteínas do leite *in vitro*. Hidrolisados de proteínas de leite integral, caseinatos, proteínas do soro e frações



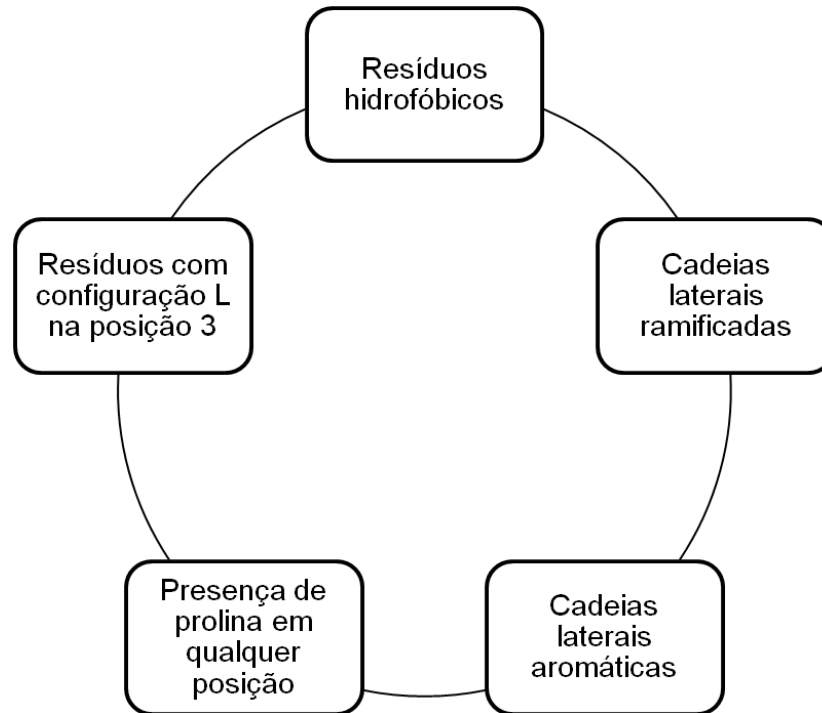
enriquecidas em proteínas do leite individuais são uma boa fonte de peptídeos bioativos do leite e, em especial, os peptídeos inibidores da ECA. Nessa categoria podemos incluir os peptídeos VPP, IPP, ALPMHIR, IPA, FP e GKP (Figura 9), que são peptídeos com efeito anti-hipertensivo importante para a homeostase cardiovascular devido a sua inibição da ECA (Pina e Roque, 2008; Pan *et al.*, 2011).

A proteína do leite é conhecida por ser uma fonte rica em peptídeos bioativos em comparação com outras fontes de proteínas, tais como animais (incluindo peixes), trigo e proteínas de soja. Entre os peptídeos bioativos, os peptídeos anti-hipertensivos têm sido extensivamente pesquisados (Pan *et al.*, 2011).



**Figura 9.** Estrutura dos peptídeos alimentícios inibidores da ECA.

Alguns estudos recentes revelaram que existem características estruturais desejáveis que devem estar presentes nos peptídeos para os mesmos se tornarem bons candidatos à inibição da ECA (Figura 10). Esses estudos são uma ferramenta importante para o desenho de candidatos a inibidores de ECAs de outros organismos também como do carrapato *Rhipicephalus microplus* por exemplo, com atuação no sítio catalítico, devido à alta identidade na sequência de aminoácidos entre as ECAs de diversos organismos (Mizuno *et al.*, 2004).



**Figura 10.** Características estruturais para bons candidatos à inibição da ECA (Adaptado de Mizuno *et al.*, 2004).

### 1.3 Modelagem molecular

Modelagem molecular, segundo a IUPAC, é a investigação das estruturas e das propriedades moleculares pelo uso de química computacional e técnicas de visualização gráfica, visando fornecer uma representação tridimensional, sob um dado conjunto de circunstâncias (Carvalho, 2003).

A modelagem molecular constitui-se em ferramenta do planejamento racional envolvendo a compreensão da interação ao nível molecular de uma substância com seu receptor, sob os pontos de vista qualitativo e quantitativo. Permite que se analise profundamente, não só a estrutura molecular compreendida em determinado sistema biológico, como também fornece meios para prever a potencialidade de moléculas candidatas a compostos bioativos. De forma simplificada, pode ser considerada como um conjunto de técnicas computadorizadas baseadas em métodos de química teórica e/ou dados experimentais (Cohen, 1996).

Existem muitas opções quanto ao método de cálculo a ser aplicado em uma determinada estratégia de modelagem molecular. Estes métodos basicamente diferem quanto à natureza do campo de força, ou seja, do conjunto de funções de

energia e parâmetros numéricos associados. Os campos podem ser totalmente empíricos, como os utilizados em mecânica molecular, ou, no outro extremo, puramente teóricos (métodos *ab initio*), passando pelos chamados métodos semi-empíricos. A aplicação de um ou outro método é determinada pelo compromisso entre tempo e precisão dos resultados e pela complexidade do sistema a ser analisado (Cohen *et al.*, 1990).

Os métodos computacionais estão integrados ao planejamento de fármacos. O seu emprego nos estudos em química medicinal vão desde a identificação, seleção e otimização de moléculas candidatas a fármacos até a proposição de novas entidades químicas para uso clínico. A integração desses métodos ao trabalho químico e biológico experimental é um requerimento essencial para a geração de novas moléculas bioativas qualificadas, com propriedades múltiplas otimizadas (Jónsdóttir *et al.*, 2005).

A modelagem da estrutura molecular por métodos computacionais surgiu como uma alternativa, especialmente após o desenvolvimento de programas capazes de calcular a estrutura com um compromisso adequado entre velocidade e precisão, somadas aos recursos da computação gráfica e à crescente diminuição dos custos de máquinas de alto desempenho capazes de operar estes programas e recursos (Lipkowitz *et al.*, 1990), visto que a nível experimental, o conhecimento da estrutura molecular de uma substância não é tarefa simples.

Não são muitos os métodos capazes de caracterizar completamente uma dada estrutura, permitindo sua descrição precisa em termos de distâncias e ângulos de ligação, além de ângulos de torção (ou ângulos diedro) que definem sua conformação. A cristalografia de raios-X é, uma técnica experimental muito eficiente para a obtenção destes dados, juntamente com a técnica de RMN (ressonância magnética nuclear). Limita-se, todavia, a substâncias em fase cristalina. Além disto, não há garantia de que a conformação no estado cristalino seja a mesma das moléculas em solução, ou ainda a geometria assumida no complexo fármaco-receptor na biofase. Já na técnica de RMN, há a possibilidade de descrição de processos dinâmicos e, com isso, detectarem-se diferentes conformações. Porém, limita-se ao tamanho da molécula, que tem que ser menor que 40kDa, ao contrário da técnica de cristalografia de raios-X, que não possui essa limitação (Martin *et al.*, 1994).

### 1.3.1 Técnica de *Docking* molecular

O ancoramento ou *docking* molecular é uma técnica computacional na qual se busca identificar a forma pela qual duas moléculas interagem entre si, geralmente um receptor e um ligante. O ancoramento geralmente considera o receptor-alvo como uma entidade rígida, isto é, sem liberdade de torção em suas ligações, de forma a reduzir o custo computacional do cálculo. O ligante, em contrapartida, pode ser tratado tanto de forma flexível quanto rígida, dependendo de sua complexidade (Yuriev *et al.*, 2009).

Durante o cálculo são geradas diversas orientações do ligante na região que define o sítio de ligação junto ao receptor-alvo. Estas orientações são ordenadas, de forma que a primeira orientação corresponda aquela com menor energia e, portanto, maior probabilidade de ocorrência (Yuriev *et al.*, 2009).

Como um método computacional, os cálculos de ancoramento molecular permitem a realização de análises de custo reduzido, suportando avaliações sistemáticas das interações ligante-receptor e a identificação de candidatos a protótipos de ligantes de acordo com a ordem das pontuações obtidas. Espera-se, assim, reduzir, tempo e recursos na busca por novos agentes terapêuticos. Adicionalmente, este tipo de abordagem permite o teste com um número extremamente elevado de compostos, quando não acessível em testes farmacológicos usuais, aumentando com isso as chances de obtenção de um candidato a ligante (Nargotra *et al.*, 2011).

## 2. Justificativa

Devido aos diversos danos econômicos acarretados pelo *R. microplus*, que atingem a ordem de um bilhão de dólares no Brasil, este se tornou o principal alvo de programas de controle e erradicação nos rebanhos da América do Sul (Nari, 1995). Um carrapato bovino suga, em média, de 2 a 3 mL de sangue do seu hospedeiro, o que reflete em grandes perdas na produção de leite e carne (Sutherst *et al.*, 1983) e danos no couro causados por reações inflamatórias nos locais de fixação do carrapato (Seifert *et al.*, 1968). Além disso, o *R. microplus* é um parasita que precisa obrigatoriamente passar por um período sobre o bovino, ingerindo substratos teciduais e principalmente sangue (Pereira, 1982), sendo um dos principais transmissores dos parasitas *Babesia bovis* e *Babesia bigemina*, causadores da piroplasmose bovina. Esta doença, popularmente conhecida como tristeza bovina, afeta gravemente o desenvolvimento do gado, podendo levá-lo à morte em poucos meses (McKosker, 1981).

Os métodos de controle de carrapatos tradicionais fazem uso de vários tipos de carrapaticidas químicos. Contudo, a aplicação destes carrapaticidas tem limitada eficácia na redução da infestação e frequentemente vem acompanhada por vários danos, incluindo a seleção de carrapatos resistentes ao carrapaticida, contaminação do ambiente, como também do leite e da carne com resíduos da droga. Além do mais, o desenvolvimento de novos carrapaticidas é um processo longo e de alto custo, o qual reforça a necessidade de novas alternativas para o controle da infestação (Graf *et al.*, 2004).

A descoberta de uma possível sequência de ECA do carrapato *Rhipicephalus microplus* (denominada BM91) no Laboratório de Bioquímica de Vetores de Doenças (IQ-UFRJ) abre um vasto caminho para o avanço no conhecimento da fisiologia do carrapato, haja vista, que não foi descrito ainda na literatura científica nenhum estudo com este tema, que envolve a descoberta potencial de ligantes peptídicos e não peptídicos candidatos a substratos da ECA de *R. microplus* ou inibidores com possível bioatividade para o controle químico ou desenvolvimento de vacinas contra o mesmo.

A partir destas análises estruturais abrem-se novas perspectivas no planejamento racional e descoberta de moléculas que possam ser utilizadas futuramente no controle da infestação em bovinos por carrapatos do tipo

*Rhipicephalus microplus*, o que pode representar uma inovação com alto valor econômico agregado.

### 3. Objetivos

#### 3.1 Objetivos Gerais

O objetivo desse projeto é estudar possíveis modos de ligação dos fármacos Enalaprilato, Lisinopril e Captopril, dos peptídeos Hip-His-Leu e nonapeptídeo e dos peptídeos de origem alimentar VPP, IPP, GKP, IPA, FP e ALPMHIR com a ECA-like (BM91) do carrapato *Rhipicephalus microplus* utilizando o *docking* molecular.

#### 3.2 Objetivos Específicos

Analisar possíveis modos de ligação e interações dos fármacos anti-hipertensivos inibidores da ECA (Enalaprilato, Captopril e Lisinopril), na enzima ECA-like do carrapato *Rhipicephalus microplus*, denominada BM91 e comparar com a interação na ECA humana.

Comparar a estrutura da ECA-like do carrapato *Rhipicephalus microplus* com a humana e o modo de ligação e interações com o substrato Hip-His-Leu.

Avaliar o modo de ligação e interações do nonapeptídeo inibidor da ECA humana, e dos peptídeos alimentícios VPP, IPP, IPA, FP, GKP e ALPMHIR com a ECA-like do carrapato *Rhipicephalus microplus* e comparar com a ECA humana.

## 4. Metodologia

### 4.1 Obtenção das Estruturas das Proteínas

A estrutura tridimensional da proteína-alvo desse trabalho, ECA-*like* do carrapato *Rhipicephalus microplus*, foi modelada no Laboratório de Bioquímica de Vetores de Doenças (IQ-UFRJ) pelo grupo da professora Glória Braz, através de técnicas de bioinformática.

A estrutura da ECA humana selecionada neste estudo para comparação com a ECA-*like* do carrapato *Rhipicephalus microplus* foi obtida no banco de dados de proteínas (Protein Data bank, PDB) (<http://www.rcsb.org/pdb/>) (Berman *et al.*, 2000) sem inibidor (Natesh *et al.*, 2004, código no PDB 1O8A).

### 4.2 Análise estrutural das proteínas-alvo e seus sítios ativos

As análises dos mapas de potencial eletrostático das estruturas da enzima ECA humana e ECA-*like*, BM91, foram realizadas utilizando o programa NOC 3.01 (Chen *et al.*, 2007).

As análises do volume dos sítios ativos da ECA humana e da ECA-*like*, BM91, foram realizadas utilizando o servidor Pocket Finder 10 (<http://www.modelling.leeds.ac.uk/pocketfinder/>).

### 4.3 Estudos de *docking* molecular na ECA humana e ECA-*like* BM91

Para os estudos iniciais de *docking*, foram selecionadas as moléculas Enalaprilato, Captopril e Lisinopril, inibidores da ECA humana (Figura 06). As moléculas foram desenhadas utilizando o programa Spartan'08 (Wavefunction Inc., 2008) e com o auxílio do servidor Chemicalize (<http://www.chemicalize.org/>), que indica os grupos ionizáveis de acordo com o pH. Com isso, as estruturas dos inibidores foram modeladas em suas formas ionizadas.

Além dos inibidores, foram utilizados peptídeos conhecidos por possuírem ação na ECA humana, incluindo um substrato natural, a Hip-His-Leu, um nonapeptídeo inibidor de ECA de pulmão de coelho e 6 peptídeos alimentícios. As estruturas do nonapeptídeo e do substrato, além dos peptídeos alimentícios VPP,



IPP, IPA, FP, GKP e ALPMHIR foram desenhadas também no programa Spartan'08 (Wavefunction Inc., 2008).

Depois de serem desenhadas, as moléculas passaram por uma análise conformacional e também otimização da geometria para estarem aptas para o estudo de *docking*.

A ECA humana utilizada foi a cadeia A da enzima em sua forma nativa com o íon zinco. A mesma foi preparada inicialmente com a extração das moléculas de água utilizando o programa WebLab Viewer Lite v4.0 (Accelrys, San Diego, CA) enquanto a ECA-like do carrapato *Rhipicephalus microplus* foi obtida por modelagem por homologia sendo adicionado o íon zinco a partir das coordenadas do mesmo na enzima humana obtida por alinhamento estrutural das duas enzimas.

Nos estudos de *docking* para a análise de possíveis modos de interação e a investigação das interações atômicas predominantes neste processo, foi aplicada a metodologia de *docking* do programa GOLD 4.1.2 (Verdonk *et al.*, 2003). O programa GOLD utiliza um algoritmo genético na busca de uma população de possíveis soluções utilizando operadores genéticos (mutações, cruzamentos e migrações) para obter uma população final, trabalhando com a otimização de uma função de *Fitness* pré-definida.

O uso desta função *Fitness* permite que o *docking* seja realizado com flexibilização dos ligantes e das hidroxilas da macromolécula. Desta forma, o programa GOLD opera com um método de ajuste do ligante ao sítio, considerando os aspectos conformacionais e de energia de interação entre o ligante e a macromolécula. A função pré-definida compreende quatro componentes: energia de ligação de hidrogênio do complexo receptor-ligante, energia de ligação de van der Waals, energia de ligação de hidrogênio intramolecular do ligante e energia de van der Waals interna do ligante (Jones *et al.*, 1995, 1997).

Nesta metodologia, foi utilizada a função GoldScore, que é otimizada para a predição de posições de ligação dos ligantes, baseada no campo de força Tripos 5.2 (Clark *et al.*, 1989). Além disso, nos cálculos de *docking* foi necessária a adição de hidrogênios na enzima e definiu-se um raio de 20 Å para a esfera de busca, ao redor do átomo de Zn como sítio receptor do ligante.

Para validar a metodologia foi realizada a técnica de *crossdocking* dos inibidores Captopril (Natesh *et al.*, 2004, Código do PDB 1UZF), Enalapril (Enalaprilato) (Natesh *et al.*, 2004, Código do PDB 1UZE) e Lisinopril (Natesh *et al.*,

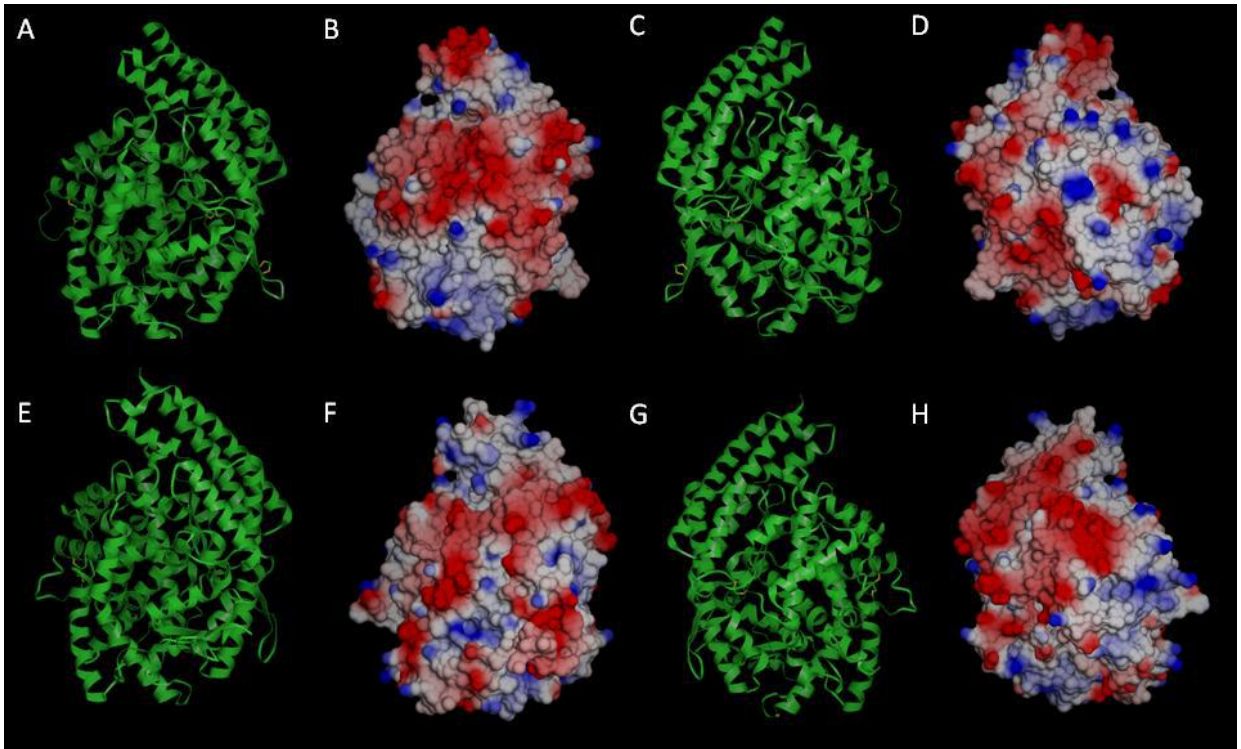
2003, Código do PDB 1O86). O procedimento para se obter a posição cristalográfica do ligante é frequentemente chamado de *redocking*, que é fundamentalmente um método de validação que determina se o algoritmo de *docking* molecular é capaz de recuperar a posição cristalográfica utilizando simulação computacional. Já o procedimento chamado "*crossdocking*" é bastante útil para validar ainda mais um protocolo de *docking*. Considerando que várias estruturas cristalográficas estão disponíveis para a mesma proteína, o *crossdocking* pode ser aplicado. Pode-se dizer que o *crossdocking* são vários *redockings*. Este procedimento envolve uma série de *dockings* de ligantes encontrados em uma variedade de cristais de uma proteína idêntica para uma conformação cristalográfica de uma única proteína rígida (Friesner *et al.*, 2004), ou seja, utiliza-se o inibidor de uma enzima, realiza-se o *docking* em outra enzima e compara-se com a primeira.

## 5. Resultados e Discussão

### 5.1 Análise estrutural das proteínas-alvo e de seus sítios ativos

A análise da estrutura tridimensional da estrutura secundária da ECA humana mostrou a presença de 22 alfa-hélices e seis folhas-beta (Figura 11.a e Figura 11.c). Já a análise da estrutura tridimensional da estrutura secundária da ECA-like de *Rhipicephalus microplus* mostrou a presença de 24 alfa-hélices e duas folhas-beta (Figura 11.e e 11.g) As duas enzimas possuem um íon Zn no sítio catalítico, e estudos indicam que as duas histidinas (HIS383 e HIS387) presentes no *motif* de ligação HEXXH na ECA humana, estão coordenando com o íon  $Zn^{+2}$ , bem como a GLU411 (Natesh *et al*, 2004).

Foi realizada também uma análise dos mapas de potencial eletrostático, que é propriedade de uma molécula obtida a partir da interação entre uma carga pontual unitária positiva representando um próton, e a molécula-alvo (Scalercio, 2010). A parte em vermelho no mapa significa a área mais negativa, e representa maior probabilidade de ataque eletrofílico, e em azul a área mais positiva, a qual representa maior probabilidade de ataque nucleofílico. Observou-se que a ECA humana apresentou uma variação de valores entre -1.04 e +1.04 (Figura 13.b e Figura 13.d). Em contrapartida, a ECA-like BM91 apresentou uma variação de valores entre -1.14 e +1.14 (Figura 13.f e Figura 13.h). Esses dados sugerem que a ECA-like apresenta regiões com maior e menor densidade eletrônica, em comparação com a ECA humana. A vista frontal da superfície de potencial eletrostático da ECA humana mostra que a mesma possui regiões mais negativas em comparação com a ECA-like. Já na vista posterior, a ECA humana demonstra mais regiões positivas.



**Figura 11. a)** Vista frontal da estrutura em 3D da ECA humana. **b)** Vista frontal da Superfície de Potencial Eletrostático da ECA humana. **c)** Vista posterior da estrutura 3D da ECA humana. **d)** Vista posterior da Superfície de Potencial Eletrostático da ECA humana **e)** Vista frontal da estrutura 3D da ECA-*like* BM91. **f)** Vista frontal da Superfície de Potencial Eletrostático da ECA-*like* BM91. **g)** Vista posterior da estrutura 3D da ECA-*like* BM91. **h)** Vista posterior da Superfície de Potencial Eletrostático da ECA-*like* BM91.

Para a análise da superfície de potencial eletrostático do sítio ativo, foram selecionados resíduos ao redor dos resíduos do sítio ativo (HHEMGGH) (Tabela 2).

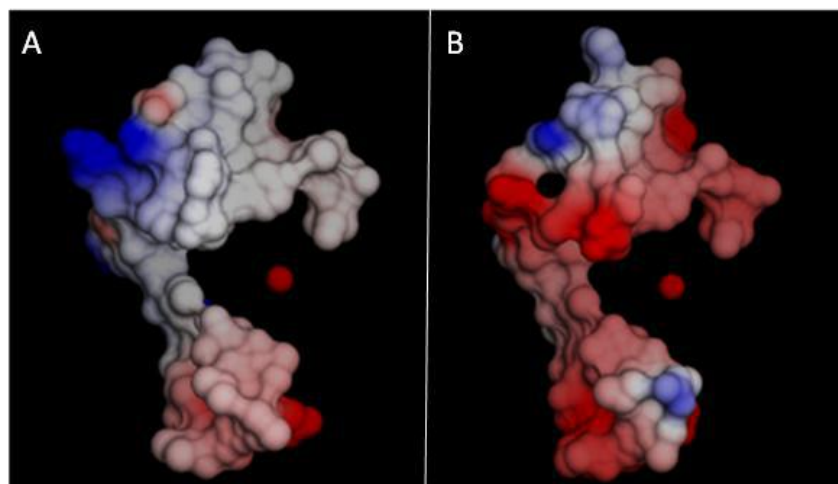
**Tabela 2.** Resíduos selecionados para a análise da superfície de potencial eletrostático dos sítios ativos da ECA humana e a BM91. Em destaque os resíduos de aminoácidos não conservados.

<b>ECA humana</b>	<b>ECA-like</b>
THR371	THR326
<b>THR372</b>	<b>ASP327</b>
VAL373	PRO328
ASN374	SER329
LEU375	VAL330
GLU376	GLU331
ASP377	GLU332
LEU378	LEU333
<b>VAL379</b>	<b>ARG334</b>
<b>VAL380</b>	<b>THR335</b>
ALA381	VAL336
HIS382	HIS337
HIS383	HIS338
GLU384	GLU339
MET385	MET340
GLY386	GLY341
HIS387	HIS342
ILE388	ILE343
<b>GLN389</b>	<b>GLU344</b>
TYR390	TYR345
<b>PHE391</b>	<b>TYR346</b>
MET392	MET347
GLN393	GLN348
TYR394	TYR349
LYS395	LYS350
<b>ASP396</b>	<b>HIS351</b>
LEU397	LEU352
<b>PRO398</b>	<b>HIS353</b>
VAL399	VAL354
ALA400	LEU355
LEU401	LEU356

Com isso, observou-se que o sítio ativo da ECA humana apresentou uma variação de valores entre -0.83 e +0.83. Em contrapartida, a ECA-like BM91 apresentou uma variação de valores entre -1.07 e +1.07 (Figura 15). Isso corrobora a suposição pela análise geral anterior de que o sítio ativo da ECA-like apresenta regiões de maior e menor densidade eletrônica, em comparação com o da ECA humana. Podemos observar também, que o sítio ativo da ECA humana mostra-se mais neutro em comparação ao sítio ativo da ECA-like, o qual demonstra estar mais negativo, representando melhor probabilidade de ataque eletrofílico ou interação

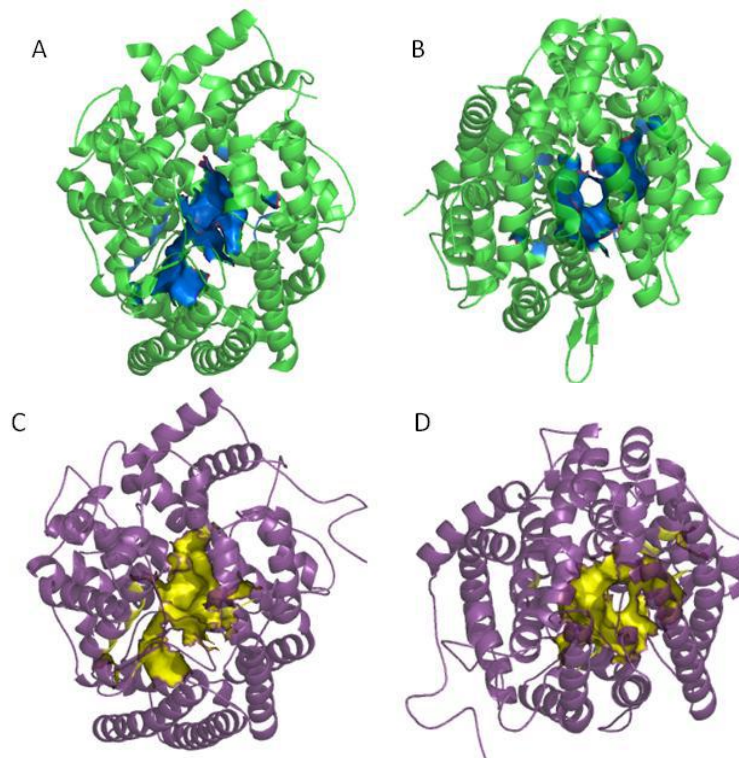
com substratos/ligantes que possuam grupos que podem estar ionizados, com carga positiva.

A maioria dos resíduos estão conservados na ECA BM91, porém, foram observadas substituições de resíduos de aminoácidos nas posições correspondentes entre a ECA humana e a ECA-*like* que estão destacadas na Tabela 2. O resíduo THR372, que é polar, foi substituído pelo resíduo ácido ASP327. Os resíduos de aminoácidos VAL379, VAL380 e a PRO398 na ECA humana, são resíduos apolares, enquanto que na ECA-*like* são substituídos pelos resíduos básicos ARG334, HIS353 e o resíduo polar THR335. Já os resíduos polares GLN389 e ASP396 na ECA humana, foram substituídos pelos resíduos GLU344 e HIS351, ácido e básico, respectivamente. Além do resíduo apolar PHE391 ter sido substituído pelo resíduo polar TYR346.



**Figura 12.** a) Superfície de Potencial Eletrostático do sítio ativo da ECA humana. b) Superfície de Potencial Eletrostático do sítio ativo da ECA-*like*, denominada BM91.

As análises dos sítios ativos da ECA humana e da ECA-*like* BM91, demonstraram que o volume do sítio ativo da BM91 ( $6592 \text{ \AA}^3$ ) se mostrou maior em comparação com o da ECA humana ( $5355 \text{ \AA}^3$ ) (Figura 16). Esse dado sugere que moléculas grandes como os peptídeos ALMHIR e nonapeptídeo devem possuir melhor encaixe, devido ao maior espaço disponível na ECA-*like*.



**Figura 13.** **a)** Vista frontal do sítio ativo da ECA humana **b)** Vista superior do sítio ativo da ECA humana. **c)** Vista frontal do sítio ativo da ECA-like BM91. **d)** Vista superior do sítio ativo da ECA-like BM91.

## 5.2 Estudos de *Docking* molecular

### 5.2.1 Preparo dos ligantes

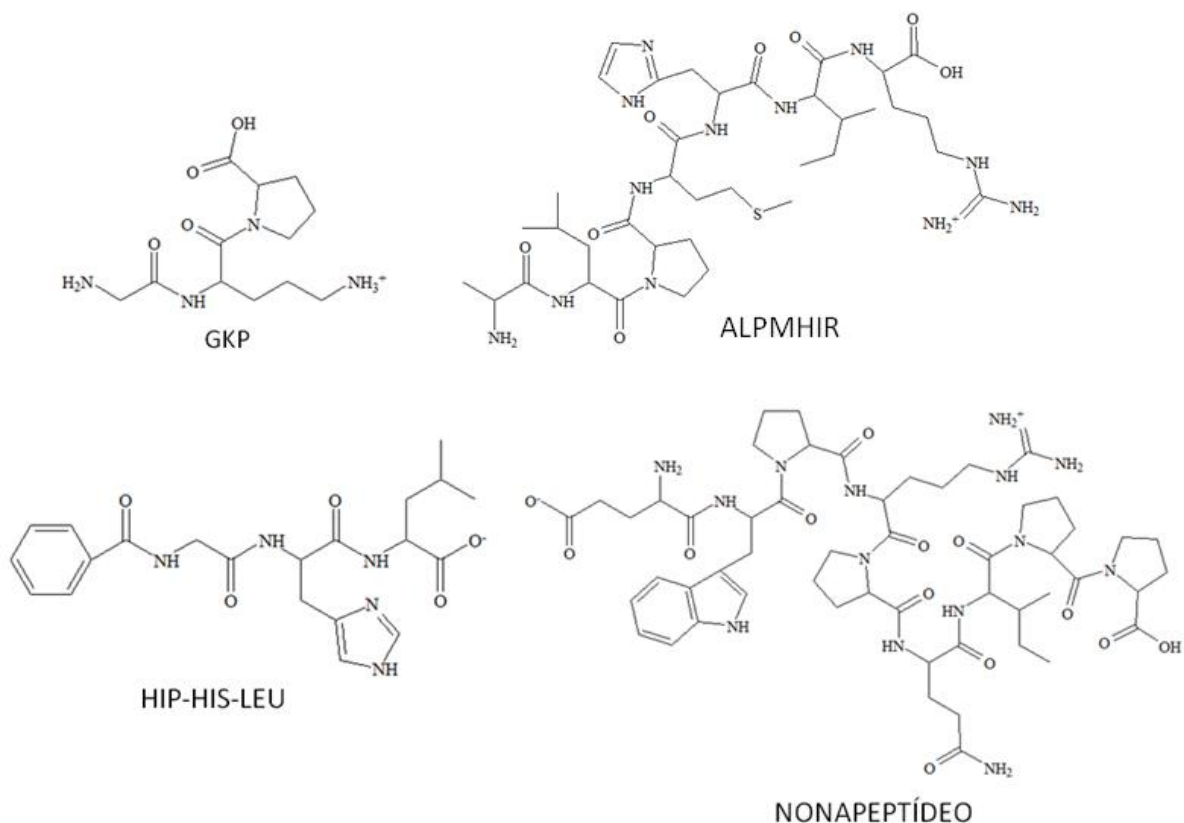
Os inibidores Captopril, Enalapril e Lisinopril foram construídos em suas formas ionizadas (Figura 17) de acordo com a espécie predominante dos mesmos no pH 7,4 (fisiológico).



**Figura 14.** Formas ionizadas dos inibidores da ECA utilizadas no estudo.

Os peptídeos de origem alimentar GKP e ALPMHIR assim como o substrato Hip-His-Leu e o nonapeptídeo foram construídos de acordo com a carga dos resíduos de aminoácidos que os compõem (Figura 18), já que os mesmos apresentam resíduos ácidos e básicos, diferentemente das outras moléculas utilizadas no estudo.

Os aminoácidos nos quais os grupos R têm uma carga positiva líquida em pH 7 são a lisina, que tem um segundo grupo amino; a arginina, que tem um grupo guanidino carregado positivamente; e a histidina, que contém um grupo imidazol. A histidina é o único aminoácido que possui uma cadeia lateral com um pKa próximo da neutralidade. Já os dois aminoácidos que possuem grupos R com uma carga líquida negativa em pH 7, são os aspartato e o glutamato; cada um deles possui na molécula um segundo grupo carboxila (Nelson e Cox, 2002.).



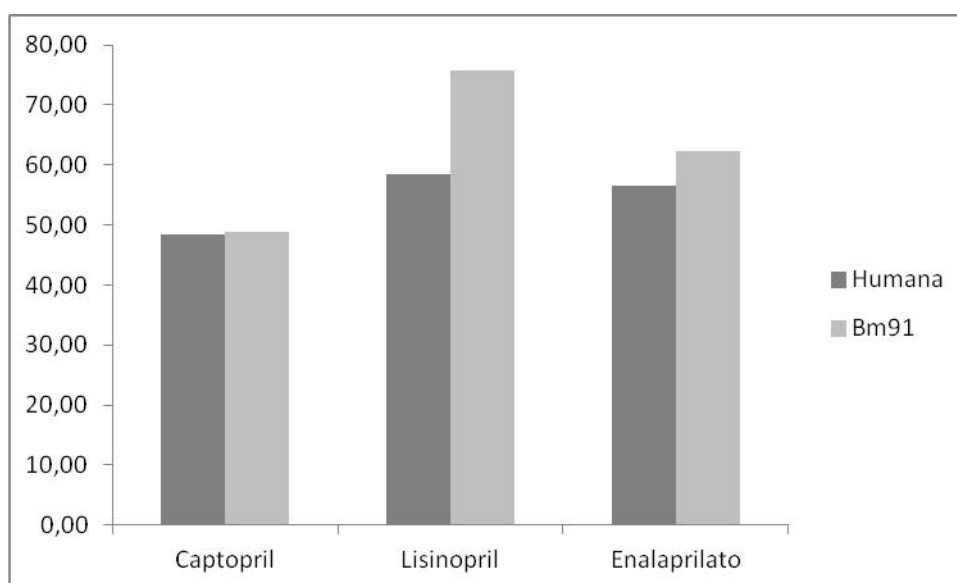
**Figura 15.** Formas ionizadas dos peptídeos alimentares GKP, ALPMHIR, do substrato Hip-His-Leu e do nonapeptídeo utilizados no estudo.



### 5.3 Docking de fármacos anti-hipertensivos na ECA humana e ECA-like BM91

As moléculas deste estudo foram ancoradas à ECA humana e à ECA-like do carrapato *Rhipicephalus microplus* visando a comparação dos modos de ligação observados nas estruturas cristalográficas, quando disponíveis. Em ambos os casos, o maior valor de *score* foi do Lisinopril, seguido do Enalaprilato e o Captopril, respectivamente, os três em duas formas ionizadas (Figura 19). A maior afinidade teórica pelo Lisinopril pode ser porque esse fármaco possui uma estrutura maior e mais flexível, ajustando-se melhor no sítio ativo. Os valores baixos do Captopril demonstram a menor afinidade teórica pela ECA, visto que este fármaco é menos flexível, dificultando as interações com seu alvo. Estudos *in vitro* demonstraram que a concentração necessária para inibir 50% da atividade da ECA (IC<sub>50</sub>) dos inibidores foi de 0,0021 µM para o Captopril, 0,008 µM para o Enalaprilato e 0,027µM para o Lisinopril (Chappell, *et al.*, 1998), o que condiz com os estudos *in silico*, visto que quanto menor o IC<sub>50</sub>, maior foi o valor de *score* obtido no estudo de *docking* mostrando maior afinidade.

O *docking* dos três inibidores na ECA-like mostrou valores de *score* maiores do que aqueles observados para a ECA humana, o que pode ser pelo fato da ECA-like BM91 possuir um volume maior na cavidade do sítio ativo, facilitando a interação das moléculas.

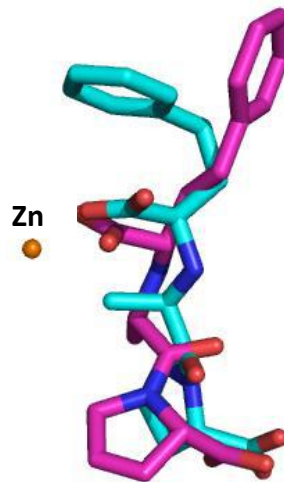


**Figura 16.** Valores de *score* obtidos por *docking* dos inibidores com a ECA humana e a ECA-like BM91, com o programa GOLD.

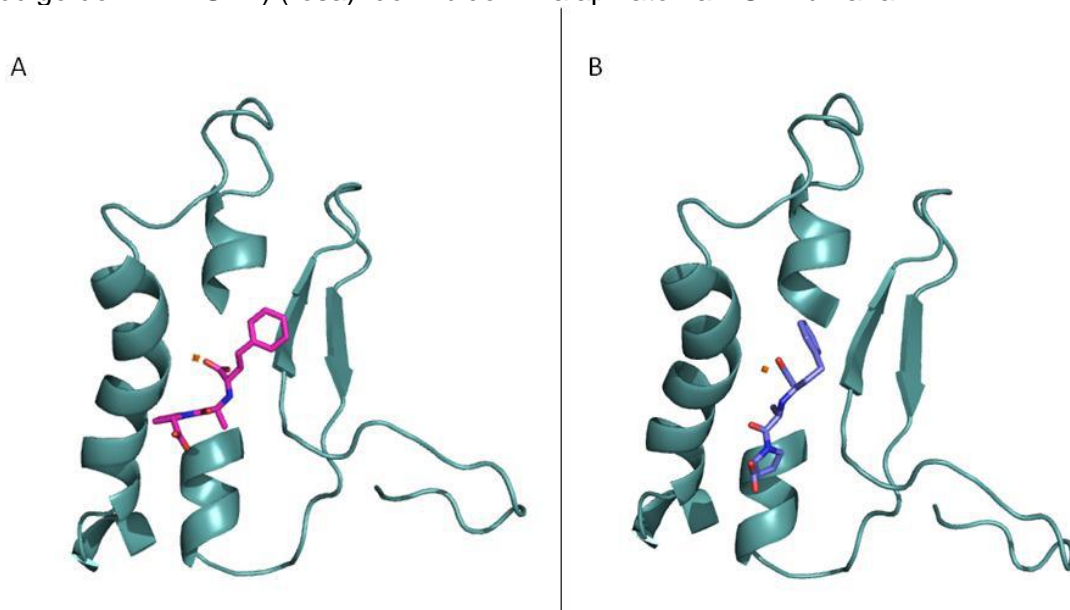
### 5.3.1 Análise das Interações entre os fármacos anti-hipertensivos e a ECA humana

#### 5.3.1.1 Enalaprilato

Os resultados obtidos mostraram que o *docking* foi bem-sucedido para o composto de referência, já que o mesmo ligou exatamente no seu sítio de ligação conhecido (Figuras 17 e 18).



**Figura 17.** Sobreposição da pose obtida no docking (azul) com o cristal (Natesh *et al.*, 2004, Código do PDB 1UZE) (rosa) do inibidor Enalaprilato na ECA humana.



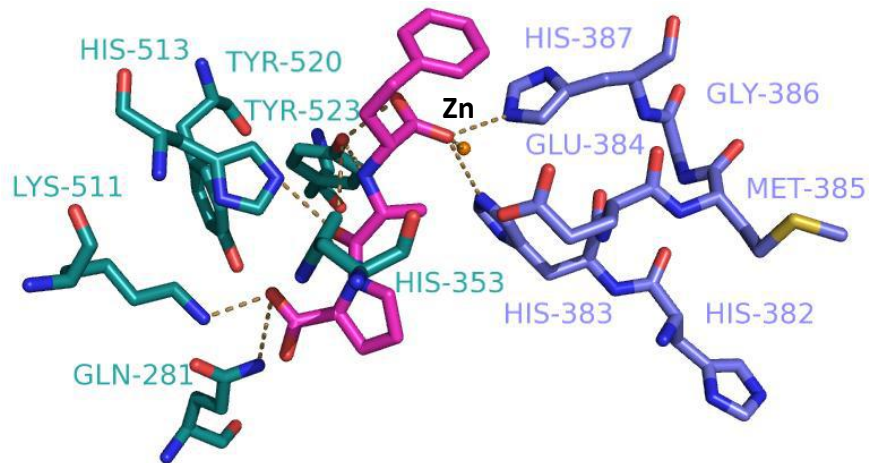
**Figura 18.** Comparação entre o cristal do Enalaprilato (Natesh *et al.*, 2004, Código do PDB 1UZE) (A) e a melhor pose obtida para a o mesmo no *redocking* (B).

Foram observadas interações por ligação de hidrogênio entre a molécula do Enalaprilato e os seguintes resíduos de aminoácidos da ECA humana: GLN281, LYS511, HIS513, TYR520 e TYR523, além dos resíduos do *motif* HIS383, HIS387 (Figura 19). O grupo carboxilato central da molécula realiza interações por ligação de hidrogênio com os resíduos do *motif* HIS383 e HIS387 e também coordenou com o átomo de Zn.

De acordo com Natesh *et al.*, o Enalaprilato mostrou interações por ligação de hidrogênio com os resíduos de aminoácidos HIS353, ALA354, GLU384, LYS511, HIS513, TYR520 e TYR523 (Tabela 2). E foram observadas semelhanças nas ligações com os resíduos do *motif* HIS383 e HIS387, com o átomo de Zn e os resíduos HIS353, LYS511, HIS513, TYR520 e TYR523. Não foram observadas semelhanças nas ligações entre o inibidor e os resíduos ALA354 e GLU384. A interação com o resíduo do *motif* GLU384 não ocorre visto que a distância do grupo amino do inibidor até o carboxilato do resíduo é de 6,5 e 5,1 Å e a distância observada no cristal é de 5,0 e 3,4 Å. A interação com o resíduo ALA354 não ocorre visto que a distância do grupo amino do inibidor até a carboxila do resíduo é de 4,2 Å e a distância observada no cristal é de 3,0 Å. Isso ocorreu devido a posição adotada pelo inibidor.

**Tabela 2.** Comparação das interações por ligação de hidrogênio observadas entre os inibidores Lisinopril, Enalaprilato e Captopril e a ECA humana.

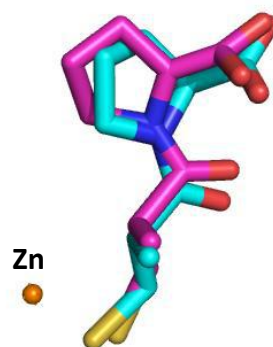
Lisinopril	Enalaprilato	Captopril
HIS353	HIS353	HIS353
ALA354	ALA354	GLU384
GLU384	GLU384	LYS511
LYS511	LYS511	HIS513
HIS513	HIS513	TYR520
TYR520	TYR520	
TYR523	TYR523	
GLU162		



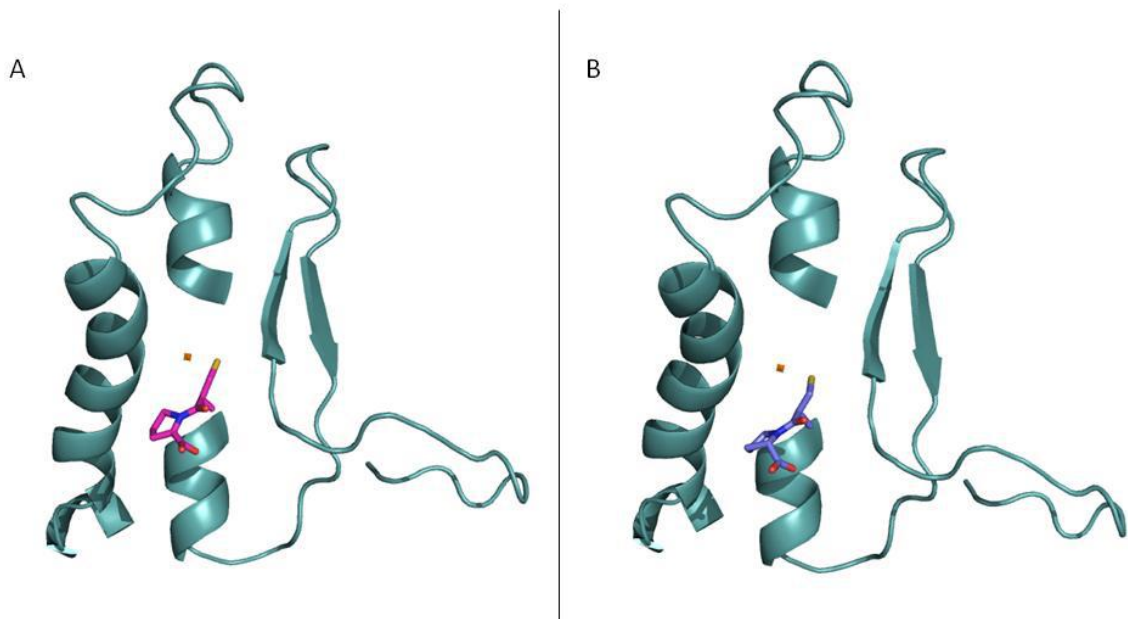
**Figura 19.** Melhor complexo do Enalaprilato com a ECA humana obtido por *docking*. Ligações hidrogênio e coordenação com o Zn pontilhadas em amarelo e resíduos de aminoácidos envolvidos em verde. Os átomos de hidrogênio foram omitidos para melhor visualização. Em lilás os resíduos que compõem o *motif*.

### 5.3.1.2 Captopril

Os resultados obtidos mostram que o *docking* foi bem-sucedido para o composto de referência, já que o mesmo ligou de modo semelhante ao observado no seu sítio de ligação conhecido (Figuras 20 e 21). A solução escolhida foi a segunda melhor, visto que a primeira não condizia com a literatura, onde é descrito que o enxofre deve fazer coordenação com o Zn.



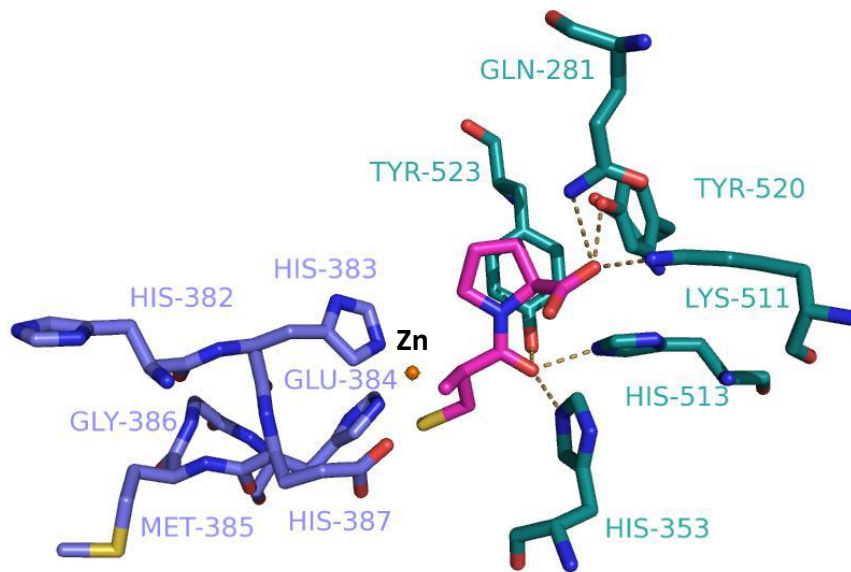
**Figura 20.** Sobreposição da pose obtida no *docking* (azul) com o cristal (Natesh *et al.*, 2004, Código do PDB 1UZF) (rosa) do inibidor Captopril.



**Figura 21.** Comparação entre o cristal do Captopril (Natesh *et al.*, 2004, Código do PDB 1UZF) (A) e a melhor pose obtida para a o mesmo no *redocking* (B).

Foram observadas interações por ligação de hidrogênio entre a molécula do Captopril e os seguintes resíduos aminoácidos da ECA humana: GLN281, HIS353, HIS513, LYS511, TYR 520 e TYR523 (Figura 25). Pressupõe-se que pela distância de 2,3 Å, o grupamento tiol do Captopril esteja interagindo com o átomo de Zn.

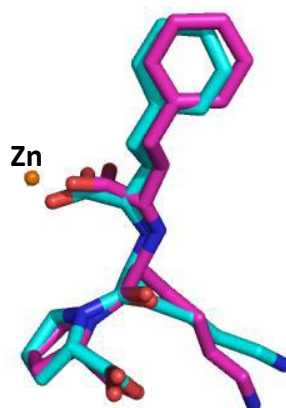
De acordo com Natesh *et al.*, o Captopril mostrou interações por ligação de hidrogênio com os resíduos de aminoácidos HIS353, GLU384, LYS511, HIS513 e TYR520 (Tabela 2). Foram observadas semelhanças em todas as ligações. Porém, a interação com o resíduo do *motif* GLU384 não é mostrada pelo programa apesar de existir, visto que a distância do grupo tiol do inibidor até o carboxilato do resíduo é de 2,6 e 3,3 Å e a distância observada no cristal é de 3,1 e 3,8 Å.



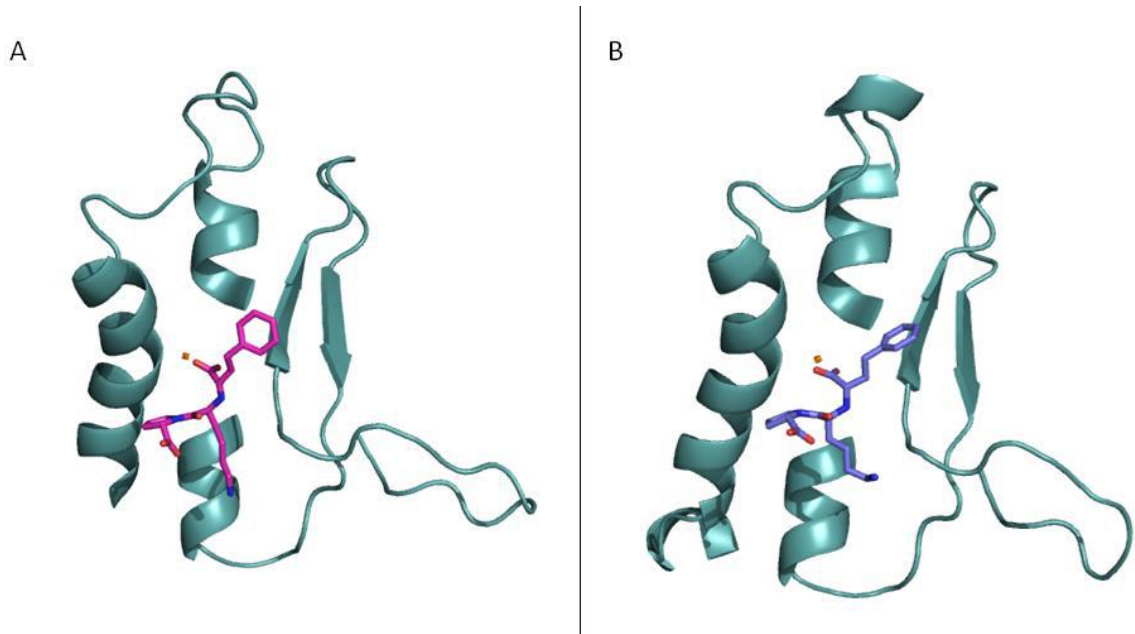
**Figura 22.** Melhor complexo do Captopril com a ECA humana obtido por *docking*. Ligações hidrogênio pontilhadas em amarelo e resíduos de aminoácidos envolvidos em verde. Os átomos de hidrogênio foram omitidos para melhor visualização. Em lilás os resíduos que compõem o *motif*.

### 5.3.1.3 Lisinopril

Os resultados obtidos mostraram que o *docking* foi bem-sucedido para o composto de referência, já que o mesmo ligou de modo semelhante ao observado no seu sítio de ligação conhecido (Figuras 23 e 24).



**Figura 23.** Sobreposição da pose obtida (azul) com o cristal (Natesh *et al.*, 2004, Código do PDB 1O86) (rosa) do inibidor Lisinopril.

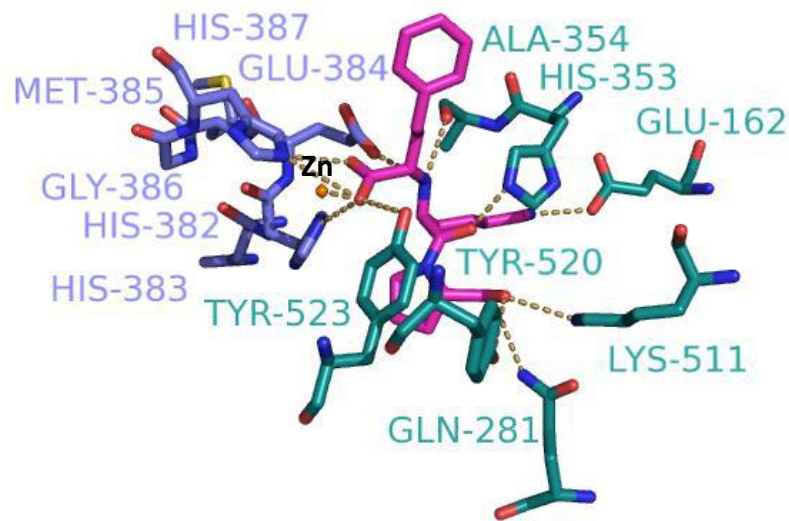


**Figura 24.** Comparação entre o cristal do Lisinopril (Natesh *et al.*, 2004, Código do PDB 1O86) (A) e a melhor pose obtida para a o mesmo no redocking (B).

Foram observadas interações por ligação de hidrogênio entre a molécula do Lisinopril e os seguintes resíduos aminoácidos da ECA humana: GLU162, GLN281, HIS 353, ALA354, LYS511, TYR520, TYR523, além dos resíduos do *motif* HIS383, GLU384, HIS387, e da interação com o átomo de Zn (Figura 28).

O grupo carboxilato central da molécula realiza interações por ligação de hidrogênio com os resíduos do *motif* HIS383 e HIS387 e o átomo de Zn. O grupo carboxilato C-terminal do inibidor liga-se aos resíduos GLN281, LYS511 e TYR520, e o grupamento amino central faz interação por ligação de hidrogênio com o resíduo do *motif* GLU384 e com o resíduo ALA354. A carbonila central faz interação por ligação de hidrogênio com o resíduo HIS353.

De acordo com Natesh *et al.*, o Lisinopril mostrou interações por ligação de hidrogênio com os resíduos de aminoácidos HIS353, ALA354, GLU384, LYS511, HIS513, TYR520, TYR523 e GLU162 (Tabela 2). Foram observadas semelhanças em todas as ligações. Porém, a interação com o resíduo HIS513 não é mostrada pelo programa apesar de existir, visto que a distância da carbonila central do inibidor até o grupamento amino do resíduo é de 3,4 Å e a distância observada no cristal é de 3,1 Å.

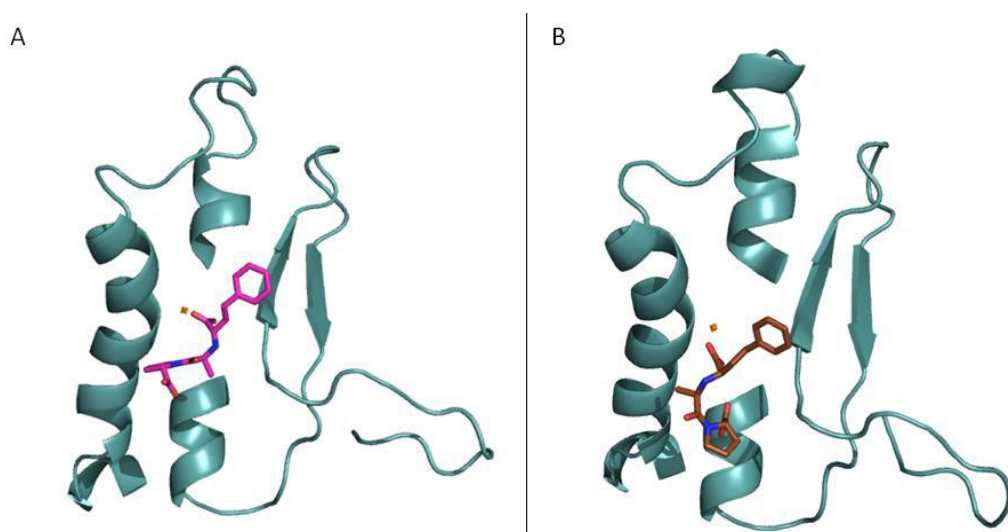


**Figura 25.** Melhor complexo do Lisinopril com a ECA humana obtido por *docking*. Ligações hidrogênio e coordenação com o zinco pontilhadas em amarelo e resíduos de aminoácidos envolvidos em verde. Os átomos de hidrogênio foram omitidos para melhor visualização. Em lilás os resíduos que compõem o *motif*.

### 5.3.2 Análise das Interações entre os fármacos anti-hipertensivos e a ECA-like BM91

#### 5.3.2.1 Enalaprilato

Os resultados obtidos mostraram que o enalaprilato se ligou exatamente no sítio de ligação conhecido na enzima ECA-like BM91 e apresentou um modo de ligação similar ao enalaprilato na enzima de humanos o que sugere afinidade semelhante do inibidor pela enzima do carrapato (Figura 26).

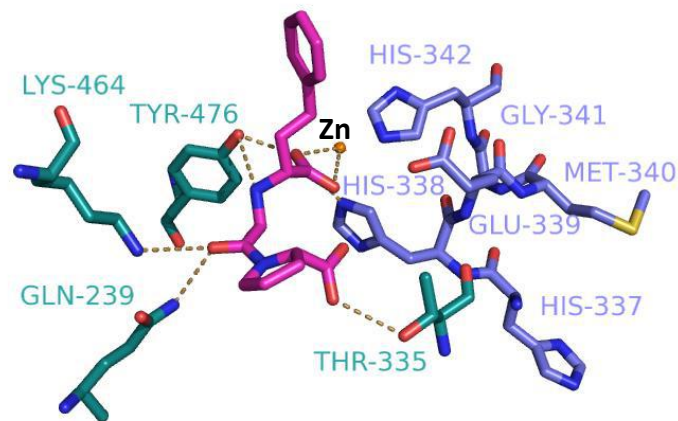


**Figura 26.** Comparação entre o cristal do Enalaprilato (Natesh *et al.*, 2004, Código do PDB 1UZE) (A) e a melhor pose do mesmo obtida para a ECA BM91 (B).



Foram observadas interações por ligação de hidrogênio entre a molécula do Enalaprilato e os seguintes resíduos aminoácidos da ECA-like BM91: GLN239, THR335, LYS464 e TYR476, o resíduo do *motif* HIS338, além da coordenação com o átomo de Zn (Figura 27).

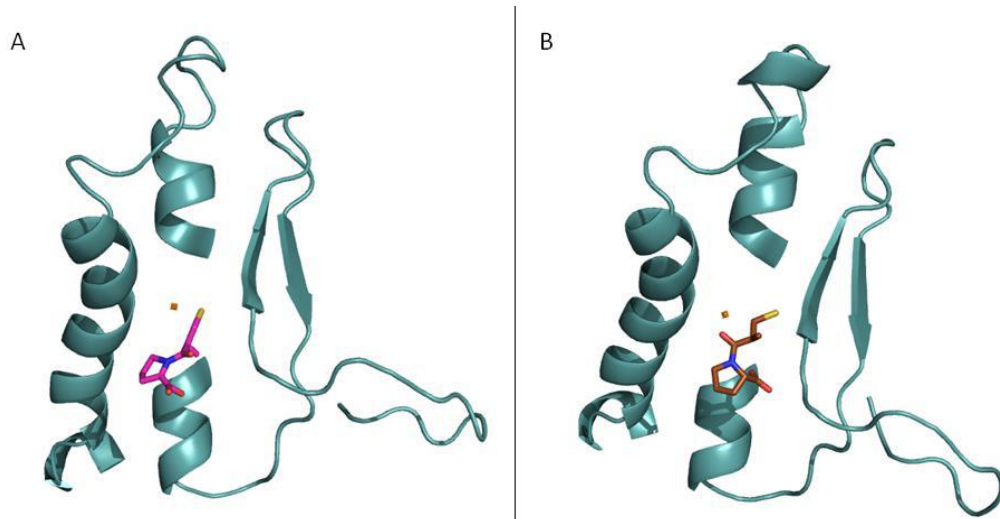
O grupo carboxilato do Enalaprilato coordena com o íon Zn no centro ativo da proteína (distâncias de 2,87 e 2,36Å), na AnCE de *Drosophila melanogaster* ocorre a mesma coisa, com distâncias de 2,00 e 2,57Å (Mohd *et al.*, 2010). O grupo carboxílico central da molécula realiza interações com o átomo de Zn. Essa interação também é semelhante ao que é observada no cristal do Lisinopril e ECA humana.



**Figura 27.** Melhor complexo do Enalaprilato com a ECA-like BM91 obtido por *docking*. Ligações hidrogênio e coordenação com o zinco pontilhadas em amarelo e resíduos de aminoácidos envolvidos em verde. Os átomos de hidrogênio foram omitidos para melhor visualização. Em lilás os resíduos que compõem o *motif*.

### 5.3.2.2 Captopril

Os resultados do *docking* do captopril mostraram que o mesmo ligou no seu sítio de ligação, entretanto, de modo diferente ao que ocorre na enzima de humanos (Figura 28).

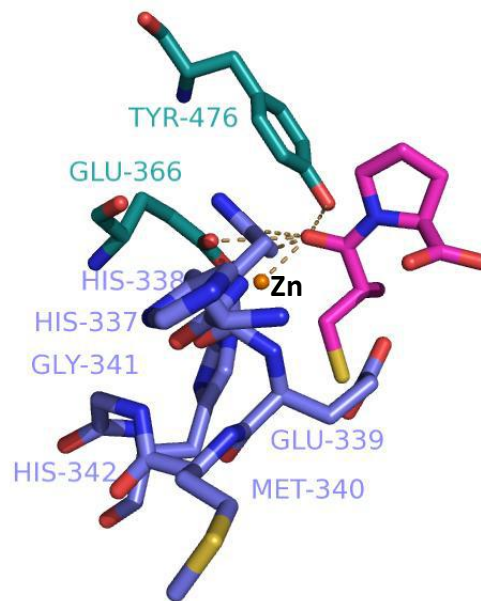


**Figura 28.** Comparação entre o cristal do Captopril (Natesh *et al.*, 2004, Código do PDB 1UZF) (A) e a melhor pose do mesmo obtida para a ECA BM91 (B).

Foram observadas interações por ligação de hidrogênio entre a molécula do Captopril e os seguintes resíduos aminoácidos da ECA-like BM91: GLU366, TYR476, além do resíduo do *motif* HIS338 e a coordenação com o átomo de Zn (Figura 29).

O grupo carboxila central da molécula realiza interações por ligação de hidrogênio com o resíduo do *motif* HIS338 e coordena com o átomo de Zn, o que difere do que foi observado na ECA humana. Em ambas as enzimas, não foi observada interação entre o grupamento tiol do Captopril e o átomo de Zn (distância de 4,0Å), como é citado na literatura. O íon Zn em coordenação provavelmente posicionou o grupo carbonila de forma ligeiramente diferente do que no complexo do Enalaprilato o que resulta no ganho de uma interação por ligação de hidrogênio com HIS338 situada no *motif*.

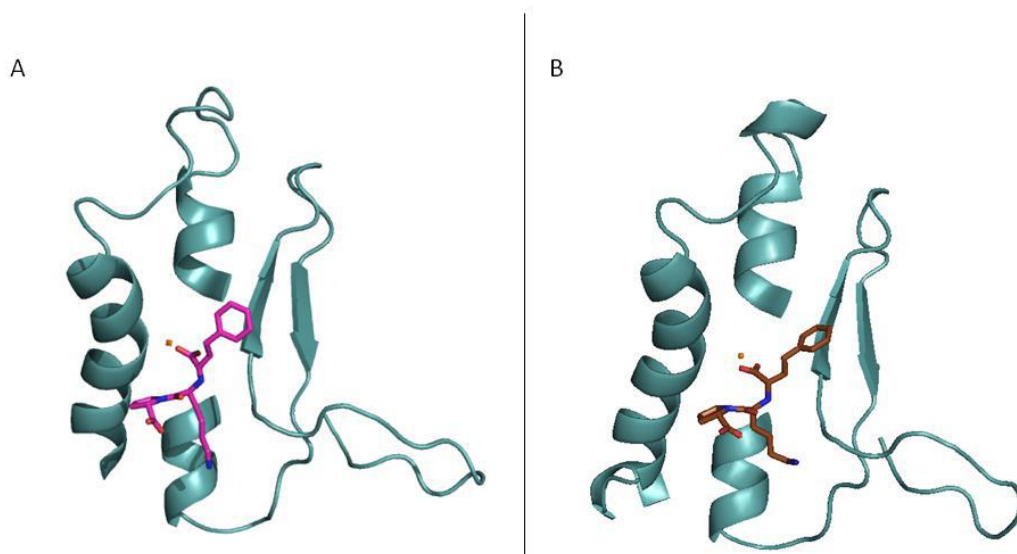
De acordo com Mohd *et al.*, a carbonila central do Captopril faz interação por ligação de hidrogênio com o resíduo HIS337 na AnCE de *Drosophila*, além disso, é relatado que no complexo AnCE-Captopril o grupo tiol do inibidor faz uma interação direta com o Zn (distância de 2,15 Å), porém, a orientação do grupo tiol é bastante diferente entre as estruturas relatadas do complexo humana e Captopril e de AnCE de *Drosophila*, o que pode acontecer também com a ECA-like, devido à similaridade dos invertebrados.



**Figura 29.** Melhor complexo do Captopril com a ECA-like BM91 obtido por *docking*. Ligações hidrogênio e coordenação com o zinco pontilhadas em amarelo e resíduos de aminoácidos envolvidos em verde. Os átomos de hidrogênio foram omitidos para melhor visualização. Em lilás os resíduos que compõem o *motif*.

### 5.3.2.3 Lisinopril

Os resultados obtidos do *docking* do lisinopril na ECA-like mostraram que o mesmo se ligou no seu sítio de ligação semelhante ao observado na ECA humana, o que sugere que este inibidor possui afinidade pela ECA-like (Figura 30).

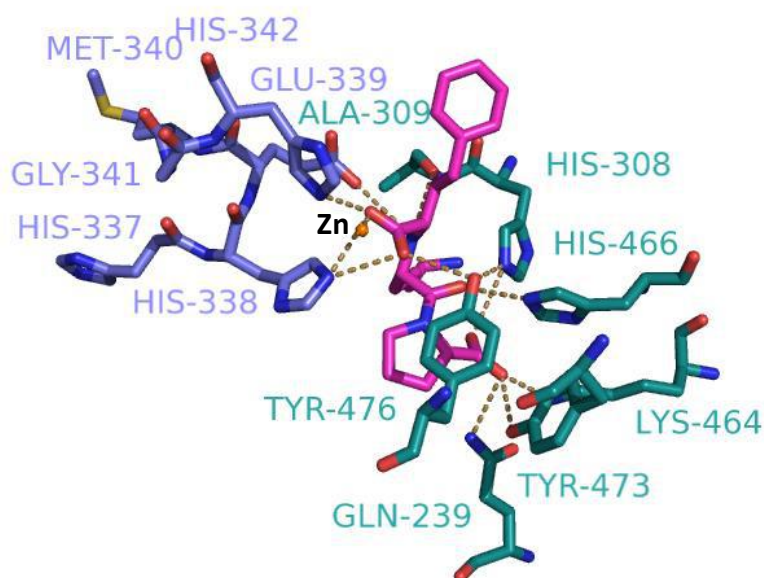


**Figura 30.** Comparação entre o cristal do Lisinopril (Natesh *et al.*, 2004, Código do PDB 1O86) (A) e a melhor pose do mesmo obtida com a ECA BM91 (B).

Foram observadas interações por ligação de hidrogênio entre a molécula do Lisinopril e os seguintes resíduos aminoácidos da ECA-like BM91: GLN239, HIS308, ALA309, LYS464, HIS466, TYR473, TYR476, além dos resíduos do *motif* HIS338, GLU339, HIS342, e a coordenação com o átomo de Zn (Figura 31).

O grupo carboxilato do Lisinopril coordenou firmemente com o íon Zn (distâncias de coordenação são 1,88 e 1,58 Å). Na AnCE de *Drosophila* ocorre a mesma coisa, com distâncias de 1,89 e 2,57 Å (Mohd *et al.*, 2010). O grupo carboxilato C-terminal do inibidor liga-se aos resíduos GLN239, LYS464 e TYR473, o que se assemelha ao observado no complexo do Lisinopril com a ECA humana e com a AnCE (Mohd *et al.*, 2010). O grupamento amino central do inibidor faz interação por ligação de hidrogênio com o resíduo do *motif* GLU339 e com o resíduo ALA309. Além disso, a carbonila central interage com o resíduo HIS308. Essas interações se assemelham às observadas no complexo do Lisinopril com a ECA humana.

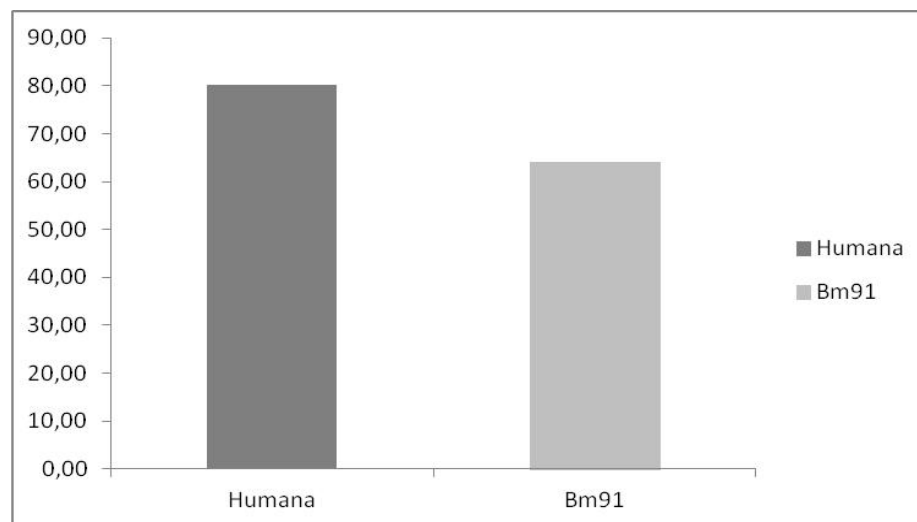
O grupo carboxílico central da molécula realiza interações por ligação de hidrogênio com os resíduos do *motif* HIS338 e HIS342 e coordena com o átomo de Zn. Novamente, essas interações demonstram semelhanças com as observadas na ECA humana.



**Figura 31.** Melhor complexo do Lisinopril com a ECA-like BM91 obtido por *docking*. Ligações hidrogênio e coordenação com o zinco pontilhadas em amarelo e resíduos de aminoácidos envolvidos em verde. Os átomos de hidrogênio foram omitidos para melhor visualização. Em lilás os resíduos que compõem o *motif*.

#### 5.4 Docking do substrato Hip-His-Leu na ECA humana e ECA-like BM91

Neste estudo foi realizado o *docking* do substrato Hip-His-Leu com a ECA humana e a ECA-like do carrapato *Rhipicephalus microplus* visando a comparação dos modos de ligação. O maior valor de *score* obtido foi com a ECA humana (Figura 35). Já foi demonstrado experimentalmente que esse substrato se liga à ECA humana. Porém, devido aos resultados teóricos obtidos até o momento, pode-se sugerir que o mesmo não seria um bom substrato para a ECA-like BM91 devido às suas diferenças estruturais.



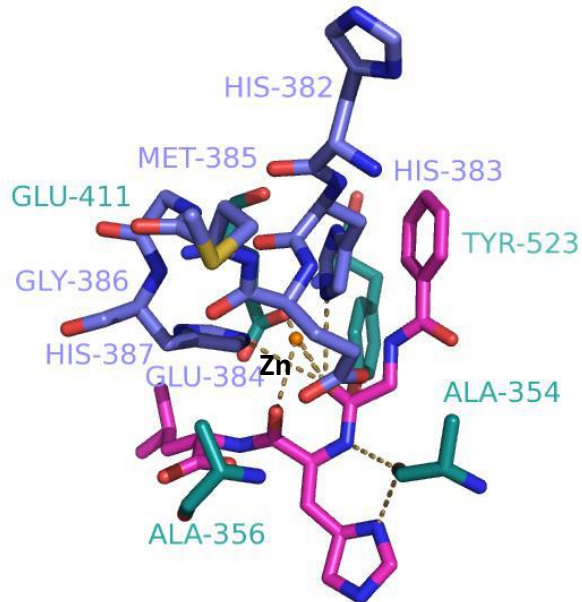
**Figura 32.** Valores de *score* obtidos por *docking* do substrato Hip-His-Leu com a ECA humana e a ECA-like BM91.

##### 5.4.1 Análise das Interações entre o substrato Hip-His-Leu e a ECA humana

Foram observadas interações por ligação de hidrogênio entre a HIP-HIS-LEU e os seguintes resíduos aminoácidos da ECA humana: ALA354, ALA356, GLU411, TYR523, os resíduos do *motif* HIS383, HIS387 e a coordenação com o átomo de Zn (Figura 33).

A interação com o Zn deve ocorrer com o grupamento carboxila C-terminal do inibidor, e o mesmo realiza coordenação com os resíduos HIS383, HIS387 e GLU411 e realiza interação também com o resíduo TYR523. Além disso, foi demonstrado que o grupamento amino central interage por ligação de hidrogênio

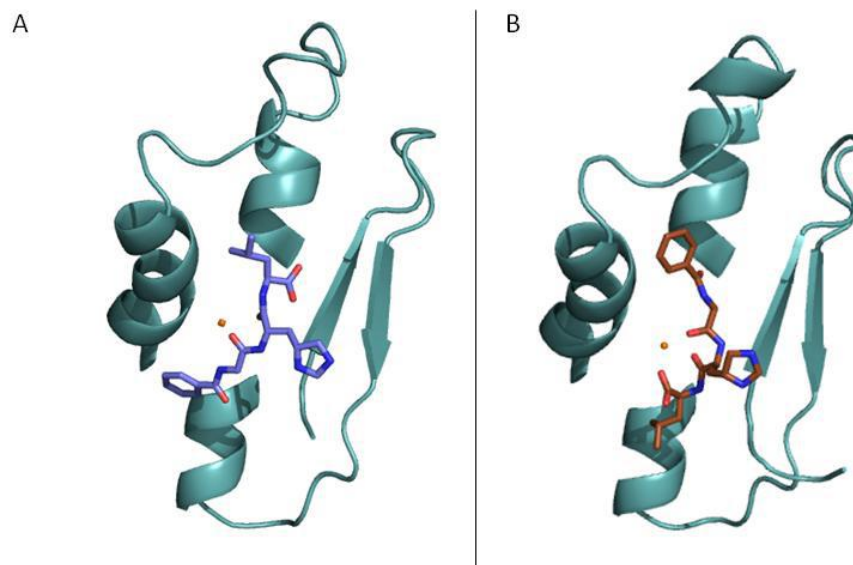
com átomos do esqueleto peptídico do resíduo ALA354. Essas interações condizem com o que foi relatado na literatura por Wang e colaboradores.



**Figura 33.** Melhor complexo do Hip-His-Leu com a ECA humana obtido por *docking*. Ligações hidrogênio e coordenação com o zinco pontilhadas em amarelo e resíduos de aminoácidos envolvidos em verde. Os átomos de hidrogênio foram omitidos para melhor visualização. Em lilás os resíduos que compõem o *motif*.

#### 5.4.2 Análise das Interações entre o substrato Hip-His-Leu e a ECA-*like* BM91

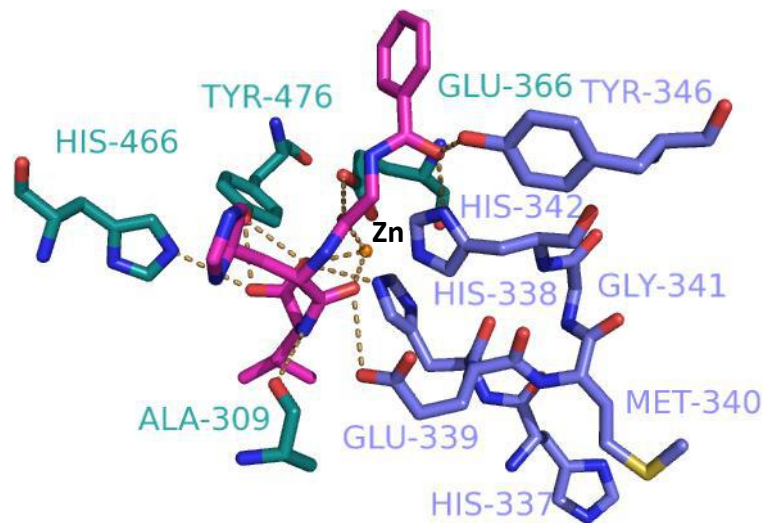
Os resultados obtidos nos estudos de *docking* do substrato Hip-His-Leu com a ECA-*like* mostraram que o mesmo ligou no seu sítio de ligação, entretanto, de modo diferente ao que ocorre na enzima de humanos (Figura 34).



**Figura 34.** Comparação entre a melhor pose do substrato Hip-His-Leu com a ECA humana (A) e a melhor pose do mesmo obtida com a ECA BM91 (B).

Foram observadas interações por ligação de hidrogênio entre a HIP-HIS-LEU e os seguintes resíduos de aminoácidos da ECA-*like* BM91: ALA309, GLU366, HIS466, TYR476, os resíduos do *motif* HIS342 e TYR346 e a coordenação com o átomo de Zn. (Figura 35).

Assim como ocorre no complexo da HIP-HIS-LEU com a ECA humana, o grupamento carbonila C-terminal do inibidor realizou coordenação com o átomo de Zn, e este realizou coordenação com os resíduos HIS338 e HIS342 na ECA-*like* BM91, esse grupamento realiza interação também com o resíduo GLU366. Além disso, foi demonstrado que o grupamento amino central interage por ligação de hidrogênio com átomos do esqueleto peptídico do resíduo ALA309. Essas interações condizem com o que foi observado para a ECA humana.



**Figura 35.** Melhor complexo do Hip-His-Leu com a ECA-like BM91 obtido por *docking*. Ligações hidrogênio e coordenação com o zinco pontilhadas em amarelo e resíduos de aminoácidos envolvidos em verde. Os átomos de hidrogênio foram omitidos para melhor visualização. Em lilás os resíduos que compõem o *motif*.

### 5.5 *Docking* de inibidores peptídicos na ECA humana e ECA-like BM91

Peptídeos alimentícios foram ancorados à ECA humana e à ECA-like do carrapato *Rhipicephalus microplus* visando a comparação de seus modos de ligação. Em ambas as enzimas, o maior valor de *score* obtido foi do peptídeo IPP, seguido do VPP e do IPA. Já os menores valores de *score* obtidos foram dos peptídeos nonapeptídeo e ALPMHIR, respectivamente (Figura 36).

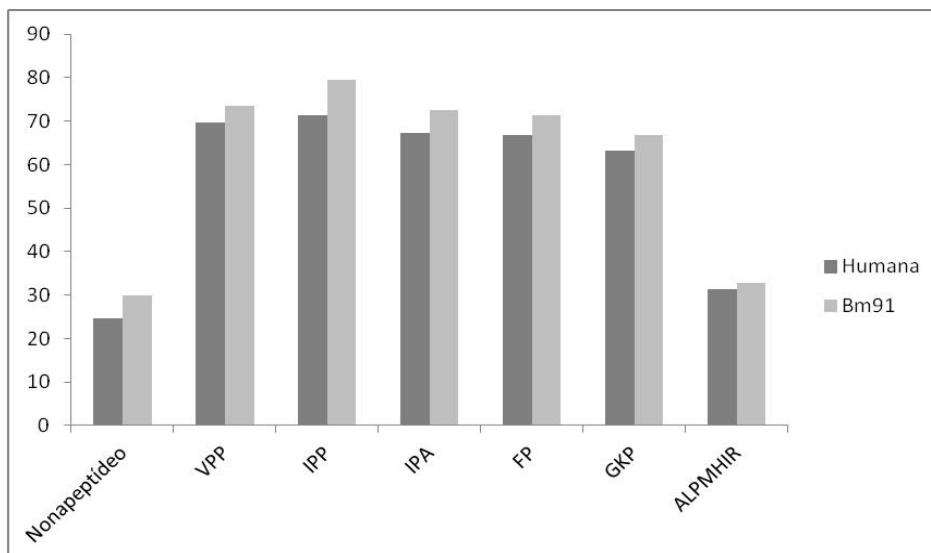
É concebível que peptídeos longos como ALPMHIR e nonapeptídeo apresentem limitações de tamanho na entrada do estreito canal da ECA e outros efeitos como impedimento estérico no sítio ativo da ECA, e conseqüentemente a inibição da ECA foi menor quando comparado com os tripeptídeos. Estes resultados estão em concordância com os estudos anteriores com base na relação estrutura-atividade entre os peptídeos inibidores da ECA, em que se concluiu que o aumento na cadeia polipeptídica diminui o potencial de inibição da mesma (Pina e Roque, 2008).

De um ponto de vista estrutural, há evidências de que a ECA favorece substratos com resíduos hidrofóbicos na posição C-terminal e que as limitações de ligação, a hidrólise e uma diminuição no potencial de inibição da ECA são relacionados com os peptídeos mais longos (peptídeos com sete ou oito



aminoácidos). Adicionalmente, a hidrofobicidade das cadeias laterais de aminoácidos dos peptídeos, também é extremamente importante para um maior potencial de inibição da ECA. VPP, IPP, IPA, FP e GKP possuem propriedades para a inibição da ECA, observadas tanto *in vivo* e *in vitro* (Pina e Roque, 2008; Pan *et al.*, 2011), devido aos seus pequenos tamanhos e caráter hidrofóbico elevados, o que pode explicar os seus elevados valores de *score*.

Os peptídeos demonstraram uma afinidade teórica maior pela ECA-*like* BM91 do que pela ECA humana, isso pode ter ocorrido porque o volume do sítio ativo da enzima demonstrou ser maior que o da ECA humana, o que facilita a entrada e consequente interação com as moléculas.



**Figura 36.** Valores de *score* obtidos por *docking* dos peptídeos e a ECA humana e ECA-*like* BM91.

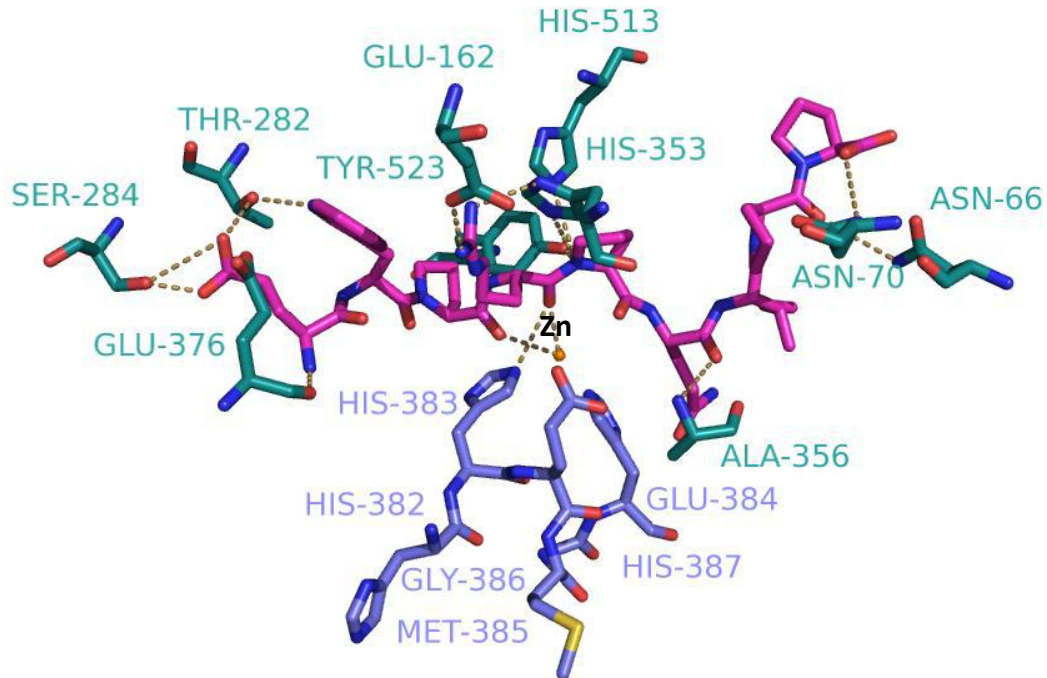
### 5.5.1 Análise das Interações entre os inibidores peptídicos e a ECA humana

#### 5.5.1.1 Nonapeptídeo

Foram observadas interações por ligação de hidrogênio entre o nonapeptídeo e os seguintes resíduos aminoácidos da ECA humana: ASN66, ASN70, GLU162, THR282, SER284, HIS353, ALA356, GLU376, HIS513, TYR523, além do resíduo do *motif* HIS383, e da coordenação com o átomo de Zn (Figura 37).

A carbonila da arginina apresentou coordenação com o átomo de Zn, o qual coordenou com os resíduos do *motif* HIS383 e HIS387.

O nonapeptídeo apresentou o menor valor de *score*, isso pode ocorrer devido a algum impedimento estérico devido à sua cadeia longa.

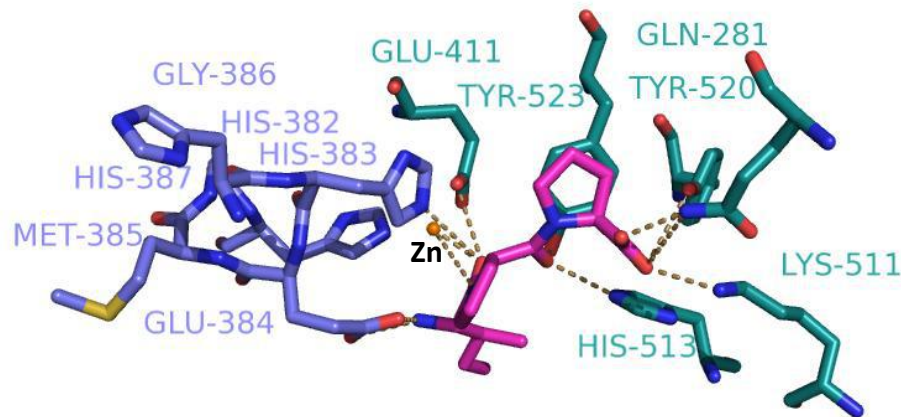


**Figura 37.** Melhor complexo do nonapeptídeo com a ECA humana obtido por *docking*. Ligações hidrogênio e coordenação com o zinco pontilhadas em amarelo e resíduos de aminoácidos envolvidos em verde. Os átomos de hidrogênio foram omitidos para melhor visualização. Em lilás os resíduos que compõem o *motif*.

#### 5.5.1.2 IPP

Foram observadas interações por ligação de hidrogênio entre a molécula do IPP e os seguintes resíduos aminoácidos da ECA humana: GLN281, GLU411, LYS511, HIS513, TYR520, TYR523, os resíduos do *motif* HIS383 e GLU384, e a coordenação com o átomo de Zn (Figura 38).

De acordo com Pina e Roque, o grupo carboxílico do resíduo de prolina C-terminal estabelece interações por ligação de hidrogênio com o grupo amida de GLN281 e com o grupo hidroxila da TYR520 e a parte aromática da TYR520 contribui para a estabilização, o que foi observado no *docking*. O grupo carbonila da isoleucina N-terminal interage com o resíduo de TYR523 por meio de ligação de hidrogênio. Essa interação mostra semelhanças ao que foi observado na interação da ECA humana com os inibidores Enalaprilato e Lisinopril.



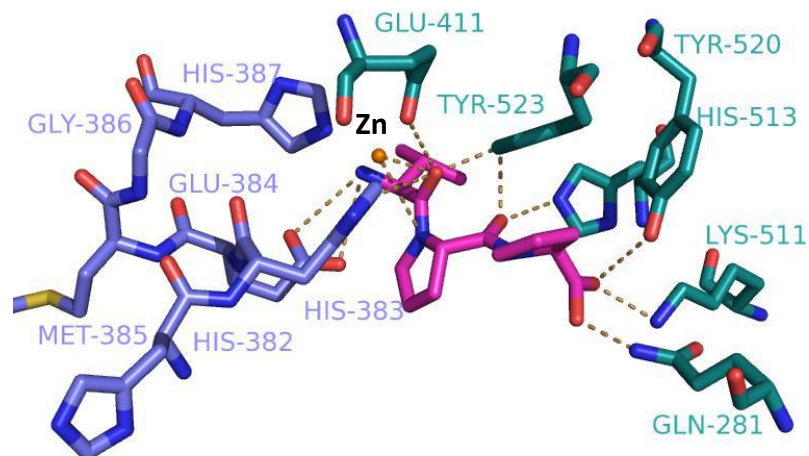
**Figura 38.** Melhor complexo do IPP com a ECA humana obtido por *docking*. Ligações hidrogênio e coordenação com o zinco pontilhadas em amarelo e resíduos de aminoácidos envolvidos em verde. Os átomos de hidrogênio foram omitidos para melhor visualização. Em lilás os resíduos que compõem o *motif*.

### 5.5.1.3 VPP

Foram observadas interações por ligação de hidrogênio entre a molécula do VPP e os seguintes resíduos aminoácidos da ECA humana: GLN281, HIS353, GLU411, LYS511, HIS513, TYR520, TYR523, os resíduos do *motif* HIS383, GLU384 e a coordenação com o átomo de Zn (Figura 39).

O grupo carboxílico do resíduo de prolina C-terminal estabeleceu interações por ligação de hidrogênio com a hidroxila da TYR520, e o grupo amina da GLN281 e LYS511. A parte aromática da TYR520 contribui para a estabilização. O grupo carbonila da valina interagiu através de ligação de hidrogênio com o resíduo do *motif* HIS383 e também interagiu com os resíduos TYR523 e GLU411 por meio de ligação de hidrogênio. Essas interações são semelhantes ao que foi observado entre a ECA humana e os inibidores Enalaprilato e Lisinopril.

O VPP demonstrou capacidade de coordenar com o íon zinco através do grupo carbonila localizado entre o resíduo de valina e o resíduo de prolina. A diferença entre a VPP e IPP é o primeiro resíduo de aminoácido (Valina no VPP e Isoleucina no IPP, respectivamente). Embora valina e isoleucina exibam um caráter hidrofóbico forte, a isoleucina possui uma maior flexibilidade e maior volume da cadeia lateral (Pina e Roque, 2008).



**Figura 39.** Melhor complexo do VPP com a ECA humana obtido por *docking*. Ligações hidrogênio e coordenação com o zinco pontilhadas em amarelo e resíduos de aminoácidos envolvidos em verde. Os átomos de hidrogênio foram omitidos para melhor visualização. Em lilás os resíduos que compõem o *motif*.

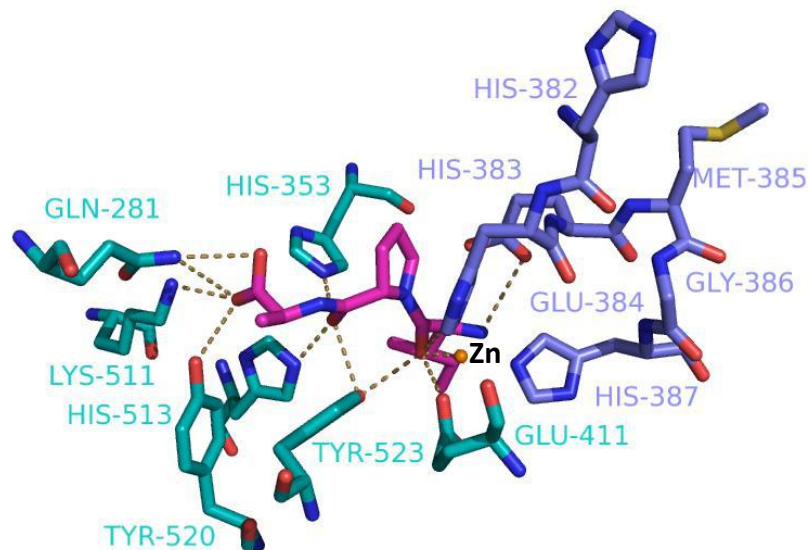
#### 5.5.1.4 IPA

Foram observadas interações por ligação de hidrogênio entre a molécula do IPA e os seguintes resíduos aminoácidos da ECA humana: GLN281, HIS353, GLU411, LYS511, HIS513, TYR520, TYR523, os resíduos do *motif* HIS383 e GLU384, e a coordenação com o átomo de Zn (Figura 40).

De acordo com Pan e colaboradores, o grupo amino da isoleucina *N*-terminal estabelece interações por ligação de hidrogênio com a -OH de SER355 e o grupo carbonila de ALA356. O grupo carbonila do resíduo prolina, interage com a ALA356 através de ligação de hidrogênio. O grupo amino do resíduo de alanina está em contato com os resíduos ALA354 e GLU384 e através de ligações de hidrogênio. O grupo carboxílico da alanina *C*-terminal estabelece ligação de hidrogênio com a -OH de TYR523. Com base nos parâmetros de ligações de hidrogênio, estas interações estabelecidas com ALA354, ALA356, SER355 E TYR523 são consideradas fortes, o que contribuiu grandemente para a estabilização.

Porém, o que foi observado foi que o grupo amino do esqueleto peptídico da isoleucina *N*-terminal estabeleceu interações por ligação de hidrogênio com o grupo carboxílico do resíduo GLU384. O grupo carbonila também da isoleucina realizou interações por ligação de hidrogênio com um dos átomos de nitrogênio (-NH) do anel imidazol da HIS383, o grupo hidroxila da TYR523, o grupo carboxílico do GLU411 coordenaram com o átomo de Zn. O anel aromático da TYR523 contribuiu para a

estabilização. Essas interações também são interessantes para o efeito inibitório dessa molécula.

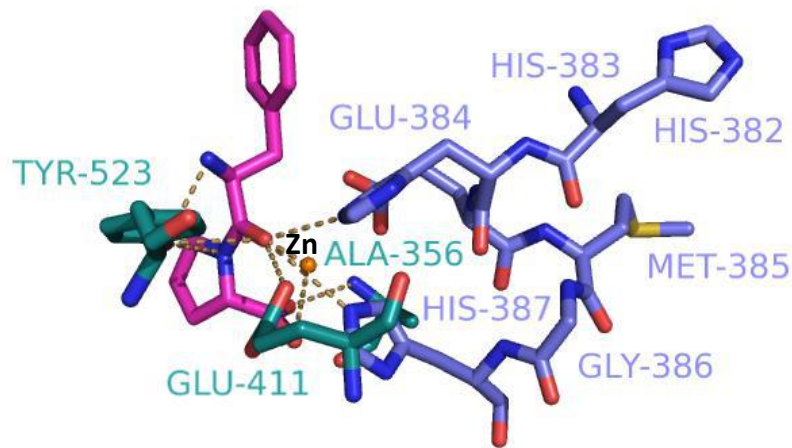


**Figura 40.** Melhor complexo do IPA com a ECA humana obtido por *docking*. Ligações hidrogênio e coordenação com o zinco pontilhadas em amarelo e resíduos de aminoácidos envolvidos em verde. Os átomos de hidrogênio foram omitidos para melhor visualização. Em lilás os resíduos que compõem o *motif*.

#### 5.5.1.5 FP

Foram observadas interações por ligação de hidrogênio entre a molécula do FP e os seguintes resíduos aminoácidos da ECA humana: ALA356, GLU411, TYR523, os resíduos do *motif* HIS383, HIS387 e a coordenação com o átomo de Zn (Figura 41).

O grupo amino *N*-terminal da fenilalanina estabeleceu interação por ligação de hidrogênio com a TYR523. Já a carbonila do esqueleto peptídico da fenilalanina estabeleceu interação por ligação de hidrogênio com GLU411, os resíduos do *motif* GLU384, HIS387, TYR523, além de coordenar com o átomo de Zn.

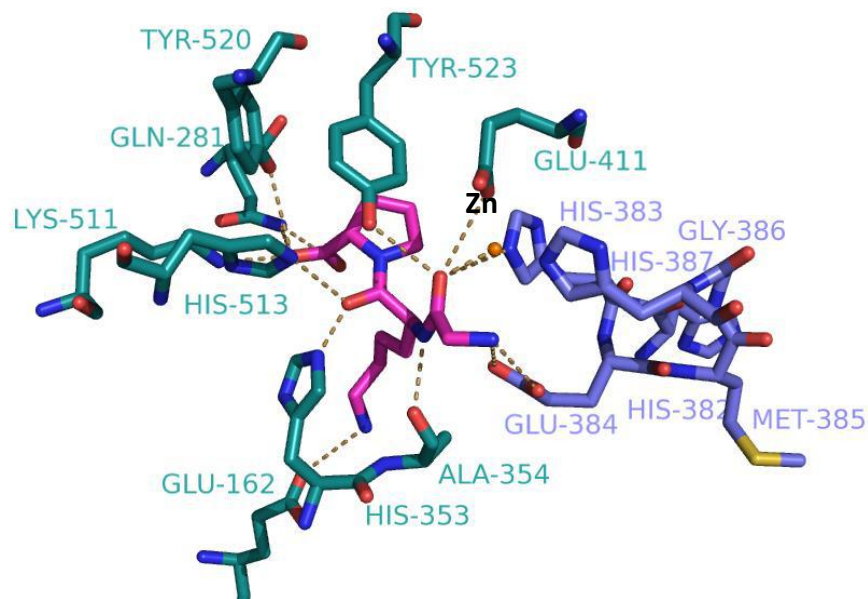


**Figura 41.** Melhor complexo do FP com a ECA humana obtido por *docking*. Ligações hidrogênio e coordenação com o zinco pontilhadas em amarelo e resíduos de aminoácidos envolvidos em verde. Os átomos de hidrogênio foram omitidos para melhor visualização. Em lilás os resíduos que compõem o *motif*.

#### 5.5.1.6 GKP

Foram observadas interações por ligação de hidrogênio entre a molécula do GKP e os seguintes resíduos aminoácidos da ECA humana: GLU162, GLN281, HIS353, ALA354, GLU411, LYS511, HIS513, TYR520, TYR523, os resíduos do *motif* HIS383, GLU384 e a coordenação com o átomo de Zn (Figura 42).

De acordo com Pan *et al.*, o grupo amino *N*-terminal da glicina estabeleceu duas interações por ligação de hidrogênio com o resíduo de glutamato do *motif* (GLU384) e com base nos parâmetros de ligação de hidrogênio, as interações estabelecidas com HIS353, GLU384 e TYR523 são fortes e contribuem muito para a estabilização. A carbonila da glicina realizou interação por ligação de hidrogênio com os resíduos GLU411, TYR523, o resíduo do *motif* HIS383, além de coordenar com o átomo de Zn, como observado por Pan e colaboradores.



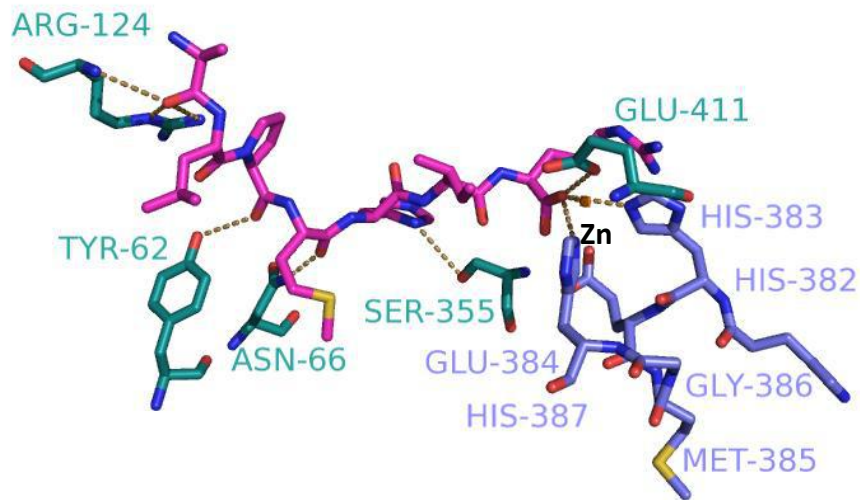
**Figura 42.** Melhor complexo do GKP com a ECA humana obtido por *docking*. Ligações hidrogênio e coordenação com o zinco pontilhadas em amarelo e resíduos de aminoácidos envolvidos em verde. Os átomos de hidrogênio foram omitidos para melhor visualização. Em lilás os resíduos que compõem o *motif*.

#### 5.5.1.7 ALPMHIR

Foram observadas interações por ligação de hidrogênio entre a molécula do ALPMHIR e os seguintes resíduos aminoácidos da ECA humana: TYR62, ASN66, ARG124, SER355, GLU411, os resíduos do *motif* HIS383, HIS387 e a coordenação com o átomo de Zn (Figura 43).

O grupo carboxila da arginina estabeleceu interações por ligação de hidrogênio com os resíduos HIS383 e HIS387, além de coordenar com o átomo de Zn. O grupo carbonila também interagiu com a GLU411.

O ALPMHIR apresenta resíduos carregados positivamente que contribuem para o potencial de inibição da ECA, tais como o grupo guanidina da arginina localizada no C-terminal (Pina e Roque, 2008).

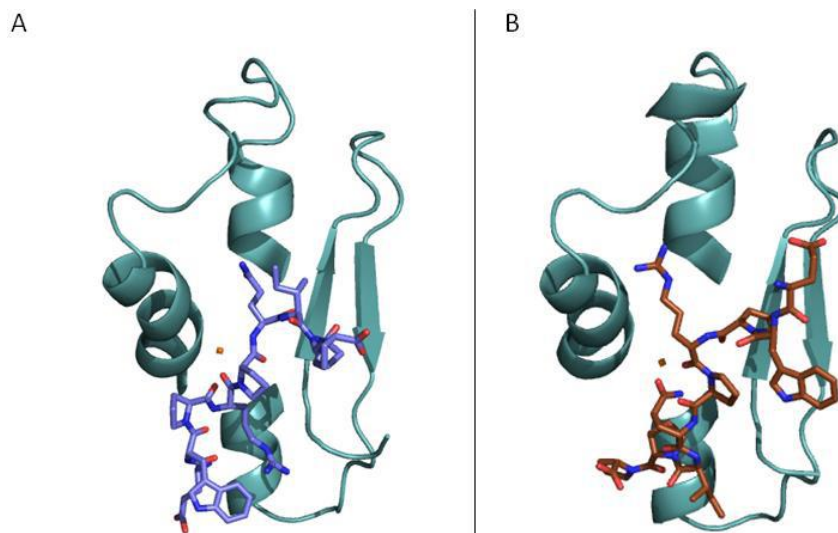


**Figura 43.** Melhor complexo do ALPMHIR com a ECA humana obtido por *docking*. Ligações hidrogênio e coordenação com o zinco pontilhadas em amarelo e resíduos de aminoácidos envolvidos em verde. Os átomos de hidrogênio foram omitidos para melhor visualização. Em lilás os resíduos que compõem o *motif*.

## 5.5.2 Análise das Interações entre os ligantes e a ECA-like BM91

### 5.5.2.1 Nonapeptídeo

Os resultados obtidos do *docking* do nonapeptídeo na ECA-like mostraram que o mesmo ligou no seu sítio de ligação, entretanto, de modo diferente ao que ocorre na enzima de humanos (Figura 44).



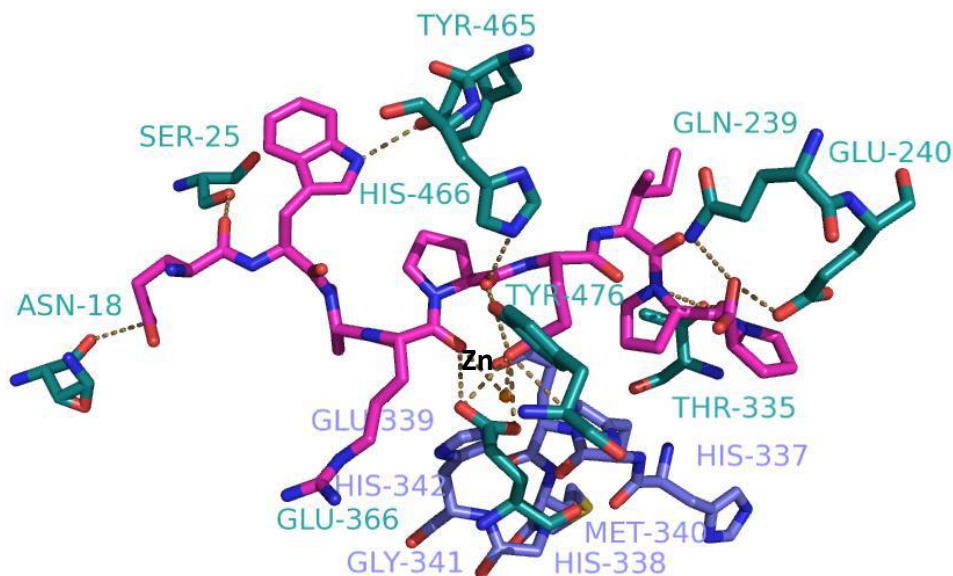
**Figura 44.** Comparação entre a melhor pose do nonapeptídeo com a ECA humana (A) e a melhor pose do mesmo obtida com a ECA BM91 (B).



Foram observadas interações por ligação de hidrogênio entre o nonapeptídeo e os seguintes resíduos aminoácidos da ECA-like BM91: ASN18, SER25, GLN239, GLU240, THR335, GLU366, TYR465, HIS466, TYR476, os resíduos do *motif* HIS338, HIS342 e a coordenação com o átomo de Zn (Figura 45).

A carbonila da arginina apresentou coordenação com o átomo de Zn, o qual também coordenou com os resíduos do *motif* HIS338 e HIS342, assim como na ECA humana.

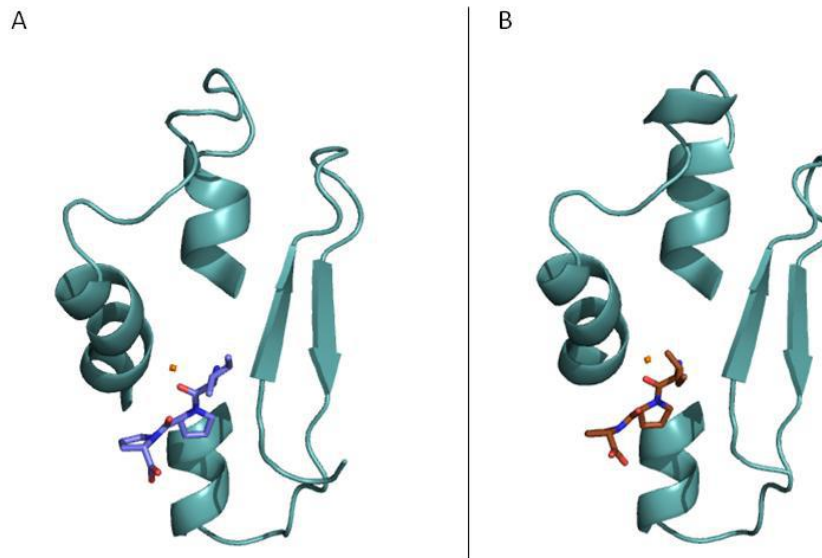
O nonapeptídeo demonstrou maior afinidade pela ECA-like do que pela ECA humana. Isso pode ser explicado pelo fato de o sítio ativo da BM91 ser maior que o da ECA humana. Porém, o nonapeptídeo apresentou os menores valores para ambas as enzimas, o que pode ter ocorrido devido a algum impedimento estérico gerado pela sua cadeia longa.



**Figura 45.** Melhor complexo do nonapeptídeo com a ECA-like BM91 obtido por *docking*. Ligações hidrogênio e coordenação com o zinco pontilhadas em amarelo e resíduos de aminoácidos envolvidos em verde. Os átomos de hidrogênio foram omitidos para melhor visualização. Em lilás os resíduos que compõem o *motif*.

### 5.5.2.2 IPP

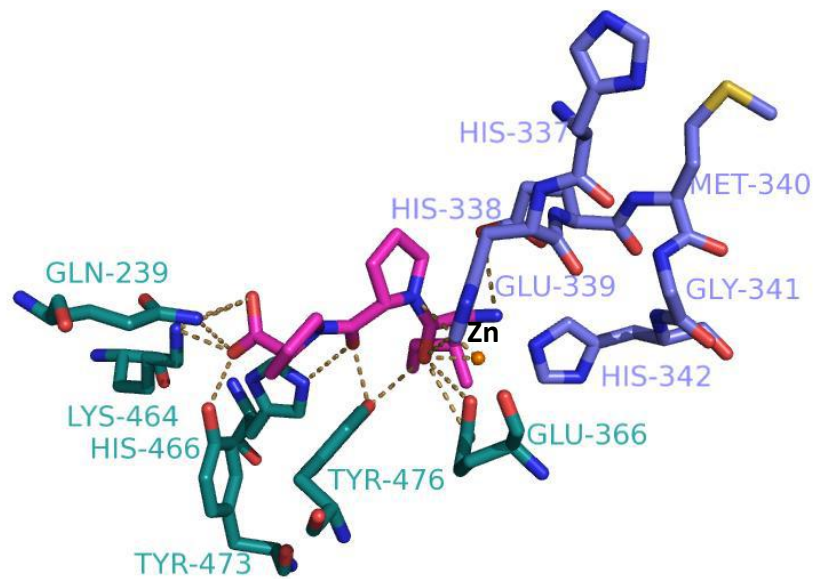
Os resultados obtidos do *docking* do peptídeo IPP na ECA-*like* mostraram que o mesmo ligou no seu sítio de ligação de modo semelhante ao que ocorre na enzima de humanos (Figura 46).



**Figura 46.** Comparação entre a melhor pose do IPP com a ECA humana (A) e a melhor pose do mesmo obtida com a ECA BM91 (B).

Foram observadas interações por ligação de hidrogênio entre a molécula do IPP e os seguintes resíduos aminoácidos da ECA-*like* BM91: GLN239, GLU366, LYS464, HIS466, TYR473, TYR476, os resíduos do *motif* HIS338 e GLU339 e foi observada coordenação com o átomo de Zn (Figura 47).

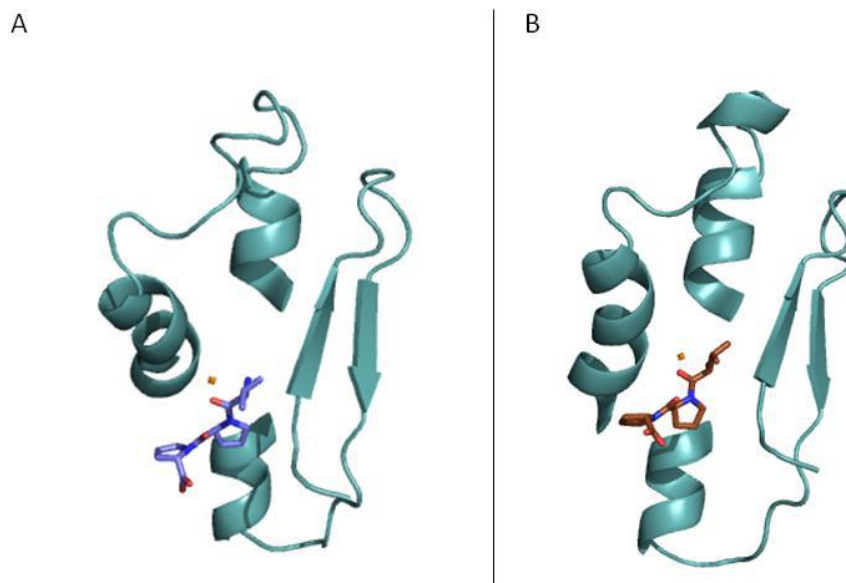
O grupo carboxílico do resíduo de prolina do C-terminal estabeleceu interações por ligação de hidrogênio com a hidroxila da TYR473, e o grupo amino da GLN239 e LYS464. A parte aromática da TYR473 contribuiu para a estabilização. O grupo carbonila da isoleucina interagiu através de ligação de hidrogênio com o resíduo do *motif* HIS338 e também interagiu com os resíduos TYR476 e GLU366 por meio de ligação de hidrogênio, além de coordenar com o Zn. Essas interações mostraram semelhanças às observadas na interação da ECA humana com os inibidores Enalaprilato e Lisinopril.



**Figura 47.** Melhor complexo do IPP com a ECA-like BM91 obtido por *docking*. Ligações hidrogênio e coordenação com o zinco pontilhadas em amarelo e resíduos de aminoácidos envolvidos em verde. Os átomos de hidrogênio foram omitidos para melhor visualização. Em lilás os resíduos que compõem o *motif*.

### 5.5.2.3 VPP

Os resultados obtidos do *docking* do peptídeo VPP na ECA-like mostraram que o mesmo ligou no seu sítio de ligação de modo semelhante ao que ocorre na enzima de humanos (Figura 48).

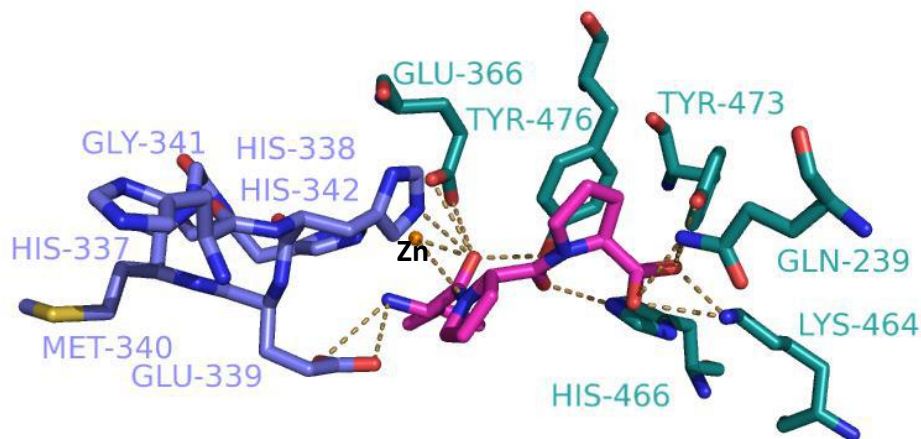


**Figura 48.** Comparação entre a melhor pose do VPP com a ECA humana (A) e a melhor pose do mesmo obtida com a ECA BM91 (B).

Foram observadas interações por ligação de hidrogênio entre a molécula do VPP e os seguintes resíduos aminoácidos da ECA humana: GLN239, GLU366, HIS466, TYR473, TYR476, os resíduos do *motif* HIS338, GLU339 e a coordenação com o átomo de Zn (Figura 49).

O grupo carboxílico do resíduo de prolina C-terminal estabeleceu interações por ligação de hidrogênio com a hidroxila da TYR473, e o grupo amino da GLN239 e LYS464. A parte aromática da TYR473 contribui para a estabilização. O grupo carbonila da valina interagiu através de ligação de hidrogênio com o resíduo do *motif* HIS338 e também interagiu com os resíduos GLU366 e TYR476 por meio de ligação de hidrogênio. Essas interações mostraram semelhanças ao que foi observado na interação da ECA humana com os inibidores Enalaprilato e Lisinopril.

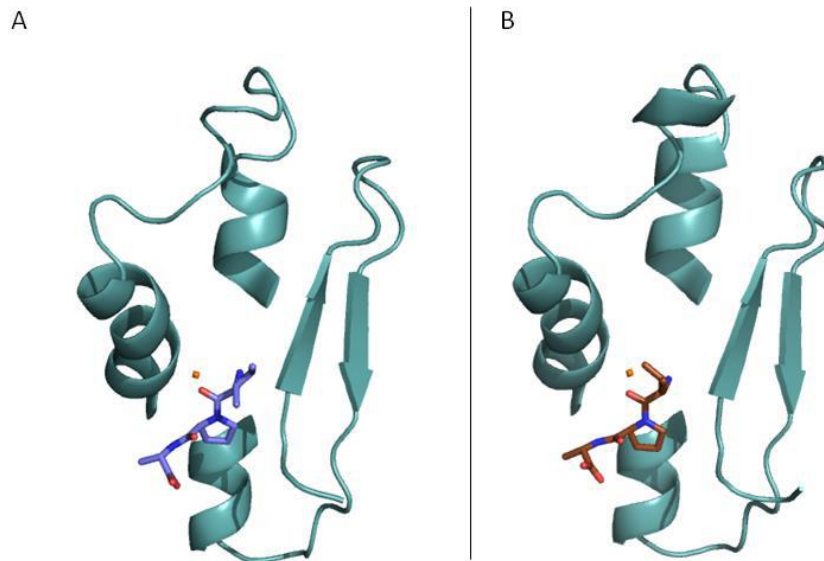
O VPP demonstra a capacidade de coordenar com o íon zinco através do grupo carbonila entre a valina e os resíduos de prolina. A diferença entre a VPP e a IPP, conforme mencionado anteriormente, é o primeiro resíduo de aminoácido, embora ambas valina e isoleucina exibam um caráter hidrofóbico forte, isoleucina possui uma maior flexibilidade e maior volume da cadeia lateral (Pina e Roque, 2008).



**Figura 49.** Melhor complexo do VPP com a ECA-like BM91 obtido por *docking*. Ligações de hidrogênio e coordenação com o zinco pontilhadas em amarelo e resíduos de aminoácidos envolvidos em verde. Os átomos de hidrogênio foram omitidos para melhor visualização. Em lilás os resíduos que compõem o *motif*.

#### 5.5.2.4 IPA

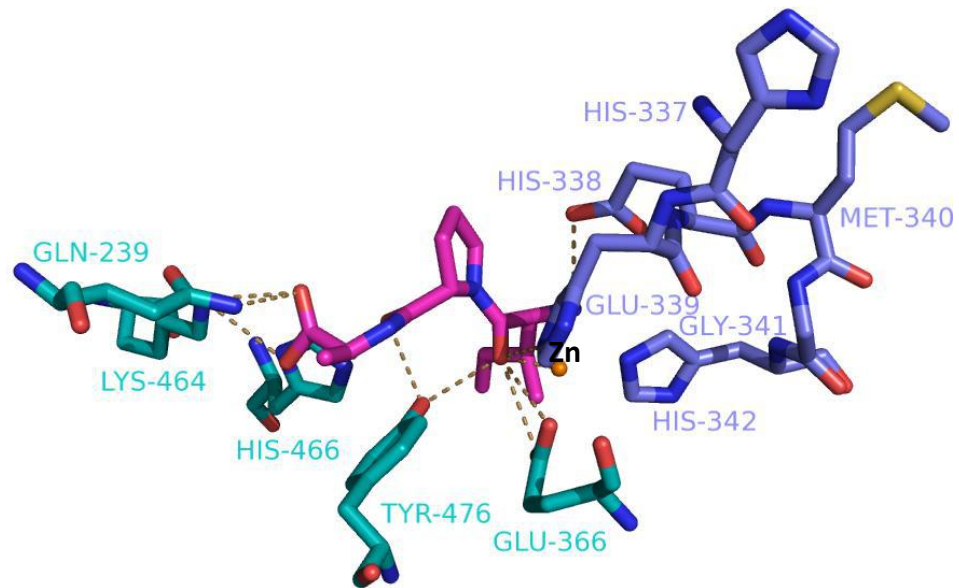
Os resultados obtidos do *docking* do peptídeo IPA na ECA-*like* mostraram que o mesmo ligou no seu sítio de ligação de modo semelhante ao que ocorre na enzima de humanos (Figura 50).



**Figura 50.** Comparação entre a melhor pose do IPA com a ECA humana (A) e a melhor pose do mesmo obtida com a ECA BM91 (B).

Foram observadas interações por ligação de hidrogênio entre a molécula do IPA e os seguintes resíduos aminoácidos da ECA-*like* BM91: GLN239, GLU366, LYS464, HIS466, TYR476, os resíduos do *motif* HIS338, GLU339 e a coordenação com o átomo de Zn (Figura 51).

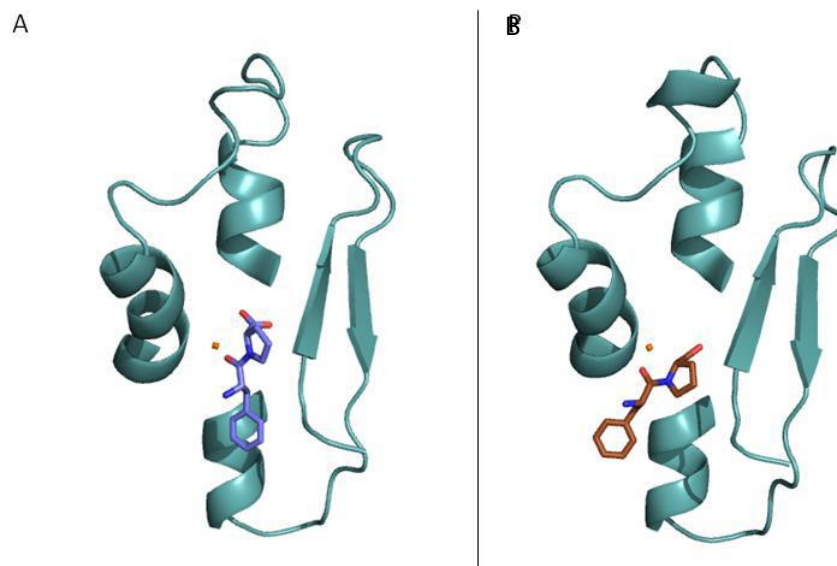
O grupo amino da isoleucina *N*-terminal estabeleceu interações por ligação de hidrogênio com o grupo carboxílico do resíduo GLU339. O grupo carbonila da mesma realizou interações por ligação de hidrogênio com o anel aromático do resíduo do *motif* HIS338, o grupamento carboxílico da GLU366, o grupamento hidroxila da TYR476 e coordenou com o átomo de Zn. O anel aromático da TYR476 contribuiu para a estabilização. Esses dados demonstraram semelhanças ao observado na ECA humana e demonstram ser promissores para a inibição da ECA-*like*.



**Figura 51.** Melhor complexo do IPA com a ECA-like BM91 obtido por *docking*. Ligações hidrogênio e coordenação com o zinco pontilhadas em amarelo e resíduos de aminoácidos envolvidos em verde. Os átomos de hidrogênio foram omitidos para melhor visualização. Em lilás os resíduos que compõem o *motif*.

#### 5.5.2.5 FP

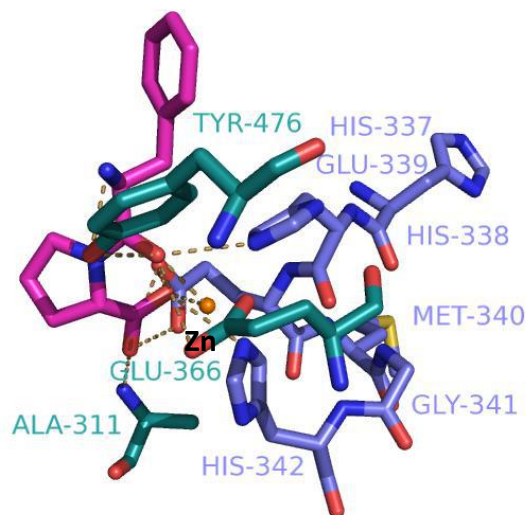
Os resultados obtidos do *docking* do peptídeo FP na ECA-like mostraram que o mesmo ligou no seu sítio de ligação, entretanto, de modo diferente ao que ocorre na enzima de humanos (Figura 52).



**Figura 52.** Comparação entre a melhor pose do FP com a ECA humana (A) e a melhor pose do mesmo obtida com a ECA BM91 (B).

Foram observadas interações por ligação de hidrogênio entre a molécula do FP e os seguintes resíduos aminoácidos da ECA-like BM91: ALA311, GLU366, TYR476, os resíduos do *motif* HIS338, GLU339, HIS342, além de coordenar com o átomo de Zn (Figura 53).

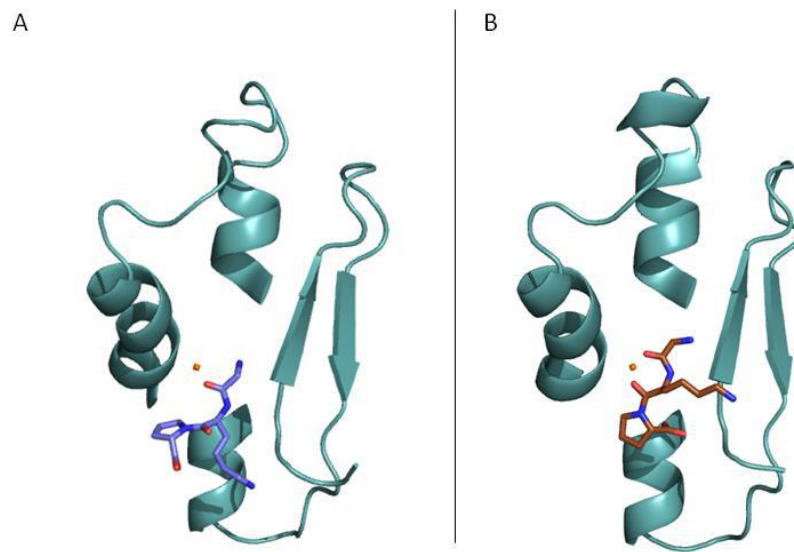
O grupo amino N-terminal da fenilalanina estabeleceu interação por ligação de hidrogênio com a TYR476. Já o grupo carbonila da fenilalanina estabeleceu interação por ligação de hidrogênio com GLU366, TYR476, o resíduo do *motif* HIS338 e coordenou com o átomo de Zn. O que corresponde ao observado na ECA humana.



**Figura 53.** Melhor complexo do FP com a ECA-like BM91 obtido por *docking*. Ligações hidrogênio e coordenação com o zinco pontilhadas em amarelo e resíduos de aminoácidos envolvidos em verde. Os átomos de hidrogênio foram omitidos para melhor visualização. Em lilás os resíduos que compõem o *motif*.

#### 5.5.2.6 GKP

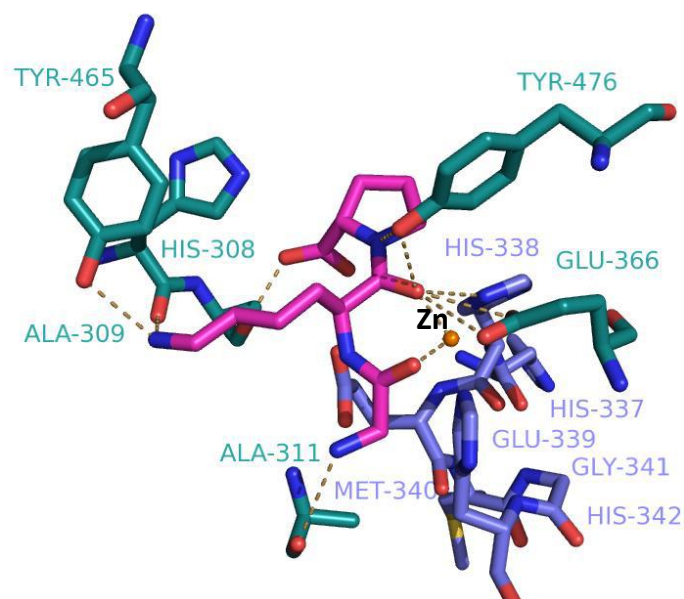
Os resultados obtidos do *docking* do peptídeo GKP na ECA-like mostraram que o mesmo ligou no seu sítio de ligação, entretanto, de modo diferente ao que ocorre na enzima de humanos (Figura 54).



**Figura 54.** Comparação entre a melhor pose do GKP com a ECA humana (A) e a melhor pose do mesmo obtida com a ECA BM91 (B).

Foram observadas interações por ligação de hidrogênio entre a molécula do GKP e os seguintes resíduos aminoácidos da ECA humana: HIS308, ALA309, ALA311, GLU366, TYR465, TYR476, o resíduo do *motif* HIS338 e coordenação com o átomo de Zn (Figura 55).

O grupo amino *N*-terminal da glicina estabeleceu interação por ligação de hidrogênio com o resíduo ALA311. A carbonila da glicina realizou coordenação com o átomo de Zn, como observado também na ECA humana.



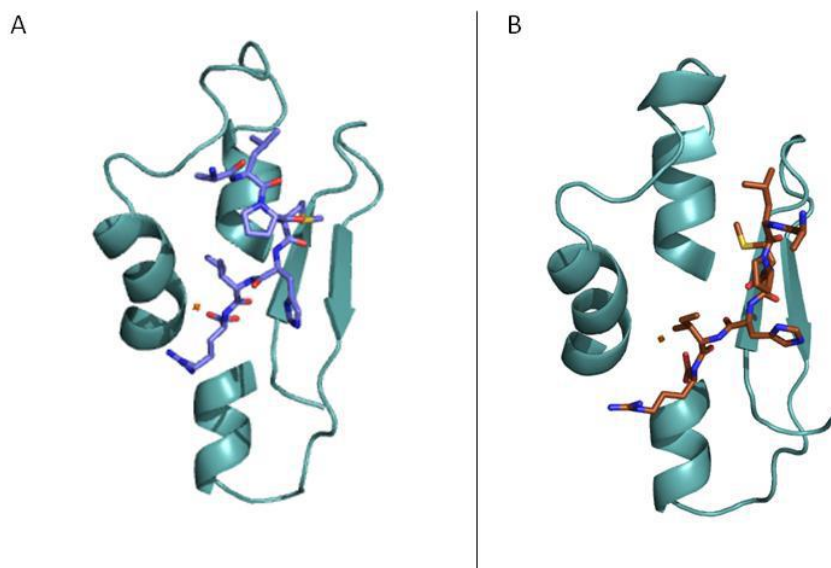
**Figura 55.** Melhor complexo do GKP com a ECA-like BM91 obtido por *docking*. Ligações hidrogênio e coordenação com o zinco pontilhadas em amarelo e resíduos de aminoácidos



envolvidos em verde. Os átomos de hidrogênio foram omitidos para melhor visualização. Em lilás os resíduos que compõem o *motif*.

### 5.5.2.7 ALPMHIR

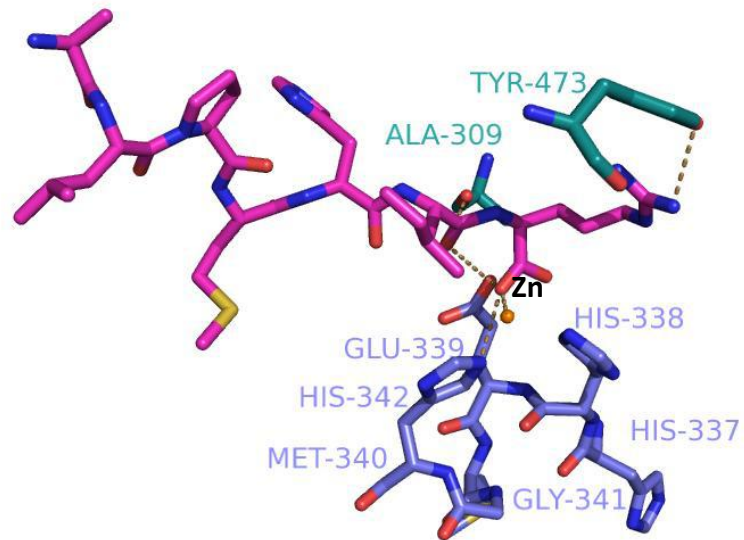
Os resultados obtidos do *docking* do peptídeo ALPMHIR na ECA-*like* mostraram que o mesmo ligou no seu sítio de ligação, entretanto, de modo diferente ao que ocorre na enzima de humanos (Figura 56).



**Figura 56.** Comparação entre a melhor pose do ALPMHIR com a ECA humana (A) e a melhor pose do mesmo obtida com a ECA BM91 (B).

Foram observadas interações por ligação de hidrogênio entre a molécula do ALPMHIR e os seguintes resíduos aminoácidos da ECA-*like* BM91: ALA309, TYR473, os resíduos do *motif* GLU339, HIS342 e coordenação com o átomo de Zn (Figura 57). O grupo carboxila da arginina estabeleceu interações por ligação de hidrogênio com os resíduos do *motif* GLU339, HIS342 e coordenou com o átomo de Zn. O que corresponde ao observado na ECA humana.

O ALPMHIR apresenta resíduos carregados positivamente que contribuem para o potencial de inibição da ECA, tais como o grupo guanidina da arginina no C-terminal (Pina e Roque, 2008).



**Figura 57.** Melhor complexo do ALPMHIR com a ECA-like BM91 obtido por *docking*. Ligações hidrogênio e coordenação com o zinco pontilhadas em amarelo e resíduos de aminoácidos envolvidos em verde. Os átomos de hidrogênio foram omitidos para melhor visualização. Em lilás os resíduos que compõem o *motif*.

## 6. Conclusão

Os resultados obtidos neste estudo mostraram que o *docking* dos inibidores anti-hipertensivos Enalaprilato e Lisinopril foi bem sucedido e sugeriu que a ECA BM91 pode ser inibida por fármacos anti-hipertensivos inibidores da ECA. O Captopril se ligou na ECA BM91 de modo diferente ao que é observado na ECA humana, e isso pode sugerir que o mesmo pode não ser um bom inibidor para a ECA de carrapato ou se ligar de modo diferente.

O substrato Hip-His-Leu realizou interações com a ECA-*like* diferente das observadas na ECA humana e se ligou com menor afinidade, o que sugere que o Hip-His-Leu pode não ser um substrato para a ECA do carrapato.

O inibidor nonapeptídeo também se ligou de modo diferente, e foi o peptídeo com menor afinidade para a ECA-*like*. Os peptídeos de origem alimentar GKP e ALPMHIR realizaram interações com a ECA-*like* semelhantes às observadas na ECA humana apesar do modo de ligação ter sido diferente. Já o IPA não realizou interações conforme a na de humano, porém, demonstrou possuir interações também interessantes para o efeito inibitório dessa molécula.

Tanto os inibidores quanto os peptídeos apresentaram afinidade maior pela ECA-*like* de acordo com os resultados do *docking* molecular, o que pode ter ocorrido, devido o volume do sítio ativo da ECA BM91 ser maior do que o da ECA humana, promovendo um melhor ajuste das moléculas.

Os nossos resultados sugerem que os peptídeos alimentares bioativos têm o potencial para inibir a ECA-*like* com elevada similaridade com o modo de inibição dos fármacos captopril, enalapril e lisinopril. Embora estes peptídeos tenham menor atividade inibitória de ECA em comparação com fármacos anti-hipertensivos comerciais, são derivados de fontes alimentares e provavelmente apresentam menos efeitos adversos para o bovino, por exemplo.

Estes dados abrem novas perspectivas para estudos que possam mostrar afinidade entre outros tipos de inibidores conhecidos de ECA humana, com a ECA-*like* do carrapato *Rhipicephalus microplus*, que sejam potenciais moléculas bioativas com possíveis aplicações biológicas.

## 7. Referências

ACCELRY'S Software Inc. **Weblab Viewer Lite**, v. 04, San Diego: Accelrys Software Inc.

AIKEN, J. W.; VANE, J. R. **The renin-angiotensin system**: inhibition of converting enzyme in isolated tissues. *Nature*. v. 228, p. 30-34, 1970.

AKIF, M; GEORGIADIS, D.; MAHAJAN, A. *et al.* High-Resolution Crystal Structures of *Drosophila melanogaster* Angiotensin-Converting Enzyme in Complex with Novel Inhibitors and Antihypertensive Drugs, **J. Mol. Biol.** v. 200, n. 3, p. 502-517, 2010.

BARRETT, A. J.; RAWLINGS, N. D. Oligopeptidases, and the emergence of the prolyl oligopeptidase family. **Biol. Chem. Hoppe-Seyler**. v. 373, n. 2, p. 353-360, 1992.

BERMAN, H. M. *et al.* The protein data bank. **Nucleic acids research**, v. 28, n. 1, p. 235-242, 2000.

BERNSTEIN, K. E. *et al.* A modern understanding of the traditional and nontraditional biological functions of angiotensin-converting enzyme. **Pharmacol. Rev.** v. 65, n. 1, p. 1-46, 2013.

BIONDO, S. *et al.* Cicatrização de feridas: estudo comparativo em ratos hipertensos não tratados e tratados com inibidora da enzima conversora da angiotensina. **Rev. Col. Bras. Cir.** Rio de Janeiro. v. 33, n. 2, 2006.

BORGES, F.; TORRES, CACHATE, F. R.; NEVES, J. A. Os inibidores da enzima conversora da angiotensina e suas múltiplas ações farmacoterapêuticas, *Circulation*, v.81, n.4, p.1161-72, 2010.

CAMPBELL, D. J. Circulating and tissue angiotensin systems. **J. Clin. Invest.** v. 79, n. 1, p. 1-6, 1987.

CARHAN, A. *et al.* Loss of Angiotensin-converting enzyme-related (ACER) peptidase disrupts night-time sleep in adult *Drosophila melanogaster*. **The Journal of experimental biology**, v. 214, n. 4, p. 680-686, 2011.

CARVALHO, I. *et al.* Introdução a modelagem molecular de fármacos no curso experimental de química farmacêutica. **Química Nova**, v. 26, n. 3, p. 428-438, 2003.

CHAGAS, A. J. S. Controle de parasitas utilizando extratos vegetais. **Rev. Bras. Parasitol. Vet.** v. 13, p. 156-60, 2004.

CHAPPELL, M. C. *et al.* Antihypertensive effects of angiotensin-(1-7). **Brazilian journal of medical and biological research**, v. 31(9), p. 1205-1212, 1998.

CHEN, M.E., CANG, H.X., NYMEYER, H. NOC: Free molecular explorer for protein structure visualization, validation and analysis, 2007.

CLARK, M.; CRAMER, R. D.; VAN OPDENBOSCH, N. Validation of the General Purpose Tripos 5.2 Force Field. **J. Comp. Chem.** v. 10, n. 8, p. 982, 1989.

COHEN, N. C. Guidebook on molecular modeling in drug design. **Academic Press**, p. 361, 1996.

COLLIER, J. G.; ROBINSON, B. F.; VANE, J. R. Reduction of the pressor effects of angiotensin in man by a synthetic nonapeptide (BPP9a or ,SQ 20, 881) which inhibits converting enzyme. **The Lancet** , v. 301, n. 7794, p.72-74, 1973.

CORDOVÉS, C. O. **Carrapato: controle ou erradicação**. Porto Alegre: Guaíba Agropecuária, 1997.

CORNELL, M. J. et al. Cloning and expression of an evolutionary conserved single-domain angiotensin converting enzyme from *Drosophila melanogaster*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 270, n. 23, p. 13613-13619, 1995.

DAS, M.; HARTLEY, J. L.; SOFFER, R. L. Serum angiotensin-converting enzyme. Isolation and relationship to the pulmonary enzyme. **J. Biol. Chem.** v. 252, p. 1316-1319, 1977.

DELANO, W. L. **DeLano Scientific**. San Carlos, CA, 2002.

EKBOTE, U.; COATES, D.; ISAAC, R. E. A mosquito (*Anopheles stephensi*) angiotensin I-converting enzyme (ACE) is induced by a blood meal and accumulates in the developing ovary. **FEBS letters**, v. 455, n. 3, p. 219-222, 1999.

EKBOTE, U. et al. **Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol.** v.134, p. 593-598, 2003.

ESWAR, N. et al. Comparative protein structure modeling using Modeller. **Current protocols in bioinformatics**, 5.6.1-5.6.30, 2006.

FERNANDEZ, J.H. *et al.* Structural basis of the lisinopril-binding specificity in N-and C-domains of human somatic ACE. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 308, n. 2, p. 219-226, 2003.

FERNANDEZ, J. H.; NESHICH, G.; CAMARGO, A. C. M. Using bradykinin-potentiating peptide structures to develop new antihypertensive drugs. **Gen. and Mol. Res.** v. 3, n. 4, p. 554-563, 2004.

FERREIRA, S. H.; SILVA, M. R. Potentiation of bradykinin and eledoisin by BPF (Bradykinin Potentiating Factor) from *Bothrops jararaca* venom. **Experiences**. v. 21, n.6, p. 347-349, 1965.

FRIESNER, R. A., et al. Glide: a new approach for rapid, accurate docking and scoring. 1. Method and assessment of docking accuracy. **J Med Chem**. v. 7, n. 47, p. 1739-1749, 2004.

GOMES, A. **O carrapato do boi, *Boophilus microplus***: ciclo, biologia, epidemiologia, patogenia e controle. Embrapa Gado de Corte EMBRAPA-CNPGC, p. 9-44, 1998.

Gonzales J.C. **O Controle do Carrapato do Boi**. Universidade de Passo Fundo, RS. v.3, n.128, p. 2003.

GOUGH, J. M.; KEMP, D. H. Localization of a low abundance membrane protein (Bm86) on the gut cells of the cattle tick *Boophilus microplus* by immunogold labeling. **The Journal of parasitology**, p. 900-907, 1993.

GRAF, J. F.; GOGOLEWSKI, R.; LEACH\_BING, N. Tick control; an industry point of view. **Parasitol**. v.129, p. 427-442, 2004.

GUIDO, R. V. C.; ANDRICOPULO, A. D. Modelagem molecular de fármacos. **Revista Processos Químicos**, 2008.

GUIMARÃES, J. H. et al. **Ectoparasitos de importância veterinária**. São Paulo: FAPESP – Plêiade, 2001.

HENRIQUES, G. S.; HIRATA, M. H.; COZZOLINO, S. M. F. Recent aspects of zinc absorption and bioavailability and correlations with physiology of the testicular Angiotensin-Converting Enzyme. **Revista de Nutrição**, v. 16, n. 3, p. 333-345, 2003.

HOUARD, X. et al. The *Drosophila melanogaster*-related angiotensin-I-converting enzymes Acer and Ance. **European journal of biochemistry**, v. 257, n. 3, p. 599-606, 1998.

IANZER, S. R. A. S. et al. Do the cardiovascular effects of angiotensin-converting enzyme (ace) involve ace-independent mechanisms? New insights from proline-rich peptides of *Bothrops jararaca*. **J.Pharmacol. Exp. Ther.** v. 322, n. 2, 2007.

IGIC, R., BEHNIA, R. Properties and distribution of angiotensin I converting enzyme. **Curr. Pharm. Des.** v. 9, n. 9, p. 697-706, 2003.

IP, D. P.; BRENNER, G. S. Enalaprilato Maleate, **Analytical Profiles of Drug Substances**. v. 16, p. 207-224, 1987.

JARMEY, J. M. et al. Carboxy dipeptidase from *Boophilus microplus*: A "concealed" antigen with similarity to angiotensin-converting enzyme. **Insect biochemistry and molecular biology**, v. 25, n. 9, p. 969-974, 1995.

JASPARD, E.; WEI, L.; ALHENC-GELAS, F. Differences in the properties and enzymatic specificities of the two active sites of angiotensin I-converting enzyme (kininase II). Studies with bradykinin and other natural peptides. **Journal of Biological Chemistry**. v. 268, n. 13, p. 9496-9503, 1993.

JÓNSDÓTTIR S. O.; JORGENSEN, F. S.; BRUNAK, S. Prediction methods and databases within chemoinformatics: emphasis on drugs and drug candidates. **Bioinformatics**. v. 21, n. 10, p. 2145, 2005.

JONES, G.; WILLETT, P.; GLEN, R. C. Molecular recognition of receptor sites using a genetic algorithm with description of desolvation. **J.Mol. Biol.** v. 245, p. 43, 1995.

JONES, G.; WILLETT, P. Docking small-molecule ligands into active sites. **Current.Opinion on Biotechnology**. v. 6, p. 652, 1995.

JONES, G. *et al.* Development and validation of a genetic algorithm for flexible docking, **Journal of molecular biology**, v. 267, n. 3, p. 727-748, 1997.

KEMP, D. H. *et al.* Vaccination against *Boophilus microplus*: Localization of antigens on tick gut cells and their interaction with the host immune system. **Experimental & applied acarology**. v. 7, p. 43-58, 1989.

LAMANGO, N. S. *et al.* Hydrolysis of Insect Neuropeptides by an Angiotensin-Converting Enzyme From the Housefly *Musca domestica*. **Peptides**, v. 18, n. 1, p. 47-52, 1997.

MACOURS, N.; HENS, K. Zinc-metalloproteases in insects: ACE and ECE. **Insect biochemistry and molecular biology**, v. 34, n. 6, p. 501-510, 2004.

MCKOSKER, P. L. The global importance of Babesiosis. In Babesiosis. Ristic, M., J.P. Kreier, **Academic Press**. New York, 1981.

MIZUNO, S.; YAMAMOTO, N. Antihypertensive peptides from food proteins. **Current topics in biotechnology**. v. 1, p. 43-54, 2004.

MORA-MACIÁ, J. Índice valle-pico (trough to peak). Relevância clínica. **Nefrologia**, v. 16, n. 1, 1996.

NARGOTRA, A. *et al.* *In silico* identification of viper phospholipase A2 inhibitors: validation by in vitro, in vivo studies. **Journal of Molecular Modeling**, 2011.

NARI, A. Strategies for the control of one-host ticks and relationship with tickborne diseases in South America. **Vet. Parasitol.** v. 57, p. 153-165, 1995.

NATESH, R. *et al.* Structural details on the binding of antihypertensive drugs captopril and enalaprilat to human testicular angiotensin I-converting enzyme. **Biochemistry**, v. 43, n. 27, p. 8718-8724, 2004.

NELSON, D. L.; COX, M. **Lehninger: princípios de bioquímica**. 3. ed. São Paulo: Sarvier, 2002.

OIGMAN, W.; FRITSCH, M. T. Drogas que intervêm no sistema renina-angiotensina. **Rev. bras. hipertens**, v. 5, n. 2, p. 84-90, 1998.

ONDETTI, M. A.; CUSHMAN, D. W. Inhibitors of angiotensin converting enzyme. **Biochemical**. New York. p.165–204,1981.

PAN, D. *et al.* The molecular mechanisms of interactions between bioactive peptides and angiotensin-converting enzyme, **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**. v. 21, p. 3898–3904, 2011.

PANCOTE, C. G.; CERA, T. P. Planejamento de fármacos. **Revista Científica Unilago**, 2009.

PARIZI, L. F. *et al.* New approaches toward anti-Rhipicephalus (*Boophilus*) microplus tick vaccine, **Rev. Bras. Parasitol. Vet.** v.18, p. 1-7, 2009.

PEREIRA, M. C. *Boophilus microplus*: Revisão Taxonômica e morfo-biológica-Manual Químico, Divisão de Veterinária. McKosker, P.L. (1981) The global importance of Babesiosis. In: Babesiosis. Ristic, M., J. P. Kreier, **Academic Press**. New York, 1982.

PINA, A. S.; ROQUE, A. C. A. Studies on the molecular recognition between bioactive peptides and angiotensin-converting enzyme, **Journal of Molecular Recognition**. v. 22, p. 162-168, 2008.

RAMALHO, F. S. A regeneração hepática e os inibidores da enzima conversora da angiotensina. **Acta Cirurgica Brasileira**, v. 15, p. 14-17, 2000.

RECK JUNIOR, J. **Farmacologia da saliva do carrapato Rhipicephalus (Boophilus) microplus**: papel da modulação da hemostasia na relação parasito-hospedeiro, 2009.

REGOLI, D.; BARABÉ, J. Pharmacology of bradykinin and related kinins. **Pharmacol. Rev.** v. 32, p. 1-46, 1980.

RIBEIRO, J.; MATHER, T. N. *Ixodes scapularis*: Salivary Kininase Activity Is a Metallo Dipeptidyl Carboxypeptidase. **Experimental parasitology**, v. 89, n. 2, p. 213-221, 1998.

RIVIÈRE, G. Angiotensin-converting enzyme: a protein conserved during evolution. **Journal de la Societe de biologie**, v. 203, n. 4, p. 281-293, 2008.

ROSSEAU, A. *et al.* The hemoregulatory peptide N-acetyl-Ser-Asp-Lys-Pro is a natural and specific substrate of the N-terminal active site of human angiotensin-converting enzyme. **J.Biol. Chem.** v. 270, p. 3656-3661, 1995.



SCALERCIO, S. R. R. A. **Estudo teórico do mecanismo redox de derivados quinolínicos na atividade antimalárica**. 2010. Tese de Doutorado. Dissertação– Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Pará, Belém, 69 f.

SEIFERT, G. W.; SPRINGELL, P. H.; TATCHEL, I. R. J. Radioactive studies on the feeding of larvae, nymphs and adults of the cattle tick *Boophilus microplus* (Canestrini). **Parasitology**. v. 58, p. 415-430, 1968.

SILVA FILHO, M. L. **Avaliação in vitro da ação antiparasitária do extrato aquoso e etanólico do angico preto (*Anadenanthera macrocarpa*) sobre o carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus***, 2007.

SPARTAN '08. Wavefunction, Inc. 18401 Von Karman Avenue, Suite 370. Irvine, California 92612, USA.

STEWART, J. M; FERREIRA, S. H; GREENE, L. J. Bradykinin potentiating peptide PCA-Lys-TRP-Ala-Pro. An inhibitor of the pulmonary inactivation of bradykinin and conversion of angiotensin I and II. **Biochem. Pharmacol.** v. 20, p. 1557-67, 1971.

SUTHERST, R. W. et al. The effect of the cattle tick (*Boophilus microplus*) on the growth of *Bos indicus* x *Bos taurus* steers. **Australian Journal of Agricultural Research**. v. 34, p. 317-327, 1983.

TATEI, K. *et al.* **Race**: a *Drosophila* homologue of the angiotensin converting enzyme. *Mechanisms of development*, v. 51, n. 2, p. 157-168, 1995.

TASI, G. *et al.* Calculation of electrostatic potential maps and atomic charges for large molecules. **Journal of Chemical Information and Computational Science**. n. 33, p. 296-299, 1993.

THIESEN, W. L. Carrapatos e carrapaticidas. **A granja**, Porto Alegre, p. 22-26, 1973.

THOMAS, G. **Fundamentals of medicinal chemistry**. Wiley: West Sussex, 2003.

TURNBULL, I. F. *et al.* Expression and secretion in *Aspergillus nidulans* and *Aspergillus niger* of a cell surface glycoprotein from the cattle tick, *Boophilus microplus*, by using the fungal amdS promoter system. **Applied and environmental microbiology**. v. 56, p. 2847-2852, 1990.

VERDONK, M. L. *et al.* **Proteins**. v. 52, p. 609, 2003.

VIEIRA, L. R. **Enzima conversora de angiotensina e a reprodução do *Rhipicephalus microplus***. Dissertação. Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2011.

WANG, X. *et al.* Inhibitor and substrate binding by angiotensin-converting enzyme: quantum mechanical/molecular mechanical molecular dynamics studies. **Journal of chemical information and modeling**, n. 51(5), p.1074-1082, 2011.

WEI, L. *et al.* The two homologous domains of human angiotensin I converting enzyme interact differently with competitive inhibitors. **J. Biol. Chem.** n. 267, p. 13398-13405, 1991.

WIJFFELS, G. *et al.* Cloning and Characterisation of Angiotensin-Converting Enzyme from the Dipteran Species, *Haematobia irritans exigua*, and Its Expression in the Maturing Male Reproductive System. **European journal of biochemistry**, v. 237, n. 2, p. 414-423, 1996.

WILLADSEN, P. *et al.* Commercialisation of a recombinant vaccine against *Boophilus microplus*. **Parasitology**. v.110, p. 43-50, 1995.

YURIEV, E.; AGOSTINO, M.; RAMSLAND, P. Challenges and advances in computational docking: in review. **Journal of Molecular Recognition**. n. 242, p. 149-164, 2009.