

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
LABORATÓRIO DE BIOQUÍMICA E TOXINAS ANIMAIS - LABITOX
BIOMEDICINA

JOSÉ DIAS MOREIRA NETO

**ANÁLISE DE BIOINFORMÁTICA DA INTERAÇÃO DE OLIGOPEPTÍDEOS RICOS EM
PROLINA ISOLADOS DA PEÇONHA DE *BOTHROPS PAULOENSIS* COM A ENZIMA
CONVERSORA DE ANGIOTENSINA (ECA)**

UBERLÂNDIA

2022

José Dias Moreira Neto

**ANÁLISE DE BIOINFORMÁTICA DA INTERAÇÃO DE OLIGOPEPTÍDEOS RICOS EM
PROLINA ISOLADOS DA PEÇONHA DE *BOTHROPS PAULOENSIS* COM A ENZIMA
CONVERSORA DE ANGIOTENSINA (ECA)**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade Federal de Uberlândia, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Biomedicina.

Orientadora: Prof^ª Dra. Veridiana de Melo Rodrigues Ávila

Coorientador: Prof. Dr. Nilson Nicolau Junior

UBERLÂNDIA

2022

DEDICATÓRIA

- Dedico esse trabalho a minha família, cujo compromisso com minha educação sempre veio em primeiro lugar. Este é o resultado de seus esforços. Com muita gratidão.
- À minha querida avó Norinda (In mem.) e minha tia Jacqueline, que sempre estiveram presentes nos meus sonhos e projetos, nunca deixando de orar por mim.
- A minha namorada Paula, pelo apoio incondicional oferecido em todos os aspectos. Sem ela os resultados não seriam os mesmos.

AGRADECIMENTOS

- Agradeço à professora Dra Veridiana de Melo Rodrigues Ávila, pela influência na minha trajetória através das suas orientações e ensinamentos ao longo de todos os meus anos de faculdade;
- Ao professor Dr Nilson Nicolau Junior, pela orientação e auxílio com os experimentos em bioinformática, fundamentais para o desenvolvimento deste trabalho;
- Ao David Collares Achê, pela amizade e por todo conhecimento compartilhado desde minha chegada ao laboratório;
- Aos amigos e professores do Laboratório de Bioquímica e Toxinas Animais (LaBiTox/UFU), por terem me acolhido e auxiliado durante todo esse processo.

Sumário

DEDICATÓRIA	3
AGRADECIMENTOS	4
LISTA DE ABREVIATURAS	6
LISTA DE FIGURAS E TABELAS	8
Resumo	9
1. Introdução	10
1.1 Hipertensão	10
1.2 Tratamentos medicamentosos	11
1.2.1 Bloqueadores dos Canais de Cálcio	11
1.2.2 Bloqueadores dos Receptores da Angiotensina II	12
1.2.3 Beta Bloqueadores	12
1.2.4 Inibidores da Enzima Conversora de Angiotensina	13
1.3 Sistema Renina-Angiotensina-Aldosterona e sua influência na pressão arterial	14
1.4 Peptídeos Potencializadores de Bradicinina de Peçonhas de Serpentes	15
1.5 Análise Bioinformática	16
2. Justificativa Científica	17
3. Objetivo Geral	18
4. Objetivos Específicos	18
5. Metodologia	18
5.1 Obtenção das sequências dos ORPs	18
5.2. Identificação e Modelagem de Peptídeos	19
5.3. Análise de afinidade do peptídeo-alvo	19
6. Resultados	20
6.1 BLAST das sequências peptídicas	20
6.2 <i>Docking</i> Molecular	21
6.3 Dinâmica Molecular	23
6.3.1 RMSD	24
6.3.2 RMSF	24
6.3.3 Ligações de Hidrogênio	25
7. Discussão	26
8. Referências Bibliográficas	29

LISTA DE ABREVIATURAS

ADH - *Antidiuretic hormone*

AngI - Angiotensina I

AngII - Angiotensina II

Ang1-7 - Angiotensina 1-7

Ang1-9 - Angiotensina 1-9

BB - Betabloqueadores

BCC - Bloqueadores dos canais de cálcio

BKB1R - *Bradykinin type 1 receptor*

BKB2R - *Bradykinin type 2 receptor*

BPP - *Bradykinin potentiating peptide*

BRA - Bloqueadores dos receptores da angiotensina II

DAG - Diacilglicerol

DIU - Diuréticos

ECA1 - Enzima conversora de Angiotensina I

ECA2 - Enzima conversora de Angiotensina II

GPCR - Receptores transmembrânicos acoplados à proteína G

HA - Hipertensão Arterial

iECA - Inibidores da Enzima conversora de Angiotensina

IP3 - Inositol trifosfato

LH - Ligações de hidrogênio

NCBI - National Center of Biotechnology

ON - Óxido nítrico

ORP - Oligopeptídeo rico em prolina

ORP-BP - Oligopeptídeo rico em prolina da peçonha de *Bothrops pauloensis*

PA - Pressão arterial

PDB - *Protein Data Bank*

PEP06 - Peptídeo 06

PIP3 - Fosfatidilinositol trifosfato

PLA2s - Fosfolipases A₂

PLC - Fosfolipases C

RMSD - *Root Mean Square Deviation*

RMSF - *Root Mean Square Fluctuation*

RVP - Resistência vascular periférica

SRAA - Sistema renina angiotensina aldosterona

SUS- Sistema único de Saúde

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

FIGURAS

Figura 1: Esquema da atividade da ECA nos sistemas: Renina-Angiotensina e Calicreína-Cinína.

Figura 2: Imagem do *docking* entre os peptídeos de 1 a 4 com a enzima conversora de angiotensina.

Figura 3: Imagem do *docking* entre os peptídeos ORP-Bp e PEP06 com a enzima conversora de angiotensina.

Figura 4: Diagrama 2D das interações entre a enzima conversora de angiotensina e os peptídeos ORP-Bp e PEP06.

Figura 5: Imagem tridimensional do *docking* dos peptídeos ORP-BP, PEP06 com a enzima conversora de angiotensina.

Figura 6: Gráficos do RMSD dos peptídeos PEP06 e ORP-Bp obtidos através da dinâmica molecular.

Figura 7: Gráficos do RMSF dos peptídeos PEP06 e ORP-Bp obtidos através da dinâmica molecular.

Figura 8: Gráfico comparativo das ligações de hidrogênio do complexo PEP06 e do complexo ORP-Bp.

TABELAS

Tabela 1: Resultados do BLAST de peptídeos obtidos da peçonha de *Bothrops pauloensis* e seus respectivos similares.

Tabela 2: Valores de RMSD obtidos através do HDock avaliados após o docking dos peptídeos obtidos da peçonha de *B. pauloensis* (Achê 2017) com a ECA.

Tabela 3: Desvio Padrão e Média dos valores de RMSD dos peptídeos após a simulação de dinâmica molecular.

Tabela 4: Desvio Padrão e Média dos valores de RMSF dos peptídeos após a simulação de dinâmica molecular.

Tabela 5: Média e desvio padrão dos números de ligações de hidrogênio após a simulação de dinâmica molecular.

Resumo

As peçonhas de serpentes são conhecidas pela sua vasta quantidade de moléculas farmacologicamente ativas, dentre elas oligopeptídeos ricos em prolina (ORPs). Muitos destes peptídeos são classicamente denominados hipotensores por potencializar o efeito da bradicinina quando inibem a enzima conversora de angiotensina (ECA). A peçonha de *Bothrops pauloensis* é uma mistura proteica complexa rica em proteínas e peptídeos, principalmente da classe dos ORPs. Estudos *in silico* utilizando ORPs previamente isolados da peçonha de *B. pauloensis* revelaram a capacidade desses ORPs em interagir com a ECA inibindo competitivamente sua atividade. A literatura tem demonstrado que essa enzima, além de participar da regulação da pressão arterial, também está associada a processos inflamatórios e renais importantes. Assim, o presente estudo teve como objetivo determinar a estrutura tridimensional de seis peptídeos isolados de *B. pauloensis* por meio de estudos de modelagem molecular e *docking*, bem como verificar a sua capacidade de interação dinâmica dos peptídeos com a enzimas ECA através de estudos de dinâmica molecular. Foram observadas melhores interações com a enzima para os peptídeos ORP-Bp e PEP06, sendo que esta última apresentou maior estabilidade no número de ligações hidrogênio com menores níveis de RMSF e RMSD. Desse modo, sugerimos que o PEP06 apresenta melhor afinidade pela ECA e possivelmente é um candidato promissor para a produção de um peptídeo sintético capaz de inibir o domínio C-terminal da ECA. Com estes estudos prévios pretende-se avançar na avaliação do potencial hipotensor de ORPs presentes em peçonhas ofídicas, bem como possibilitar o desenvolvimento de novos fármacos avaliando informações estruturais detalhadas sobre as interações dos complexos proteína-ligante através de ferramentas de bioinformática para o design racional de novos medicamentos.

Palavras-chaves: ECA, hipertensão arterial, hipotensão; *docking*; oligopeptídeos ricos em prolina; peçonha de serpente; dinâmica molecular, bioinformática.

1. Introdução

1.1 Hipertensão

A Hipertensão Arterial (HA) é uma doença crônica não transmissível, qualificada como o principal fator de risco para as enfermidades cardiovasculares (VARVAROUSIS et al., 2020). Ela é caracterizada por uma elevação persistente da pressão sistólica e/ou diastólica para valores acima de 140 mmHg e 90 mmHg, respectivamente. A HA também pode estar associada a desfechos circulatórios fatais, principalmente quando aliada a outros fatores de riscos importantes como: obesidade, sedentarismo e alta ingestão de sódio (LÓPEZ DE FEZ, 2004).

Estudos indicam que quantidades superiores a 5g de sal de cozinha diariamente podem estar relacionados a casos de acidentes vasculares cerebrais e doenças cardiovasculares. Nestes casos pode-se observar um aumento médio da pressão arterial sistólica de 5,5 mmHg enquanto a pressão arterial diastólica pode variar em até 2,5 mmHg (MENTE et al., 2018). Além do sedentarismo e da má alimentação por alta ingestão de sódio, o consumo de álcool foi avaliado em diversos estudos epidemiológicos relacionados a HA, indicando que a ingestão de mais de 210g semanalmente está associada a uma elevação considerável dos níveis pressóricos, principalmente na população acima do peso (FUCHS et al., 2001).

Segundo dados mundiais disponibilizados pela *World Health Organization* (2021) aproximadamente 1,28 bilhão de adultos de 30 a 79 anos possuem hipertensão arterial, sendo que 46% desses adultos não sabem que possuem a doença e apenas 21% realizam tratamentos para manter a doença sob controle. Na maior parte desses casos, a causa da hipertensão está relacionada com o hábito de vida aliado ao envelhecimento, e nesses casos é denominada de hipertensão arterial primária ou sistêmica. (BOLIVAR, 2013). Nesta fase do desenvolvimento humano, as células endoteliais sofrem alterações que resultam em uma maior rigidez arterial ou perda da complacência dos vasos (SAFAR et al., 2018).

Apesar das complicações causadas pela doença, o seu diagnóstico é fácil e apresenta um tratamento eficaz. Por um lado, o tratamento não medicamentoso é realizado com mudança nos hábitos alimentares, perda de peso e na prática de atividades físicas (HALL et al., 2019). Ainda assim, há uma dificuldade diante do tratamento da HA. Por manifestar-se inicialmente de forma assintomática em grande parte da população, o controle da doença tem baixa eficácia, uma vez que a população possui baixa adesão às medidas profiláticas. Sem as medidas profiláticas supracitadas, a doença segue uma evolução silenciosa, alcançando órgãos-alvo como coração, cérebro e rins. Os riscos para eles são, respectivamente: insuficiência cardíaca, acidentes vasculares cerebrais e doenças renais crônicas (BENJAMIN et al., 2018; RUILOPE et al., 1993). Por outro lado, o

tratamento medicamentoso conta com uma grande variedade de fármacos disponíveis que devem ser escolhidos avaliando a individualidade de cada paciente. Esses fármacos possuem a capacidade de interferir em outros sistemas ocasionando efeitos benéficos como: efeito cardioprotetor, antifibrótico e renoprotetor. Porém essa ampla capacidade de interação pode causar efeitos indesejados em alguns pacientes como: angioedema, aumento da atividade nervosa simpática e insuficiência renal. Justificando a necessidade de escolha adequada da droga utilizada (MUNEER; NAIR, 2017; CRUICKSHANK, 2017).

1.2 Tratamentos medicamentosos

Um objetivo imprescindível do tratamento da HA é obter o controle pressórico. Alcançando a meta de pressão arterial (PA), são evitados os danos cardiovasculares, intimamente ligados à morte causada por HA. Em caso de falhas no processo de prevenção da doença, torna-se necessário a utilização de medicamentos que possibilitem essa regulação. A escolha do fármaco deve ser analisada de acordo com variáveis importantes de cada paciente, como: idade, fatores de riscos, associação com outros fármacos (AL GHORANI et al., 2021). Atualmente, possuímos cinco classes principais de eficácia comprovada para o tratamento da hipertensão, são elas: Diuréticos (DIU), Bloqueadores dos Canais de Cálcio (BCC), Inibidores da Enzima Conversora de Angiotensina (IECA), Bloqueadores dos Receptores da Angiotensina II do tipo 1 (BRA) e Betabloqueadores (BB) (BAKHLE, 2020; ELLIOTT; RAM, 2011; MUNEER; NAIR, 2017; BLOWEY, 2016; CRUICKSHANK, 2017).

1.2.1 Bloqueadores dos Canais de Cálcio

Os BCCs atuam através do relaxamento da musculatura lisa vascular bloqueando canais de cálcio presentes nas membranas celulares endoteliais. Desse modo, a deficiência de cálcio intracelular inviabiliza a contração muscular provocando a dilatação dos vasos sanguíneos e, conseqüentemente, uma queda na pressão arterial devido a redução da Resistência Vascular Periférica (RVP) (ELLIOTT; RAM, 2011). No músculo cardíaco podemos observar uma redução nas velocidades de condução atrioventriculares, bem como uma redução na contração do órgão. No rim, os BCCs dilatam as arteríolas aferentes, induzem uma maior excreção de sódio e, portanto, aumentam o fluxo sanguíneo (ABERNETHY; SCHWARTZ, 1999).

Os BCCs são indicados para qualquer grupo de pacientes, pois não sofrem influências de características sexuais, étnicas, etárias ou até mesmo de grande ingestão de sódio. Além disso, os

BCCs possuem baixa meia-vida plasmática, podendo ser associados com outros fármacos para causar o efeito hipotensor desejado (PÓVOA et al., 2014).

1.2.2 Bloqueadores dos Receptores da Angiotensina II

A Angiotensina II (AngII) é um octapeptídeo ativo resultante da clivagem de dois resíduos de aminoácidos C-terminais do decapeptídeo Angiotensina I (AngI), pela ECA. Por se tratar de um hormônio peptídico ativo, a AngII possui como alvo receptores transmembrânicos acoplados à Proteína G, denominados AT1R (CAREY; SIRAGY, 2003). Ao ser formado o complexo hormônio-receptor, ocorrem mudanças conformacionais no receptor induzindo a divisão das subunidades da proteína G por fosforilação. Enquanto a subunidade $G\beta\gamma$ continua na membrana plasmática, a subunidade $G\alpha$ funciona como um segundo mensageiro capaz de ativar Fosfolipases C (PLC) no meio intracelular (WETTSCHURECK; OFFERMANNNS, 2005).

As PLCs, por sua vez, clivam o fosfolipídio de membrana Fosfatidilinositol bifosfato (PIP2) em Diacilglicerol (DAG) e Inositol trifosfato (IP3). Por último, o IP3 alcança e ativa receptores presentes no retículo endoplasmático liso, induzindo a liberação de cálcio intracelular. O cálcio é um dos principais íons responsáveis pela contração dos vasos sanguíneos e, portanto, do aumento da pressão arterial (WETTSCHURECK; OFFERMANNNS, 2005). Os BRAs atuam através do bloqueio dos receptores AT1R impedindo a ligação da AngII, desse modo toda a cascata de reação dependente da proteína G não ocorre, o Ca^{2+} não é liberado e a vasoconstrição é interrompida (MUNEER; NAIR, 2017).

Com o bloqueio de RAT1 a AngII busca por outros alvos celulares ativando os receptores AT2R. Estudos demonstraram que a ativação de AT2R possui como resultado efeitos antifibróticos, anti-inflamatórios e renoprotetores, contrabalanceando os efeitos da ativação do AT1R (CHOW et al., 2014; KOULLIS et al., 2015).

1.2.3 Beta Bloqueadores

Os Betabloqueadores (BB) são divididos em três principais grupos: betabloqueadores não-seletivos, betabloqueadores cardiosseletivos e betabloqueadores vasodilatadores. Os não seletivos são responsáveis por bloquearem tanto receptores $\beta 1$ presentes na musculatura cardíaca quanto receptores $\beta 2$ presentes na musculatura lisa vascular. Já os cardiosseletivos são responsáveis apenas pelo bloqueio dos receptores $\beta 1$. Por último, os vasodilatadores atuam nos receptores $\beta 1$ e possuem atividade vasodilatadora. Independente da classe do BB, o principal efeito observado com o

bloqueio dos receptores Beta-adrenérgicos é a inibição das atividades das catecolaminas endógenas, diminuindo também o débito cardíaco e a secreção de renina (OLIVER et al., 2019).

1.2.4 Inibidores da Enzima Conversora de Angiotensina

Os Inibidores da Enzima Conversora de Angiotensina (iECA) são a classe de fármacos que possuem como mecanismo de ação a inibição do Sistema Renina-Angiotensina Aldosterona (SRAA) por meio de uma inativação da ECA. Essa inibição impede a formação de angII e seus efeitos vasoconstritores ao se ligarem a AT1R, que em condições normais ocasionam em aumento da pressão arterial (BAKHLE, 2020).

Além disso, estudos associam essa classe de fármacos como renoprotetores capazes de reduzir a perda crônica da função renal. Também são relevantes na nefropatia diabética, indicados em alguns casos, como medidas profiláticas tanto para evitar complicações causadas por eventos cardiovasculares, quanto para prevenir possíveis alterações renais em pacientes com *Diabetes Mellitus* tipo 1 e tipo 2 (MA et al., 2010; RUGGENENTI, 2017). A ação dos iECA não se restringe apenas ao SRAA, uma vez que a ECA é a principal enzima responsável pela degradação da bradicinina (Arg-Pro-Pro-Gly-Phe-Ser-Pro-Phe-Arg) em metabólitos inativos (MOREAU et al., 2005). Sabe-se que alterações desse sistema podem levar ao desenvolvimento de fisiopatologias cardiovasculares tal como a hipertensão arterial. (TE RIET et al., 2015).

A inibição da ECA pode ser alvo para a potencialização dos efeitos hipotensores e inflamatórios da bradicinina nos receptores transmembrana acoplados à proteína G (GPCR) B1 (BKB1R) e B2 (BKB2R). Isto resulta na estimulação da produção de Óxido Nítrico (ON) e Prostaciclina (QADRI; BADER, 2018; HANNAN et al., 2003). Em casos mais comuns são relatados como efeitos colaterais do uso de iECA a tosse seca, associado ao aumento dos níveis de bradicinina. Já em menor frequência podemos observar a presença de angioedema (MONTINARO; CICARDI 2020; ACHÊ, 2017).

Alguns estudos sugerem que os inibidores da ECA podem estar relacionados com a prevenção da doença de Alzheimer (DA). Essa sugestão é baseada na ativação dos RAT1 pela AngII, associada a fatores como: aumento do estresse oxidativo, alterações cognitivas e danos cerebrais (PANAHPOUR et al., 2014; NAKAGAWA et al., 2017; PRUSTY et al., 2017). Além disso, a ativação desse receptor induz a formação de placas senis através dos peptídeos A β . Com a inibição da ECA foi possível avaliar uma redução da formação da proteína beta-amilóide, diminuindo os riscos de DA (ABDALLA et al., 2013).

A enzima homóloga da ECA, a ECA2, pode hidrolisar os peptídeos A β (mais neurotóxicos) em peptídeos amilóides menos neurotóxicos. Essa redução ocasiona em uma baixa agregação dos peptídeos, impedindo a formação de placas senis (WELANDER et al., 2009).

O sistema calicreína-cinina, também influenciado pela inibição da ECA, consiste, resumidamente, em uma cascata de reações iniciadas com a clivagem do cininogênio de alto peso molecular pela enzima calicreína para formar a bradicinina. A bradicinina possui uma meia vida muito curta, sendo degradada por cinases I e II e aminopeptidases plasmáticas (BHOOLA et al., 1992; KAYASHIMA et al., 2012). Os primeiros inibidores naturais da ECA descritos foram isolados a partir da peçonha de *Bothrops jararaca* (FERREIRA, 1965). Foi um destes peptídeos isolados da peçonha o utilizado como modelo molecular estrutural para o desenvolvimento do medicamento amplamente comercializado Captopril[®] (ONDETTI et al., 1977). Esses iECA são capazes de atuar tanto no sistema renina-angiotensina-aldosterona, quanto no sistema calicreína-cinina, produzindo efeitos hipotensores e cardioprotetores (TOM et al., 2003).

1.3 Sistema Renina-Angiotensina-Aldosterona e sua influência na pressão arterial

O SRAA é uma cascata de reações fundamentais para a regulação da pressão arterial e do balanço de sódio. A diminuição da pressão arterial causa uma redução na perfusão renal. Esta redução, por sua vez, é detectada nas arteríolas eferentes por mecanorreceptores renais, ativando o SRAA para normalizar a pressão arterial. As reações do SRAA têm início na conversão da pró-enzima pró-renina em renina nas células justaglomerulares renais (ICHIHARA et al., 2004).

Conforme representado na Figura 1, a renina é uma enzima que catalisa a conversão do angiotensinogênio – uma proteína globular de origem hepática – em AngI, um decapeptídeo inativo que posteriormente é clivado em sua porção C-terminal pela ECA1 para dar origem a um octapeptídeo denominado AngII. A AngII possui uma grande variedade de funções, são elas: estímulo a síntese e secreção de aldosterona nas células da zona glomerulosa do córtex das adrenais causando uma maior reabsorção de sódio; estímulo do centro da sede no hipotálamo para induzir uma maior ingestão de água; estímulo da secreção de hormônio antidiurético (ADH) para aumentar a reabsorção de água nos ductos coletores; ativação de receptores transmembrânicos RAT1 nos vasos ocasionando vasoconstrição através da liberação de Ca²⁺ dos retículos endoplasmáticos lisos (PAUL et al., 2006).

A ECA apresenta dois domínios considerados homólogos, porém com funções distintas. Enquanto o domínio C-terminal da enzima está majoritariamente relacionado com a manutenção da pressão arterial, o domínio N-terminal apresenta-se como responsável pela regulação da

proliferação de células tronco hematopoiéticas (POLAKOVIČOVÁ; JAMPÍLEK, 2019). Desse modo, é possível explorar o desenvolvimento de drogas seletivas para cada domínio da ECA a fim de produzir o efeito desejado com o menor número de efeitos adversos. Sabe-se sobre os efeitos hipotensores dos inibidores da ECA, porém uma inibição do domínio N está associada ao desenvolvimento de fármacos antifibróticos (RAMASAMY et al., 2021).

Apesar da homologia estrutural entre as enzimas ECA e ECA2, apresentando aproximadamente 42% de identidade entre seus sítios catalíticos (DONOGHUE et al., 2000), a ECA possui ações fisiológicas opostas à ECA2. A primeira é uma carboxipeptidase capaz de converter o substrato AngI em AngII, provocando efeitos hipertensores no organismo. A ECA2 é uma metaloprotease dependente de zinco encarregada da catálise da hidrólise do substrato AngII em Ang1-7, um potente vasodilatador responsável por efeitos hipotensores e fundamental para a regulação da função cardíaca (FERRARIO et al., 2005; PATEL et al., 2016).

A ECA2 pode utilizar como substrato tanto a AngI quanto a AngII, sendo que a eficiência catalítica da enzima é 400 vezes maior para o segundo substrato. Quando a ECA2 utiliza a AngI como substrato, o produto resultante dessa degradação é a Ang1-9. Porém, quando o substrato é a AngII, o produto final é a Ang1-7 (RICE et al., 2004; VICKERS et al., 2002). A Ang1-7 atua ativando receptores denominados MasR. Essa ativação é responsável por efeitos opostos aos observados pela AngII no organismo, sendo os principais efeitos os cardioprotetores e antifibróticos através da redução da fibrose cardíaca com a inibição da expressão de colágeno (GIANI et al., 2010).

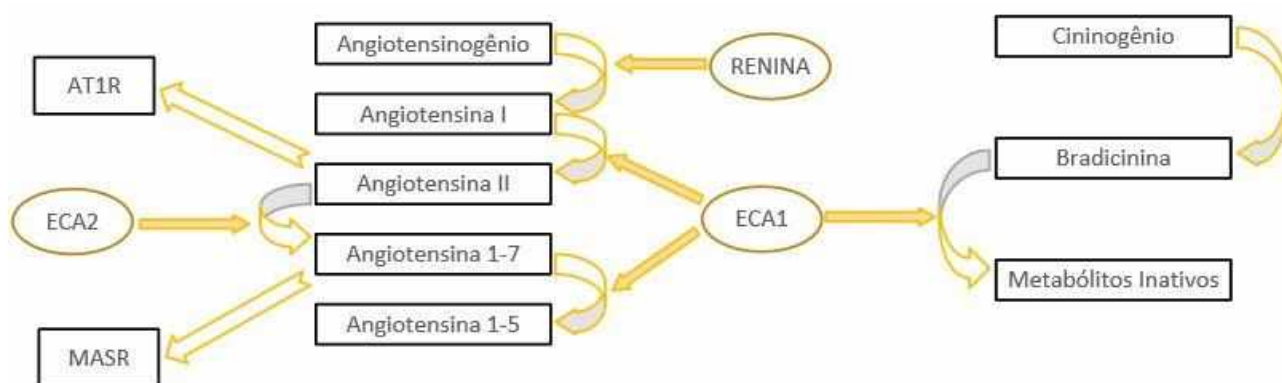


Figura 1: Esquema da atividade da ECA nos sistemas: Renina-Angiotensina e Calicreína-Cinína.

1.4 Peptídeos Potencializadores de Bradicinina de Peçonhas de Serpentes

O estudo de peçonhas de serpentes utilizadas para fins terapêuticos vem ganhando reconhecimento científico pela presença de uma variedade de moléculas bioativas que caracterizam

a sua complexidade molecular (LI et al., 2018; LU et al., 2005). A composição bioquímica das peçonhas ofídicas é uma mistura complexa de componentes inorgânicos e orgânicos. Dentre os compostos orgânicos, destacam-se as proteínas e peptídeos com ou sem atividade enzimática. As principais enzimas são: fosfolipases A₂ (PLA₂s), metaloproteases, serinoproteases, L-aminoácido oxidases, hialuronidases, dentre outras. Os principais peptídeos encontrados nessas peçonhas são as desintegrinas e os peptídeos potencializadores de bradicinina (LU et al., 2005; TASOULIS; ISBISTER, 2017; XU et al., 2015).

Os peptídeos potencializadores de bradicinina, denominados BPPs, receberam esse nome por inibirem a atividade da ECA, o que acarreta na potencialização da atividade hipotensora da bradicinina (XU et al., 2015). Os BPPs possuem uma grande quantidade de resíduos de Prolina na sua estrutura, tal característica fez com que eles sejam atualmente denominados de ORPs ou PROs (do inglês *Proline-rich oligopeptides*). Além disso, os ORPs apresentam uma sequência Ile-Pro-Pro conservada no domínio C-terminal (KODAMA et al., 2015), capaz de interagir com alta afinidade com o domínio C-terminal da ECA1, inibindo a formação de AngII a partir do substrato AngI influenciando tanto no sistema SRAA, quanto no sistema caliceína-cinina (TOM et al., 2003). É importante ressaltar que os BPPs são seletivos para a ECA, portanto não inibem a atividade da ECA2 (DONOGHUE et al., 2000).

Mesmo com sequências similares, os BPPs possuem atividades variadas no organismo. Em um estudo realizado por Munawar e colaboradores (2022) foram sintetizados BPPs e administrados para ratos comparando os efeitos com o Lisinopril. Após 15 dias foram avaliadas amostras de sangue e tecido dos ratos. Enquanto o Lisinopril aumentou os níveis de creatinina no organismo os Peptídeos II (ZNWPHPQIPP) e IV (ZQWAQGRAPHPP) além de apresentarem baixa toxicidade foram capazes de interagir com a ECA sem alteração dos níveis de creatinina, produzindo um efeito nefroprotetor.

1.5 Análise Bioinformática

A Dinâmica Molecular (DM) é uma técnica muito versátil que pode ser empregada para o estudo de novas drogas, sendo utilizada como ferramenta para facilitar a análise de várias moléculas e seus alvos celulares. Seus experimentos utilizam de fundamentos baseados no comportamento dinâmico dos átomos para sugerir diversas possibilidades de interações entre as moléculas. Para determinar os resultados da DM, são considerados fatores importantes para a mecânica molecular, tais como: energia livre entre o ligante e o seu alvo, entropia, pressão, volume, temperatura, entre outros (ADCOCK; MCCAMMON, 2006; HANSSON, 2002).

Esses fatores são controlados durante a simulação com o intuito de minimizar a energia livre, evitando maus contatos entre os átomos através de um equilíbrio do sistema. A minimização de energia pode ser entendida como uma otimização da geometria atômica, buscando um conjunto de coordenadas nas quais a energia potencial do sistema avaliado seja a menor possível. Para tal são utilizados algoritmos de minimização capazes de relaxar as distorções nas ligações químicas e nos contatos de Van der Waals (KARPLUS; MCCAMMON, 2002).

Após a minimização da energia do sistema, podemos determinar a temperatura na qual a simulação irá ocorrer para buscar um equilíbrio termodinâmico. Isso é possível já que no início de uma simulação de dinâmica molecular as condições do sistema não estão alinhadas com o equilíbrio termodinâmico, sendo necessário o processo de equilibração antes da realização da simulação. Por último é necessário realizar o processo de solvatação do sistema para avaliar o papel da água na ligação. Desse modo, as técnicas de dinâmica molecular empregadas são capazes de flexibilizar a interação dos ligantes com seus respectivos alvos possibilitando uma melhor ligação (ADCOCK; MCCAMMON, 2006). Quando a dinâmica molecular é utilizada em conjunto com outras técnicas de bioinformática, como por exemplo o *docking molecular*, há um melhor entendimento das interações entre o ligante e seu alvo, facilitando o *design* racional de novos fármacos (ALONSO et al., 2006).

2. Justificativa Científica

A peçonha de *Bothrops pauloensis* é composta por componentes bioativos capazes de induzir diversos efeitos locais e sistêmicos como alterações da hemostasia, indução de edema, inflamação, e mionecrose, efeitos comuns no envenenamento botrópico (MARINHO et al., 2021; RODRIGUES et al., 2004; COSTA et al., 2009; OLIVEIRA et al., 2009; ACHÊ et al., 2015; RODRIGUES et al., 2015). Vale ressaltar que toxinas isoladas da peçonha têm demonstrado alto potencial terapêutico e farmacológico (RODRIGUES et al., 2015, AZEVEDO et al., 2016). Achê (2017) padronizou o processo de isolamento e caracterizou estruturalmente diferentes ORPs da peçonha de *Bothrops pauloensis*, sendo que um destes denominado ORP-Bp foi capaz de potencializar e prolongar o efeito edematogênico da bradicinina *in vivo*. Estudos *in vitro* com ECA pulmonar de ratos utilizando o Captopril® como controle positivo, indicaram a capacidade do ORP-Bp em realizar a inibição da ECA em diferentes concentrações.

Assim, a continuidade desses estudos torna-se importante do ponto de vista científico, uma vez que os BPPs vêm demonstrando um grande potencial terapêutico no que diz respeito à atividade hipotensora (ACHÊ, 2017). Além disso, é necessário avaliar os impactos causados pela inibição específica dos domínios C e N da ECA no controle da pressão arterial, tornando possível o

desenvolvimento de novos fármacos seletivos para cada domínio, reduzindo efeitos colaterais indesejados.

3. Objetivo Geral

O presente trabalho teve como objetivo analisar as sequências primárias de peptídeos ricos em prolina obtidos da peçonha da serpente *Bothrops pauloensis*, e avaliar *in silico* suas respectivas interações com a enzima conversora de angiotensina.

4. Objetivos Específicos

- Predizer as estruturas tridimensionais dos ORPs obtidos da peçonha de *Bothrops pauloensis*;
- Avaliar *in silico* a interação dos peptídeos obtidos com a enzima conversora de angiotensina (ECA);
- Selecionar um peptídeo que possua maior afinidade e estabilidade pela ECA.

5. Metodologia

5.1 Obtenção das sequências dos ORPs

As sequências dos peptídeos utilizadas para os ensaios de dinâmica molecular e *docking* propostos neste estudo foram inicialmente obtidas do trabalho de Achê (2017) em parceria com o Laboratório Allergy and Therapy da Universidade de Salzburg da Áustria.

Sequência PEP01:

QSWPGPNIPPQQWAQGGWPRPGPEIPPNWPHPQIPPQGRAPHPPPI

Sequência PEP02:

QQWAQGGWPRPGPEIPPNWPHPQIPPQPPPRPQIPPQGRAPHPPPI

Sequência PEP03:

QQWAQGGWPRPGPEIPPNWPHPQIPPQWAQARPPHPP

Sequência PEP04:

SWPGPNIPQLLVQQWAQGGWPRPGPEIPPNWPHPQIPPQWAQARPPHPP

Sequência PEP05 (ORP-Bp):

QWAQWPRPTPQIPP

Sequência PEP06:

QGGLPRPGPEIPP

5.2. Identificação e Modelagem de Peptídeos

As sequências primárias dos seis peptídeos ORPs da peçonha de *Bothrops pauloensis* foram submetidas a uma comparação contra o banco de dados de proteínas disponibilizado pelo National Center of Biotechnology (NCBI), utilizando a ferramenta *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) (ALTSCHUL et al., 1990). A identificação das sequências similares ocorreu por meio da identidade e cobertura do alinhamento entre os peptídeos e seus similares. Posteriormente, as estruturas tridimensionais dos peptídeos foram geradas através do software Discovery Visualizer para permitir uma maior liberdade de interação entre as estruturas peptídicas e a ECA.

5.3. Análise de afinidade do peptídeo-alvo

Com o intuito de identificar as interações entre os peptídeos e a ECA, foi realizada uma ancoragem molecular utilizando o programa HDock (YAN et al., 2020). Este programa utiliza modelos tridimensionais dos peptídeos previamente gerados e a estrutura da proteína ECA, disponibilizada no *Protein Data Bank* através de estudos de cristalografia de raios-x, cuja referência é #3BKK, para determinar possíveis interações e sítios de ancoragem do peptídeo com a enzima. As possibilidades de interação são ranqueadas de acordo com uma pontuação que avalia também o RMSD das moléculas envolvidas no *docking*. Os PDBs com melhor pontuação de cada peptídeo foram submetidos a uma simulação no *software* LigPlot para gerar diagramas esquemáticos das ligações realizadas entre os peptídeos e a ECA (WALLACE et al., 1995).

Por fim, os complexos gerados na ancoragem foram submetidos a Dinâmica Molecular (DM) por meio do programa GROMACS 2016 (ABRAHAM et al., 2015) através de linhas de comando. A DM dos complexos foi realizada usando o campo de força CHARMM27 com modelo de água TIP3P. A célula unitária da DM utilizada possuía forma triclínica e foram adicionados água e íons ao sistema. Após as fases de minimização e equilíbrio, as soluções foram submetidas a 100 ns de simulação durante a fase produção sob condições NTP. A fim de avaliar a estabilidade dos ligantes, o resultado da dinâmica foi avaliado através de ferramentas fornecidas pelo programa GROMACS. As análises realizadas são: o desvio da média quadrática (RMSD), flutuação da média quadrática (RMSF), o número de ligações de hidrogênio e a energia livre entre o ligante e o alvo ao longo da dinâmica. Toda a simulação de dinâmica molecular foi realizada no servidor da Universidade Federal de Uberlândia.

6. Resultados

6.1 BLAST das sequências peptídicas

O BLAST realizado revelou semelhança com peptídeos potencializadores de bradicinina e peptídeos natriuréticos do tipo C de outras peçonhas de serpentes, ambas do gênero *Bothrops*. Os quatro primeiros peptídeos avaliados possuem sequências de aminoácidos maiores em comparação aos dois últimos. Além disso, os peptídeos ORP-Bp e PEP06, foram os únicos que indicaram semelhança apenas com peptídeos potencializadores de bradicinina, apresentando 100% de cobertura e identidade com BPPs de *Bothrops jararaca* (Tabela 1).

Tabela 1: Resultados do BLAST das sequências de peptídeos obtidos da peçonha de *B. pauloensis* (ACHÊ 2017), foram selecionados os melhores *hits* de cada peptídeo.

Peptídeo	Sequência(query)	Subject	Score	E-value	Identidade	Descrição	Cobertura
Pep1	QSWPGPNIPPQ QWAQGGWPRP GPEIPPNWPHQ IPPQGRAPHPPPI	Q6LEM5	267	7.9e-28	69,8%	Bradykinin-potentiating peptide and C-type natriuretic peptides. (<i>B. Jararaca</i>)	100%
Pep2	QQWAQGGWPR PGPEIPPNWPHP QIPPGPPRPQIP PQGRAPHPPPI	P68515	253	8.6e-26	50.6%	Bradykinin-potentiating and C-type natriuretic peptides. (<i>B. insularis</i>)	86%
Pep3	QQWAQGGWPR PGPEIPPNWPHP QIPPQWAQARP PHPP	Q7T1M3	226	1.6e-22	55.2%	Bradykinin-potentiating and C-type natriuretic peptides isoform 2 (<i>B. jararacussu</i>)	86%
Pep4	SWPGPNIPQLL VQQWAQGGWP RPGPEIPPNWPH PQIPPQWAQA RPPHPP	Q7T1M3	309	8.4e-35	62.0%	Bradykinin-potentiating and C-type natriuretic peptides isoform 2 (<i>B. jararacussu</i>)	89%
ORP	*QWAQWRPTP QIPP	P85163	119	3.3e-9	100.0%	Bradykinin-potentiating peptide 14a (<i>B. jararaca</i>)	100%
Pep6	*QGGLPRPGPEI PP	P85169	97	1.2e-5	100.0%	Bradykinin-potentiating peptide 13b (<i>B. jararaca</i>)	100%

(*) Peptídeos com resíduo de piroglutamato no N-terminal.

6.2 Docking Molecular

Os *dockings* das estruturas dos peptídeos obtidos de *B. pauloensis* foram realizados através do Hdock (YAN et al., 2020). Destas análises foram selecionadas as primeiras ancoragens com maior pontuação de cada peptídeo, determinadas pela menor energia livre entre os ligantes. Os valores de RMSD apresentados referem-se à comparação entre a ligação similar, fornecida pelo docking, e a ligação do peptídeo analisado. Os peptídeos de 1 a 4 apresentaram valores de RMSD mais elevados, superando 80 Å , enquanto os peptídeos ORP-BP e PEP04 apresentaram 31,39 e 24,83 Å respectivamente (Tabela 2). Além disso, como pode ser verificado na Figura 2, os peptídeos de 1 a 4 se ligaram na parte externa da enzima em lugares aleatórios com grande parte da sequência de aminoácidos não interagindo com a ECA. Já o ORP-Bp e PEP06, apresentaram boa afinidade com a enzima, interagindo com sítios específicos localizados no domínio C (Figura 2).

Os peptídeos ORP-Bp e PEP06 apresentaram durante o docking similaridade de 71.4% e 72.7%, respectivamente com um peptídeo da peçonha da serpente *Gloydius blomhoffii* identificado como inibidor da ECA através de estudos com cristalografia de raios-x (MASUYER, et al 2012). Estes três peptídeos foram utilizados para estudos de *docking* com a ECA (3BKK) (Figura 3). Como pode ser observado, os três peptídeos ancoram no pocket localizado no domínio C da ECA. Essa região é responsável pela inibição da capacidade da enzima em converter AngI em AngII.

Tabela 2: Valores de RMSD dos ligantes, obtidos através do HDOCK avaliados após o docking dos peptídeos obtidos da peçonha de *B. pauloensis* (Achê 2017) com a ECA.

Peptídeos	RMSD (Å)
PEP01	81.35
PEP02	87.38
PEP03	129.51
PEP04	158.13
ORP-BP	31.39
PEP06	24.83

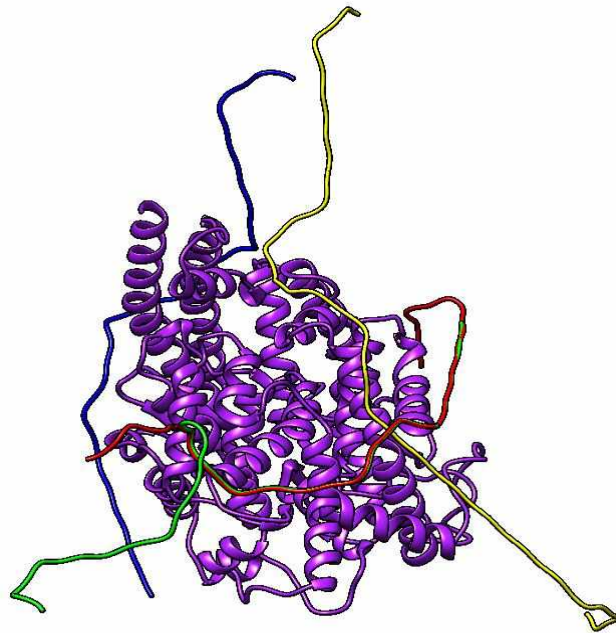


Figura 2: Imagem sobreposta do docking dos peptídeos: PEP01 (vermelho), PEP02 (verde), PEP03 (azul) e PEP04 (amarelo) com a ECA (roxo) desenvolvida através do *software* Chimera v1.16 (PETTERSEN et al., 2004). Os peptídeos se ligaram a sítios inespecíficos e aleatórios da enzima.

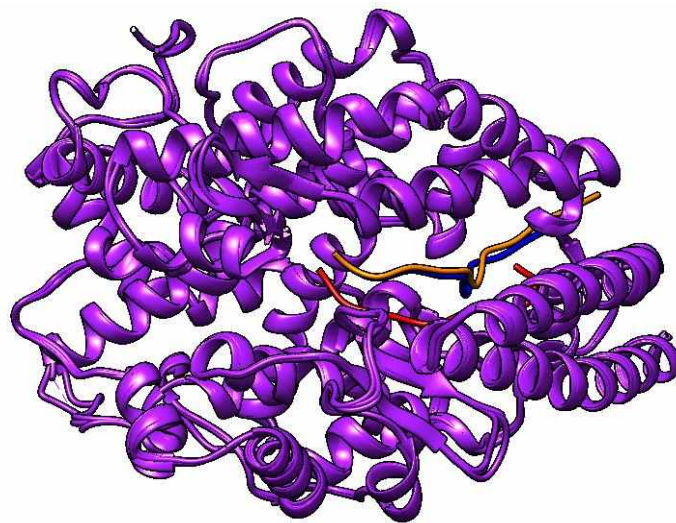


Figura 3: Imagem sobreposta do *docking* molecular do PEP06 (azul), ORP-Bp (laranja) e do BPP de *Gloydus blomhoffii* #4APJ (vermelho) com a ECA (roxo), desenvolvida através do *software* Chimera v1.16 (PETTERSEN et al., 2004).

Para avaliar quais aminoácidos dos BPPs realizam interações com a ECA foram realizadas simulações no *software* ligplot, que através da sequência das estruturas realiza previsões de possíveis ligações de hidrogênio ou interações hidrofóbicas em um *docking* rígido (WALLACE et al., 1995). Como resultado foram obtidas 5 LH para o peptídeo ORP-Bp, realizadas pelos

aminoácidos: Pro5, Arg4, Thr6 e Gln8. Para o PEP06 apenas 1 LH foi alcançada entre o aminoácido Leu4 do peptídeo com o aminoácido Lys118 da ECA (Figura 4).

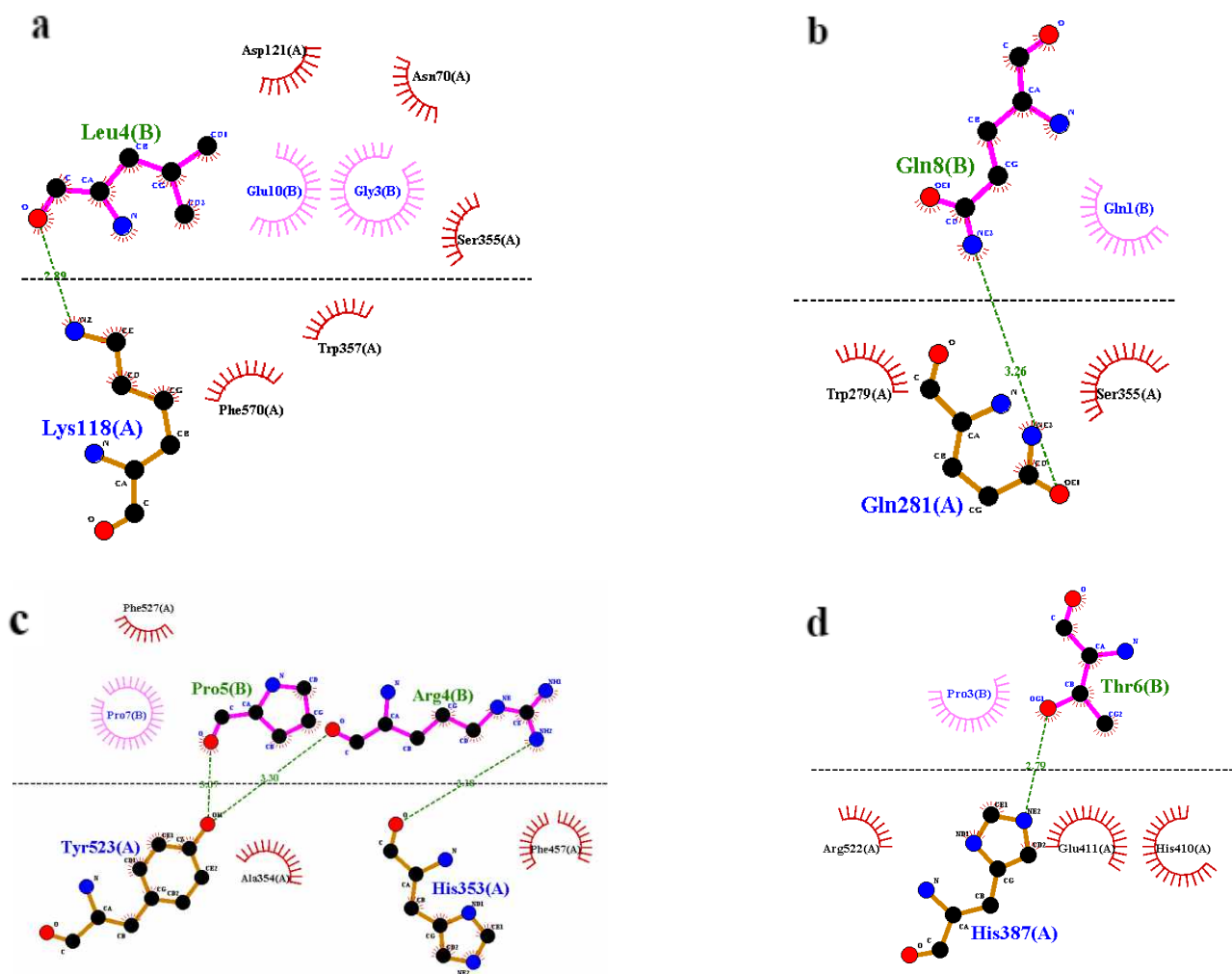


Figura 4: Diagrama 2D das interações entre a ECA e PEP06 (a) e entre a ECA e ORP-Bp (b, c, d). As linhas pontilhadas verdes representam as ligações de hidrogênio e os arcos em vermelho representam as interações hidrofóbicas entre os aminoácidos.

6.3 Dinâmica Molecular

Para realizar as simulações de dinâmica molecular foram selecionados os peptídeos PEP06 e ORP-Bp que apresentaram o melhor *docking* molecular. As simulações de DM foram realizadas com o tempo de 100ns e foram analisados os RMSD, RMSF e número de ligações de hidrogênio das duas sequências peptídicas.

6.3.1 RMSD

As simulações de RMSD possibilitaram a comparação entre a variação dinâmica da proteína apo com o complexo formado pela enzima e seu inibidor. Para a ECA avaliada na dinâmica com o ORP-Bp, o valor médio de RMSD foi de 0,29 e o complexo ORP-Bp ligado a ECA apresentou valores médios de RMSD próximos a 0,32. Já o PEP06, apresentou valores médios inferiores, sendo que o RMSD da ECA foi equivalente a 0,27, enquanto do complexo PEP06 foi de 0,28 (Figura 5) (Tabela 3).

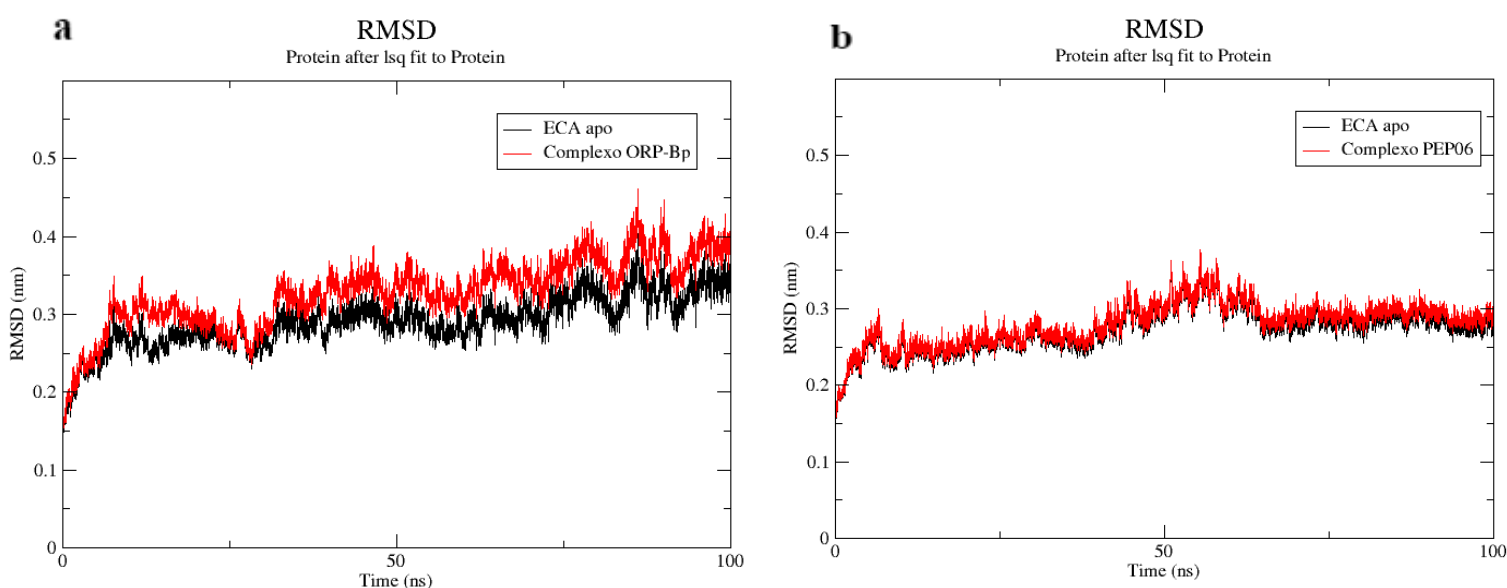


Figura 5: Gráfico da variação de RMSD durante a simulação de dinâmica molecular, o período de tempo utilizado foi de 100 ns. Em vermelho estão representados os complexos (a) ORP-Bp (b) PEP06. Em preto está representada a ECA sem a presença dos ligantes.

Tabela 3: Dados de média e desvio padrão do *Root Mean Square Deviation* obtidos através das simulações de Dinâmica Molecular.

RMSD (nm)	APO-ORP	APO-PEP06	Complexo-ORP	Complexo-PEP06
Média	0,2901	0,2740	0,3278	0,2837
Desvio Padrão	0,0337	0,0278	0,0447	0,0284

6.3.2 RMSF

Em relação ao RMSF, foi avaliado a flutuação individual de cada átomo da ECA na presença dos ligantes ORP-BP e PEP06. Foram encontrados valores médios inferiores para o RMSF da ECA quando ligada ao PEP06. Porém, quando ligada ao ORP-Bp os valores de RMSF são superiores em relação ao PEP06 (Figura 6). O primeiro complexo apresentou o valor médio de 0,114 com desvio padrão de 0,05781. O segundo apresentou valor médio de 0,131 e desvio padrão de 0,05346 (Tabela 4).

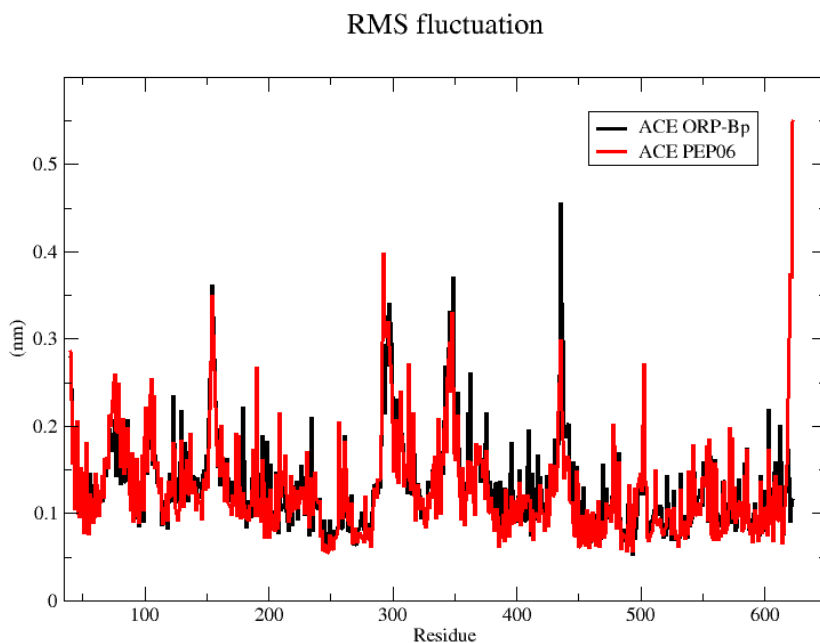


Figura 6: Gráfico da variação de RMSF durante a simulação de dinâmica molecular, o período de tempo utilizado foi de 100 ns. Em vermelho está representada a ECA em complexo com o PEP06 e em preto está representada a ECA em complexo com o ORP-Bp.

Tabela 4: Dados de média e desvio padrão do *Root Mean Square Fluctuation* obtidos através das simulações de Dinâmica Molecular

RMSF (nm)	ECA-ORP	ECA-PEP06
Média	0,131	0,114
Desvio Padrão	0,05346	0,05781

6.3.3 Ligações de Hidrogênio

O número de ligações de hidrogênio também foi analisado durante a simulação da dinâmica molecular no tempo de 100 ns. Foram obtidos valores médios de aproximadamente 7 ligações para o PEP06 com um desvio padrão de 1,82. Para o ORP-Bp o valor médio de LH foi de aproximadamente 6 com desvio padrão de 2,14. Foi possível observar um aumento médio de 7x no número de ligações de hidrogênio do PEP06 quando comparamos o *docking* rígido com a dinâmica molecular, enquanto o ORP-Bp apresentou uma variação menos significativa, passando de 5 ligações para uma média de 6 LH durante a DM (Tabela 5).

Além disso, no gráfico de Ligações de Hidrogênio, podemos perceber uma redução no número de ligações do ORP-Bp com a ECA, representado pela cor preta (Figura 7) nos 40 ns finais da simulação.

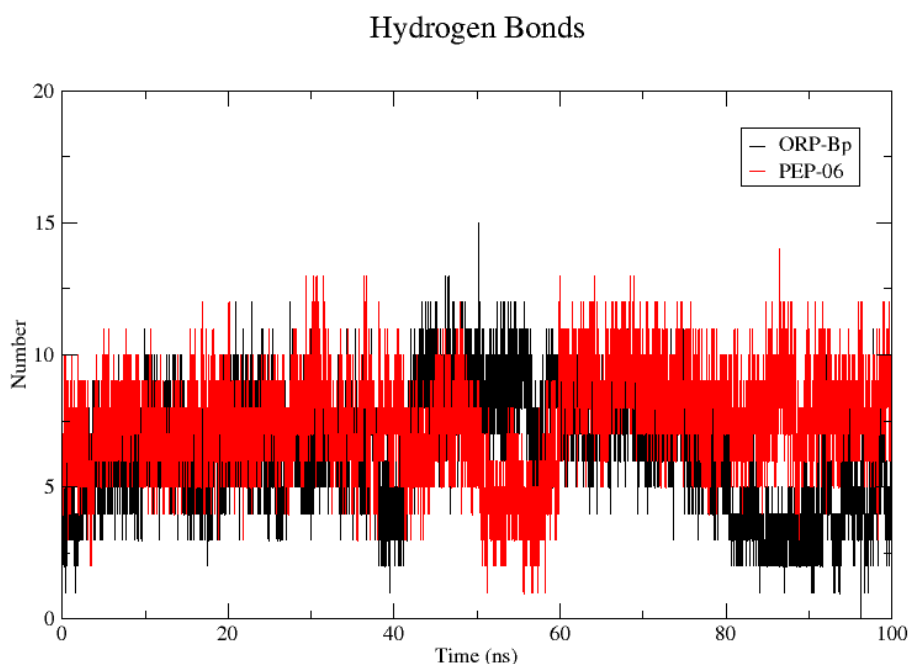


Figura 7: Representação do número de ligações de hidrogênio durante a simulação de dinâmica de 100 ns. Em vermelho está representado o complexo formado pelo PEP06 e a ECA. Em preto pode-se observar o número de ligações de hidrogênio do complexo formado pelo ORP-Bp e a ECA.

Tabela 5: Representação da média e desvio padrão das Ligações de hidrogênio durante a simulação de dinâmica molecular.

Ligações de Hidrogênio	ORP-Bp	PEP06
Média	6,3229	7,4617
Desvio Padrão	2,1494	1,8211

7. Discussão

Por se tratar da primeira causa de mortes relacionada a doenças não transmissíveis no mundo, a HA ainda é um desafio para o sistema público de saúde (GBD 2016 Causes of Death Collaborators, 2016). Sabendo-se que é necessário reconhecer fármacos com os menores efeitos colaterais possíveis, diversos estudos científicos buscam compreender o comportamento desses fármacos com seus alvos no organismo, tendo em vista dois objetivos. O primeiro é o aprimoramento no tratamento, e o segundo a bioprospecção de novas drogas com um bom potencial terapêutico. As peçonhas de serpente possuem uma diversidade de moléculas bioativas com potencial terapêutico (LI et al., 2018). Os BPPs derivados das peçonhas foram evidenciados como

fármacos promissores para o controle da pressão arterial, dando origem a drogas amplamente comercializadas como o Captopril[®] (ONDETTI et al., 1977).

Esses BPPs isolados da peçonha de serpentes, possuem como característica a presença um resíduo de piroglutamato na porção N-terminal. Além disso, esses peptídeos apresentam uma sequência conservada de dois resíduos de prolina na região C terminal (COTTON et al., 2002). Através das sequências obtidas no trabalho de Achê (2017) observamos que apenas os peptídeos ORP-Bp e PEP06 apresentaram as características supracitadas. Os *dockings* realizados neste estudo demonstraram a capacidade dos peptídeos PEP06 e ORP-Bp de interagirem com a ECA no mesmo sítio de ligação observado através de estudos de cristalografia de raios-x feitos por Masuyer e colaboradores (2012).

Além disso, foi possível observar durante o *docking* dos BPPs divergências nos valores de RMSD apresentados pelo *software* HDock (Tabela 2). Enquanto os peptídeos ORP-Bp e PEP06 apresentaram baixos valores de RMSD (31,39 Å e 24.83 Å respectivamente), os peptídeos: PEP01, PEP02, PEP03 e PEP04 apresentaram valores superiores a 80 Å, sugerindo maior instabilidade na ligação dos últimos com a ECA. A Figura 2 demonstra a aleatoriedade dos *dockings* obtidos com os peptídeos de 1 a 4, sendo que nenhum deles se ligou ao sítio ativo da enzima. Por se identificarem também com peptídeos natriuréticos do tipo C através do BLAST, possivelmente os peptídeos de 1 a 4 possuem outros alvos celulares que não a ECA. Já os peptídeos ORP-Bp e PEP06 se ligam seletivamente ao sítio ativo do domínio C-terminal da ECA da mesma forma que o BPP da peçonha de *Gloydius blomhoffii*, porém interagindo com aminoácidos diferentes (Figura 4) (MASUYER et al., 2012).

Para o desenvolvimento de novos fármacos através de um peptídeo sintético, torna-se mais interessante a escolha dos peptídeos ORP-Bp e PEP06. Isto, por apresentarem menor número de resíduos de aminoácidos e um *docking* promissor no sítio de ligação da porção C-terminal da ECA. Dessa forma, avaliamos outros fatores como: RMSD, RMSF e o número de LH.

O RMSD é uma métrica de similaridade ou de distância entre duas moléculas geralmente utilizada para realizar comparações entre estruturas proteicas de sequências similares. Nesse parâmetro é calculado o desvio quadrático médio das coordenadas tridimensionais dos átomos de uma proteína em relação a outra. Valores menores de RMSD podem sugerir uma boa estabilidade da ligação entre o inibidor e seu alvo celular por estarem relacionados com a movimentação das estruturas durante a ligação, sendo assim estruturas com ligações fracas tendem a se movimentar mais, apresentando maiores valores de RMSD (MAIOROV; CRIPPEN, 1994). Através do RMSD podemos observar que o desvio quadrático médio, além de ser superior para o ORP-Bp, apresentou

maior variação quando comparado ao PEP06, o que pode sugerir uma estabilidade de ligação inferior quando comparado ao PEP06 (Tabela 3).

Outra métrica avaliada no trabalho foi o RMSF, que calcula o desvio quadrático médio da flutuação de um átomo. Ele é utilizado para analisar quantitativamente a variação de cada átomo individualmente dentro de uma estrutura proteica ao longo da simulação de dinâmica molecular. Através do RMSF, podemos observar que para a comparação dos dois complexos o RMSF do PEP06 apresentou-se mais estável e com valores menores, indicando menor variação dos átomos ao longo da simulação de dinâmica molecular. Reafirmamos, então, que o PEP06 possui uma maior estabilidade na ligação com seu alvo ECA (Tabela 4).

As ligações de hidrogênio podem ser um bom parâmetro para avaliar a afinidade da enzima e seu inibidor, bem como a estabilidade da ligação de ambos (FERREIRA et al., 2019). Os primeiros resultados de *docking* e do diagrama de interação 2D dos peptídeos demonstraram o número de 1 LH para o PEP06 e 5 LH para o ORP-Bp. Após a dinâmica molecular foi possível identificar um aumento de 7 vezes nas ligações de hidrogênio do PEP06, enquanto o ORP-Bp não apresentou aumento significativo no número de LH. Além de apresentar uma redução no número de ligações nos 40 ns finais da simulação, indicando uma instabilidade entre o ORP-Bp e a ECA. Isto justifica a importância da dinâmica molecular para avaliar as ligações de hidrogênio não detectadas em um *docking* rígido.

Em suma, como as estruturas peptídicas estão correlacionadas com suas funções, o PEP06 apresentou maior estabilidade na ligação seletiva com a região C-terminal da ECA, analisada através dos dockings moleculares e valores de RMSD e RMSF, mantendo o número de ligações de hidrogênio estável durante a simulação de dinâmica molecular. Desse modo, o PEP06 pode ser um peptídeo natural promissor para a potencialização da bradicinina através da inibição da enzima conversora de angiotensina e um possível candidato para a síntese química.

8. Referências Bibliográficas

Abdalla S, et al. **ACE inhibition with captopril retards the development of signs of neurodegeneration in an animal model of Alzheimer's disease.** *Int J Mol Sci.* 2013;14(8):16917-16942. Published 2013 Aug 16.

Abernethy DR, Schwartz JB. **Calcium-antagonist drugs.** *N Engl J Med.* 1999;341(19):1447-1457.

Abraham MJ, et al. **Gromacs- High performance molecular simulations through multi-level parallelism from laptops to supercomputers.** *SoftwareX*, v. 1–2, p. 19–25, 2015.

Achê DC, et al. **Biochemical properties of a new PI SVMP from *Bothrops pauloensis*: Inhibition of cell adhesion and angiogenesis.** *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 72, pp. 445–453, 2015.

Achê DC. **Análise da composição proteica da peçonha de *Bothrops pauloensis* e caracterização estrutural e funcional de um peptídeo potencializador de bradicinina.** 2017. 99f. Dissertação de Doutorado em Genética e Bioquímica - Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia - MG. 2017.

Adcock SA, McCammon JA. **Molecular dynamics: survey of methods for simulating the activity of proteins.** *Chem Rev.* 2006;106(5):1589-1615.

Al Ghorani H, et al. **Arterial hypertension - clinical trials update 2021.** *Nutr Metab Cardiovasc Dis.* 2022 Jan;32(1):21-31.

Alonso H, et al. **Combining docking and molecular dynamic simulations in drug design.** *Med Res Rev.* 2006;26(5):531-568.

Altschul SF, et al. **Basic Local Alignment Search Tool.** *J. Mol. Biol.*, n. 215, p. 403–410, 1990.

Azevedo FV, et al. **Human breast cancer cell death induced by BnSP-6, a Lys-49 PLA(2) homologue from *Bothrops pauloensis* venom.** *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 82, pp. 671-677, January, 2016.

Bakhle YS. **How ACE inhibitors transformed the renin-angiotensin system.** *Br J Pharmacol.* 2020;177(12):2657-2665.

Benjamin EJ, et al. **Heart Disease and Stroke Statistics-2018 update: A Report From the American Heart Association.** *Circulation.* 2018;137(12):e67-e492.

Bhoola KD, et al. **Bioregulation of Kinins: Kallikreins, Kininogens, and Kininases.** *Pharmacological Reviews*, v. 44, n. 1, pp. 1-80, 1992.

Blowey DL. **Diuretics in the treatment of hypertension.** *Pediatr Nephrol.* 2016;31(12):2223-2233.

Bolívar JJ. **Essential hypertension: an approach to its etiology and neurogenic pathophysiology.** *Int J Hypertens.* 2013;2013:547809..

Carey RM, Siragy HM. **Newly recognized components of the renin-angiotensin system: potential roles in cardiovascular and renal regulation.** *Endocr Rev.* 2003;24(3):261-271.

Chow BS, et al. **Relaxin requires the Angiotensin II type 2 receptor to abrogate renal interstitial fibrosis.** *Kidney Int.* 2014;86(1):75-85.

Costa FLS, et al. **Biochemical and functional properties of a thrombin-like enzyme isolated from *Bothrops pauloensis* snake venom.** *Toxicon*, v. 54, pp. 725-735, 2009.

- Cotton J, et al. **Selective inhibition of the C-domain of angiotensin I converting enzyme by bradykinin potentiating peptides.** *Biochemistry*. 2002;41(19):6065-6071.
- Cruickshank JM. **The Role of Beta-Blockers in the treatment of hypertension.** *Adv Exp Med Biol*. 2017;956:149-166.
- Donoghue M, et al. **A novel angiotensin-converting enzyme-related carboxypeptidase (ACE2) converts angiotensin I to angiotensin 1-9.** *Circulation Research* 2000 Sep 1;87(5)
- Elliott WJ, Ram CV. **Calcium channel blockers.** *J Clin Hypertens (Greenwich)*. 2011;13(9):687-689.
- Ferrario CM, et al. **Advances in biochemical and functional roles of angiotensin-converting enzyme 2 and angiotensin-(1-7) in regulation of cardiovascular function.** *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, December, 2005
- Ferreira BG, et al. **Hydrogen Bonds in protein-ligand complexes.** *Methods Mol Biol*. 2019;2053:93-107.
- Ferreira SH. **A Bradykinin-Potentiating Factor (BPF) Present in the venom of *Bothrops Jararaca*.** *British Journal of Pharmacology and Chemoterapy*, v. 24, n. 1, pp 163-169, February, 1965.
- Fuchs FD, et al. **Alcohol consumption and the incidence of hypertension: The Atherosclerosis Risk in Communities Study.** *Hypertension*. 2001 May;37(5):1242-50.
- GBD 2016 Causes of Death Collaborators. **Global, regional, and national age-sex specific mortality for 264 causes of death, 1980-2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016.** *Lancet*. 2017;390(10100):1151-1210.
- Giani JF, et al. **Angiotensin-(1-7) improves cardiac remodeling and inhibits growth-promoting pathways in the heart of fructose-fed rats.** *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2010;298(3):H1003-H1013.
- Hall JE, et al. **Obesity, kidney dysfunction and hypertension: mechanistic links.** *Nat Rev Nephrol*. 2019 Jun;15(6):367-385.
- Hannan RE, et al. **Functional role of angiotensin II AT2 receptor in modulation of AT1 receptor-mediated contraction in rat uterine artery: involvement of bradykinin and nitric oxide.** *Br J Pharmacol*. 2003;140(5):987-995.
- Hansson T, et al. **Molecular dynamics simulations.** *Curr Opin Struct Biol*. 2002 Apr;12(2):190-6.
- Ichihara A, et al. **Renal renin-angiotensin system.** *Contrib Nephrol*. 2004;143:117-130.
- Karplus M, McCammon JA. **Molecular dynamics simulations of biomolecules.** *Nat Struct Biol*. 2002;9(9):646-652.
- Kayashima Y, et al. **The kallikrein-kinin system and oxidative stress.** *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 2012;21(1):92-96.
- Kodama RT, et al. **New proline-rich oligopeptides from the venom of African adders: Insights into the hypotensive effect of the venoms.** *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, v. 1850, n. 6, pp. 1180-1187, February, 2015.
- Koulis C, et al. **AT2R agonist, compound 21, is reno-protective against type 1 diabetic nephropathy.** *Hypertension*. 2015;65(5):1073-1081.
- Li L, et al. **Snake Venoms in Cancer Therapy: Past, Present and Future.** *Toxins*, v. 10, n. 9, pp. 1-8, August, 2018.
- López de Fez CM, et al. **Mecanismos de hipertensión en obesidad.** *An Sist Sanit Navar*. 2004;27(2):211-219.

- Lu Q, et al. **Snake venoms and hemostasis.** *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, v. 3, n. 8, pp. 1791-1799, August, 2005.
- Ma TK, et al. **Renin-angiotensin-aldosterone system blockade for cardiovascular diseases: current status.** *Br J Pharmacol.* 2010;160(6):1273-1292.
- Maiorov VN, Crippen GM. **Significance of root-mean-square deviation in comparing three-dimensional structures of globular proteins.** *J Mol Biol.* 1994 Jan 14;235(2):625-34..
- Marinho AD, et al. **Bothrops pauloensis snake venom-derived Asp-49 and Lys-49 phospholipases A2 mediates acute kidney injury by oxidative stress and release of inflammatory cytokines.** *Toxicon.* 2021;190:31-38.
- Masuyer, et al. **Molecular recognition and regulation of human angiotensin-I converting enzyme (ACE) activity by natural inhibitory peptides.** *Sci Rep* 2, 717 (2012).
- Mente A, et al. **Urinary sodium excretion, blood pressure, cardiovascular disease, and mortality: a community-level prospective epidemiological cohort study.** *Lancet.* 2018;392(10146):496-506.
- Montinaro V, Cicardi M. **ACE inhibitor-mediated angioedema.** *Int Immunopharmacol.* 2020;78:106081.
- Moreau ME, et al. **The Kallikrein-Kinin System: Current and Future Pharmacological Targets.** *Journal of Pharmacological Sciences*, v. 99, pp. 6-28, 2005.
- Munawar A, et al. **Comparative study to characterise the pharmaceutical potential of synthesised snake venom Bradykinin-Potentiating Peptides in vivo.** *Curr Med Chem.* 2022; 10.2174/0929867329666220203153051.
- Muneer K, Nair A. **Angiotensin-converting enzyme inhibitors and receptor blockers in heart failure and chronic kidney disease: demystifying controversies.** *Indian Heart J.* 2017;69(3):371-374.
- Nakagawa T, et al. **Transient mild cerebral ischemia significantly deteriorated cognitive impairment in a mouse model of Alzheimer's disease via Angiotensin AT1 Receptor.** *Am J Hypertens.* 2017;30(2):141-150.
- Oliveira CF, et al. **Insights of local tissue damage and regeneration iduced by BnSP-7, a myotoxin isolated from *Bothrops (neuwiedii) pauloensis* snake venom.** *Toxicon*, v. 53, pp. 560-569, 2009.
- Oliver E, et al. **Beta-blockers: historical perspective and mechanisms of action.** *Rev Esp Cardiol (Engl Ed).* 2019;72(10):853-862.
- Ondetti M, et al. **Design of specific inhibitors of angiotensin-converting enzyme: new class of orally active antihypertensive agents.** *Science*, v. 196, n. 4288 , pp. 441-444, 1977.
- Panahpour H, et al. **Candesartan attenuates ischemic brain edema and protects the blood-brain barrier integrity from ischemia/reperfusion injury in rats.** *Iran Biomed J.* 2014;18(4):232-238.
- Patel VB, et al. **Role of the ACE2/Angiotensin 1-7 axis of the Renin-Angiotensin System in heart failure.** *Circ Res.* 2016;118(8):1313-1326.
- Paul M, et al. **Physiology of local renin-angiotensin systems.** *Physiol Rev.* 2006;86(3):747-803.
- Pettersen EF, et al. **Chimera-a visualization system for exploratory research and analysis.** *J Comput Chem.* 2004 Oct;25(13):1605-12
- Polakovičová M, Jampílek J. **Advances in structural biology of ACE and development of domain selective ACE-inhibitors.** *Med Chem.* 2019;15(6):574-587.

- Póvoa R, et al. **I brazilian position paper on antihypertensive drug combination.** *Arq Bras Cardiol.* 2014;102(3):203-210.
- Prusty SK, et al. **Angiotensin mediated oxidative stress and neuroprotective potential of antioxidants and AT1 Receptor Blockers.** *Mini Rev Med Chem.* 2017;17(6):518-528.
- Qadri F, Bader M. **Kinin B1 receptors as a therapeutic target for inflammation.** *Expert Opin Ther Targets.* 2018;22(1):31-44.
- Ramasamy V, et al. **Investigating the antifibrotic potential of N-acetyl seryl-aspartyl-lysyl-proline sequence peptides.** *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2021;48(11):1558-1565.
- Rice GI, et al. **Evaluation of angiotensin-converting enzyme (ACE), its homologue ACE2 and neprilysin in angiotensin peptide metabolism.** *Biochem J.* 2004;383(Pt 1):45-51.
- Rodrigues VM, et al. **Bactericidal and neurotoxic activities of two myotoxic phospholipase A2 from *Bothrops neuwiedi pauloensis* snake venom.** *Toxicon*, v. 44, pp. 305-314, 2004.
- Rodrigues VM, et al. ***Bothrops pauloensis* Snake Venom Toxins: The Search for New Therapeutic Models.** *Current Topics in Medicinal Chemistry*, v. 15, pp. 670-684, 2015.
- Ruggenenti P. **Dual renin-angiotensin system blockade for nephroprotection.** *Nephrol Ther.* 2017;13 Suppl 1:S43-S45.
- Ruilope LM, et al. **The kidney and arterial hypertension.** *Drugs.* 1993;46 Suppl 2:108-112.
- Safar ME, et al. **Interaction between hypertension and arterial stiffness.** *Hypertension.* 2018 Oct;72(4):796-805.
- Singh GM, et al. **The age associations of blood pressure, cholesterol, and glucose: analysis of health examination surveys from international populations.** *Circulation.* 2012 May 8;125(18):2204-2211.
- Tasoulis T, Isbiter G. **A Review and Database of Snake Venom Proteomes.** *Toxins*, v. 9, n. 9, pp. 1-23, 2017
- Te Riet L, et al. **Hypertension: renin-angiotensin-aldosterone system alterations.** *Circulation Research* March, 2015.
- Tom B, et al. **Bradykinin, angiotensin-(1-7), and ACE inhibitors: how do they interact?.** *Int J Biochem Cell Biol.* 2003;35(6):792-801.
- Varvarousis D, et al. **Cardiac arrhythmias in arterial hypertension.** *J Clin Hypertens (Greenwich).* 2020;22(8):1371-1378.
- Vickers C, et al. **Hydrolysis of biological peptides by human angiotensin-converting enzyme-related carboxypeptidase.** *J Biol Chem.* 2002;277(17):14838-14843.
- Wallace AC, et al. **LIGPLOT- a program to generate schematic diagrams of protein-ligand interactions.** *Protein Eng.* 1995;8(2):127-134.
- Welander H, et al. **Abeta43 is more frequent than Abeta40 in amyloid plaque cores from Alzheimer disease brains.** *J Neurochem.* 2009;110(2):697-706.
- Wettschureck N, Offermanns S. **Mammalian G proteins and their cell type specific functions.** *Physiol Rev.* 2005;85(4):1159-1204.
- World Health Organization (WHO) **Hypertension: Key facts.** 25 August 2021 [website] (<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/hypertension> accessed on 15 March 2022)

Xu X, et al. **Hypotensive Peptides from Snake Venoms: Structure, Function and Mechanism.** *Current Topics in Medicinal Chemistry*, v. 15, n. 7, 2015.

Yan Y, et al. **The HDock server for integrated protein-protein docking.** *Nat Protoc.* 2020;15(5):1829-1852.