

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
DEPARTAMENTO DE FISILOGIA E FARMACOLOGIA  
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA

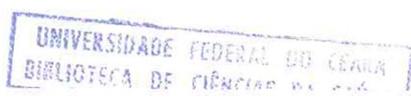
NOVOS ENSAIOS E ESTUDOS CINÉTICOS  
DA ENDOPEPTIDASE NEUTRA (EC 3.4.24.11):  
INFLUÊNCIA DO PAR DE ARGININA EM P'<sub>2</sub> E P'<sub>3</sub>  
NA DEGRADAÇÃO FISIOLÓGICA DOS PEPTÍDEOS  
OPIÓIDES QUE CONTÊM ENCEFALINAS

MARIA ANGELINA DA SILVA MEDEIROS

FC-00006138-2

Fortaleza – CE

1997



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
DEPARTAMENTO DE FISILOGIA E FARMACOLOGIA  
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA

NOVOS ENSAIOS E ESTUDOS CINÉTICOS  
DA ENDOPEPTIDASE NEUTRA (EC 3.4.24.11):  
INFLUÊNCIA DO PAR DE ARGININA EM P'<sub>2</sub> E P'<sub>3</sub> NA  
DEGRADAÇÃO FISIOLÓGICA DOS PEPTÍDEOS  
OPIÓIDES QUE CONTÊM ENCEFALINAS

MARIA ANGELINA DA SILVA MEDEIROS

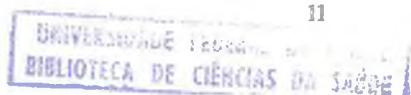
Tese apresentada à Coordenação do Curso de Pós-Graduação  
em Farmacologia da Universidade Federal do Ceará – UFC,  
para obtenção do título de Doutor em Farmacologia

Orientador: Prof. Dr. Krishnamurti de Moraes Carvalho

Fortaleza – CE

1997

ii



Medeiros, Maria Angelina da Silva

Novos ensaios e estudos cinéticos da endopeptidase neutra (EC 3.4.24.11): influência do par de arginina em P<sub>2</sub>' e P<sub>3</sub>' da degradação fisiológica dos peptídeos opióides que contém encefalinas - Fortaleza, 1997. (Tese doutoramento), Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Universidade Federal do Ceará.

Orientador: Prof. Dr. Krishnamurti de Moraes  
Carvalho.

Endopeptidase neutra  
Encefalinase  
Neprilisina  
Substratos fluorogênicos  
Fosforamidon

Esta tese foi submetida como parte dos requisitos necessários para obtenção do Grau de Doutor em Farmacologia, outorgado pela Universidade Federal do Ceará, e encontra-se à disposição dos interessados na Biblioteca Central da referida universidade.

A citação de qualquer trecho desta Tese é permitida, desde que seja feita de conformidade com as normas da ética científica.

**Maria Angelina da Silva Medeiros**

Dissertação aprovada em: 12/09/1997

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Krishnamurti de Moraes Carvalho  
Universidade Federal do Ceará  
Orientador da Tese

Prof. Dr. Antônio Carlos Martins de Camargo  
Instituto Butantan

Prof. Dr. Luis Juliano Neto

Prof.a. Dra. Gisela Costa Camarão  
Universidade Federal do Ceará

P

Universidade Federal do Ceará  
Universidade Estadual do Ceará

Este trabalho foi realizado com suporte financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), da Fundação Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), da Fundação Cearense de Apoio à Pesquisa (FUNCAP) e da Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP).

A DEUS,  
fonte de toda existência e sabedoria

## Dedico

Ao meu querido esposo, Francisco Medeiros, pelo incentivo, compreensão, carinho, companheirismo nas horas mais difíceis e que tudo faz para a concretização dos meus ideais.

À nossas maravilhosas filhas Aline e Alice, pelas inocentes palavras de apoio e força. Pelo amor que nos une e nos fortalece a cada dia.

Aos meus pais, Airton e Mirian, e aos meus irmãos Airton Júnior, Angeluce e Ângela que sempre foram exemplos de coragem.

## AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Doutor *Krishnamurti de Moraes Carvalho* por quem tenho grande admiração pelo seu trabalho árduo e dedicação à Universidade. Muito obrigada pela sua boa vontade e disponibilidade em transmitir seus conhecimentos, pela orientação segura e contínua, incentivo à carreira científica, por tudo que tem representado na minha formação profissional e sobretudo, pela amizade.

Ao Prof. Doutor *Luís Juliano Neto* que gentilmente nos cedeu os substratos para a realização desse trabalho assim como discutiu importantes aspectos desse trabalho, sem o qual não poderia ter sido realizado.

Ao Prof. Doutor *Gui Boileau* por ter cedido gentilmente a enzima para a realização dessa pesquisa.

Ao Prof. Doutor *Antonio Carlos Martins de Camargo* por ter gentilmente aceito participar da minha banca de Doutorado.

À Profa. Doutora *Gisela Costa Camarão* pela amizade, pela disposição em ajudar e transmitir seus conhecimentos sem medir esforços.

Ao Prof. Doutor *Manasses Claudino Fonteles* pelos ensinamentos transmitidos e pela gentileza em participar da minha banca examinadora.

Ao Prof. Doutor *Francisco das Chagas Oliveira*, diretor da Maternidade Escola Assis Chateaubriand, por seu incentivo irrestrito àqueles que almejam o saber.

Ao Prof. Doutor *Francisco Manuelito* pela colaboração e incentivo.

A grande amiga *Maria Silvandira Freire de França*, que sempre disposta em todos os momentos, contribuiu para a execução deste trabalho.

Ao *Ricardo Mendonça Rocha*, amigo em todos os momentos, que muito contribuiu para a realização desse trabalho, me ensinando os primeiros passos na área da informática e alegrando o laboratório com suas profundas teorias.

A Profa. Doutora *Helena Sampaio* amiga de lutas e de desabafos que tanto me apoiou e me incentivou estendendo sua mão quando precisei.

Ao amigo *Manoel Cláudio* que sempre esteve presente cedendo o seu apoio e incentivo.

A *Juvênia*, grande amiga de desabafo que tanto me ouviu e aconselhou-me durante todo esse período de trabalho. O meu agradecimento especial.

À turma do *Laboratório de Neurobiologia Molecular Humana*, *Marinetes*, *Nava*, *Lígia*, *Falba*, *Mírian*, *Denise* e *Profa. Rita* pelo convívio sempre agradável.

Aos *pacientes* que colaboraram para a realização deste estudo.

A *todos* que de alguma maneira contribuíram para a realização deste trabalho, o meu perdão por não citá-los.

## ÍNDICE

<b>ABREVIATURAS</b>	xix
<b>RESUMO</b>	xxi
<b>ABSTRACT</b>	xxiv
<b>1. INTRODUÇÃO</b>	
1. Endopeptidase Neutra (NEP, EC 3.4.24.11, E.P. 24.11, neprilisina, encefalinase).....	01
1.1. Ensaio para quantificar a atividade da NEP.....	05
1.2. Biologia molecular da NEP.....	06
1.3. Inibidores da NEP.....	13
2. Peptídeos degradados pela NEP.....	15
3.1. Peptídeos natriuréticos.....	15
2.2. Bradicininas.....	22
2.3. Angiotensina.....	26
3. Os Peptídeos opióides.....	29
3.1. Família dos peptídeos opióides endógenos.....	30
3.1.1. Pré-pró-opiomelanocortina.....	31
3.1.2. Pré-pró-dinorfina.....	36
3.1.3. Pré-pró-encefalina.....	39
4. Funções fisiológicas dos peptídeos opióides.....	42
5. Envolvimento da Endopeptidase Neutra (NEP) no metabolismo dos peptídeos opióides.....	46

<b>2. OBJETIVOS</b>	48
<b>3. MATERIAL</b>	49
3.1. Fonte de enzimas.....	49
3.2. Reagentes.....	50
3.3. Peptídeos fluorogênicos.....	50
3.4. Aparelhos diversos.....	48
<b>4. MÉTODOS</b>	
4.1. Enzimas.....	54
4.2. Ensaio enzimático.....	55
4.3. Ensaio fluorimétrico após tempo de reação fixo.....	57
4.4. Determinação da concentração de proteínas.....	58
4.5. Diálise da amostra.....	58
4.6. Cromatografia de troca iônica em coluna de DEAE-Celulose .....	59
4.7. Concentração das frações enzimáticas.....	59
4.8. Cromatografia de troca iônica-HPLC.....	59
4.9. Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC).....	60
4.10. Eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE).....	61
4.11. Análise de aminoácidos.....	61
4.12. Determinação das constantes cinéticas.....	62

## 5. RESULTADOS

5.1.	Hidrólise dos substratos fluorogênicos com apagamento intramolecular de fluorescência pela NEP recombinante (NEPr).....	64
5.2.	Parâmetros cinéticos da hidrólise dos substratos fluorogênicos com apagamento intramolecular de fluorescência pela NEP recombinante (NEPr).....	71
5.3.	Estudo da especificidade dos substratos.....	76
5.4.	Espectro de emissão ( $\lambda_{ex}=320$ ) do Abz-GGdFLRRV-EDDnp, Abz-GGdFLRR, Abz-dRRL-EDDnp e Abz-dRR.....	90
5.5.	Curva de calibração da fluorescência emitida pelo Abz-GGdFLRR e Abz-dRR.....	90
5.6.	Ensaio fluorimétrico contínuo.....	94
5.7.	Purificação da endopeptidase neutra do plasma seminal humano.....	97
5.8.	Cromatografia de troca iônica em HPLC.....	97
5.9.	Peso molecular da enzima purificada do plasma seminal.....	101
5.10.	Determinação da constante de <i>Michaelis-Menten</i> .....	101
5.11.	Hidrólise do substrato fluorogênicos com apagamento intramolecular de fluorescência (Abz-dRRL-EDDnp) pela NEP purificada do plasma seminal humano.....	104
5.12.	Determinação do pH ótimo.....	104

## 6. DISCUSSÃO

### PROJETO I

Estudo de novos ensaios para endopeptidase neutra (EC 3.4.24.11, NEP, Neprilisina) Uma aplicação dos novos ensaios.....	108
---	-----

CONCLUSÕES.....	119
-----------------	-----

### PROJETO II

Influência do par de Arginina em P' <sub>2</sub> e P' <sub>3</sub> na degradação fisiológica dos peptídeos opióides.....	120
---	-----

CONCLUSÕES.....	125
-----------------	-----

REFERÊNCIAS.....	128
------------------	-----

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 01</b>	Peptídeos degradados <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i> pela NEP.....	04
<b>Tabela 02</b>	Parâmetros cinéticos da hidrólise dos substratos Abz-GGFLRRV-EDDnp, Abz-GGdFLRRV-EDDnp, Abz-dRRV-EDDnp, Abz-RRV-EDDnp, Abz-dRRL-EDDnp e Abz-dRRF-EDDnp pela NEPr.....	72
<b>Tabela 03</b>	Parâmetros cinéticos dos peptídeos fluorogênicos derivados das Dinorfina A <sub>1-6</sub> hidrolisados pela NEPr.....	73
<b>Tabela 04</b>	Parâmetros cinéticos dos peptídeos fluorogênicos derivados da Dinorfina A <sub>1-7</sub> hidrolisados pela NEPr.....	74
<b>Tabela 05</b>	Parâmetros cinéticos dos peptídeos fluorogênicos derivados da Dinorfina A e da $\beta$ -Endorfina hidrolisados pela NEPr.....	75
<b>Tabela 06</b>	Incubação dos peptídeos Abz-dRRL-EDDnp, Abz-dRRF-EDDnp, Abz-dRRV-EDDnp, Abz-RRV-EDDnp e Abz-GGdFLRRV-EDDnp com NEPr, ACE, termolisina, tripsina e quimotripsina .....	89
<b>Tabela 07</b>	Aumento da fluorescência após total hidrólise dos substratos fluorogênicos pela NEPr.....	93
<b>Tabela 08</b>	Determinação da atividade da NEP na fração membranar dos vários tecidos.....	96
<b>Tabela 09</b>	Etapas de purificação da endopeptidase neutra do plasma seminal.....	98

<b>Tabela 10</b>	Comparação entre os parâmetros cinéticos dos ensaios do presente estudo e outros métodos utilizados atualmente para quantificar a atividade da NEP.....	112
<b>Tabela 11</b>	Comparação entre os ensaios do presente estudo e outros métodos utilizados atualmente para quantificar a atividade da NEP.....	114

## LEGENDA DE FIGURAS

<b>Figura 01</b>	Modelo esquemático da estrutura primária da NEP.....	09
<b>Figura 02</b>	Nomenclatura de SCHECHTER e BERGER.....	10
<b>Figura 03</b>	Modelo esquemático do sítio catalítico da NEP	11
<b>Figura 04</b>	Modelo de interação da encefalina e do tiorfan com o centro ativo da NEP.....	12
<b>Figura 05</b>	Sistema hormonal do ANP.....	17
<b>Figura 06</b>	Degradação do ANP pela NEP.....	21
<b>Figura 07</b>	Enzimas envolvidas na inativação da bradicinina.....	25
<b>Figura 08</b>	Seqüência de aminoácidos dos principais peptídeos opióides derivados de três distintas proteínas precursoras.....	34
<b>Figura 09</b>	Biossíntese e maturação da pró-opiomelanocortina.....	35
<b>Figura 10</b>	Biossíntese e maturação da pró-dinorfina.....	38
<b>Figura 11</b>	Biossíntese e maturação da pró-encefalina.....	41
<b>Figura 12</b>	Conceito de substratos fluorogênicos.....	56
<b>Figura 13</b>	Perfil de eluição do padrão de aminoácidos.....	66
<b>Figura 14</b>	Perfil de eluição dos produtos de hidrólise gerados após incubação do Abz-dRRF-EDDnp com NEPr (A). Registro da fluorescência contínua da hidrólise do substrato Abz-dRRF-EDDnp com NEPr (B).....	67

<b>Figura 15</b>	Composição de aminoácidos do produto Abz-dRR, gerado após incubação do substrato Abz-dRRF-EDDnp com NEPr.....	68
<b>Figura 16</b>	Composição de aminoácidos do produto F-EDDnp, gerado após incubação do substrato Abz-dRRF-EDDnp com NEPr.....	69
<b>Figura 17</b>	Composição de aminoácidos do substrato Abz-dRRF-EDDnp.....	70
<b>Figura 18</b>	Perfil de eluição dos produtos de hidrólise gerados após incubação do Abz-GGFLRRV-EDDnp com fração membranaar de rim (A). Registro da fluorescência contínua da hidrólise do substrato Abz-GGFLRRV-EDDnp com fração membranaar de rim (B).....	79
<b>Figura 19</b>	Perfil de eluição dos produtos de hidrólise gerados após incubação do Abz-GGFLRRV-EDDnp com fração membranaar de rim na presença de fosforamidon 1 $\mu$ M (A). Registro da fluorescência contínua da hidrólise do substrato Abz-GGFLRRV-EDDnp com fração membranaar de rim na presença de fosforamidon 1 $\mu$ M (B).....	80
<b>Figura 20</b>	Perfil de eluição dos produtos gerados após incubação do Abz-GGdFLRRV-EDDnp com fração membranaar de rim (A). Registro da fluorescência contínua da hidrólise do substrato Abz-GGdFLRRV-EDDnp com fração membranaar de rim (B).....	81
<b>Figura 21</b>	Perfil de eluição do substrato Abz-GGdFLRRV-EDDnp com fração membranaar de rim na presença de fosforamidon 1 $\mu$ M (A). Registro da fluorescência contínua do substrato Abz-GGdFLRRV-EDDnp com fração membranaar de rim na presença de fosforamidon 1 $\mu$ M (B).....	82

<b>Figura 22</b>	Perfil de eluição dos produtos gerados após incubação do Abz-dRRL-EDDnp com fração membranar de rim (A). Registro da fluorescência contínua da hidrólise do substrato Abz-dRRL-EDDnp com fração membranar de rim (B).....	83
<b>Figura 23</b>	Perfil de eluição da incubação do Abz-dRRL-EDDnp com fração membranar de rim na presença de fosforamidon 1 $\mu$ M (A). Registro da fluorescência contínua da reação do substrato Abz-dRRL-EDDnp com fração membranar de rim na presença de fosforamidon 1 $\mu$ M (B).....	84
<b>Figura 24</b>	Perfil de eluição da incubação do Abz-dRRL-EDDnp com enzima conversora de angiotensina (A). Registro da fluorescência contínua da reação do substrato Abz-dRRL-EDDnp com enzima conversora de angiotensina (B).....	85
<b>Figura 25</b>	Perfil de eluição da incubação do Abz-dRRL-EDDnp com tripsina (A). Registro da fluorescência contínua da reação do substrato Abz-dRRL-EDDnp com tripsina (B).....	86
<b>Figura 26</b>	Perfil de eluição da incubação do Abz-dRRL-EDDnp com termolisina (A). Registro da fluorescência contínua da reação do substrato Abz-dRRL-EDDnp com termolisina (B).....	87
<b>Figura 27</b>	Perfil de eluição da incubação do Abz-dRRL-EDDnp com quimotripsina (A). Registro da fluorescência contínua da reação do substrato Abz-dRRL-EDDnp com quimotripsina (B).....	88
<b>Figura 28</b>	Espectro de emissão do peptídeo Abz-GGdFLRRV-EDDnp após hidrólise com NEPr (A). Curva de calibração da fluorescência emitida por diferentes concentrações de Abz-GGdFLRR (B).....	91

<b>Figura 29</b>	Espectro de emissão do peptídeo Abz-dRRL-EDDnp antes e após hidrólise com NEPr (A). Curva de calibração da fluorescência emitida por diferentes concentrações de Abz-dRR (B)...	92
<b>Figura 30</b>	Registro da fluorescência contínua da hidrólise do substrato Abz-dRRL-EDDnp com NEPr (A) ou com homogenato de rim (B).....	95
<b>Figura 31</b>	Cromatografia de troca iônica em DEAE-Celulose.....	99
<b>Figura 32</b>	Cromatografia de troca iônica - HPLC.....	100
<b>Figura 33</b>	Eletroforese em placa de gel de poliacrilamida da endopeptidase neutra purificada do plasma seminal humano.....	102
<b>Figura 34</b>	Constante de <i>Michaelis-Menten</i> da endopeptidase neutra purificada do plasma seminal humano.....	103
<b>Figura 35</b>	Perfil de eluição dos produtos gerados após incubação do Abz-dRRL-EDDnp com NEP purificada do plasma seminal humano (A). Registro da fluorescência contínua da hidrólise do substrato Abz-dRRL-EDDnp com NEP purificada do plasma seminal humano(B).....	105
<b>Figura 36</b>	Perfil de eluição da incubação do Abz-dRRL-EDDnp com NEP purificada do plasma seminal humano na presença de fosforamidon 1 $\mu$ M (A). Registro da fluorescência contínua da reação do substrato Abz-dRRL-EDDnp com NEP purificada do plasma seminal humano na presença de fosforamidon 1 $\mu$ M (B).....	106
<b>Figura 37</b>	Perfil de eluição da incubação do Abz-dRRL-EDDnp com NEP purificada do plasma seminal humano na presença de captopril 1 $\mu$ M (A). Registro da fluorescência contínua da reação do substrato Abz-dRRL-EDDnp com NEP purificada do plasma seminal humano na presença de captopril 1 $\mu$ M (B).....	107

## ABREVIATURAS

**A<sub>280</sub>**: Absorbância em 280 nm

**A<sub>269</sub>**: Absorbância em 269 nm

**ANP**: Peptídeo natriurético atrial

**DEAE**: Dietilaminoetil

**HPLC**: Cromatografia líquida de alta eficiência

**SDS-PAGE**: Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel

**Tris-HCl**: Tris(hidroximetil)amino-metanohidrocloreto

**EDDnp**: N-(2,4-dinitrofenil)-etilenodiamino

**Abz**: Ácido *orto*-aminobenzóico

**NEP**: Endopeptidase neutra

**ACE**: Enzima conversora de angiotensina

**F<sub>i</sub>**: Fluorescência inicial de um peptídeo não hidrolisado

**F<sub>t</sub>**: Fluorescência após total hidrólise de um peptídeo fluorogênico

**TEA**: Trietilamina

**TFA**: Ácido trifluoracético

**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

<b>M</b>	Met	Metionina
<b>N</b>	Asn	Asparagina
<b>P</b>	Pro	Prolina
<b>Q</b>	Gln	Glutamina
<b>R</b>	Arg	Arginina
<b>S</b>	Ser	Serina
<b>T</b>	Thr	Treonina
<b>V</b>	Val	Valina
<b>W</b>	Trp	Triptofano
<b>Y</b>	Tyr	Tirosina



*Resumo*

---

A endopeptidase neutra (NEP, encefalinase, neprilisina , EC 3.4.24.11) é uma zinco-metalloendopeptidase que hidrolisa ligações peptídicas, em resíduos hidrofóbicos na posição P<sub>1</sub>. A NEP é amplamente distribuída em vários tecidos, e está envolvida na regulação e metabolismo de uma variedade de peptídeos biologicamente ativos tais como, substância P, encefalinas, peptídeo natriurético atrial, bradicinina, gastrina, neurotensina e o peptídeo quimiotático.

Quatro peptídeos fluorogênicos com apagamento intramolecular de fluorescência contendo um grupamento *o*-aminobenzoil (Abz) e N-(2,4-dinitrofenil)-etilenodiamina (EDDnp) nas extremidades amino e carboxi terminal respectivamente, Abz-dRRL-EDDnp, Abz-dRRV-EDDnp, Abz-dRRF-EDDnp e Abz-GGdFLRRV-EDDnp, foram seletivamente hidrolisados pela endopeptidase neutra (NEP) na ligação Arg-Leu, Arg-Val, Arg-Fen e Arg-Val, respectivamente. Os parâmetros cinéticos da hidrólise dos peptídeos Abz-dRRL-EDDnp, Abz-dRRV-EDDnp e Abz-dRRF-EDDnp da reação catalisada pela NEPr foi de:  $K_m = 2.8 \mu\text{M}$ ,  $k_{cat} = 5.3 \text{ min}^{-1}$ ,  $k_{cat} / K_m = 2 \text{ min}^{-1} \mu\text{M}^{-1}$ ,  $K_m = 3.7 \mu\text{M}$ ,  $k_{cat} = 5.1 \text{ min}^{-1}$ ,  $k_{cat}/K_m = 1.3 \text{ min}^{-1} \mu\text{M}^{-1}$  e  $K_m = 5.0 \mu\text{M}$ ,  $k_{cat} = 7.0 \text{ min}^{-1}$ ,  $k_{cat}/K_m = 1.4 \text{ min}^{-1} \mu\text{M}^{-1}$ , respectivamente.

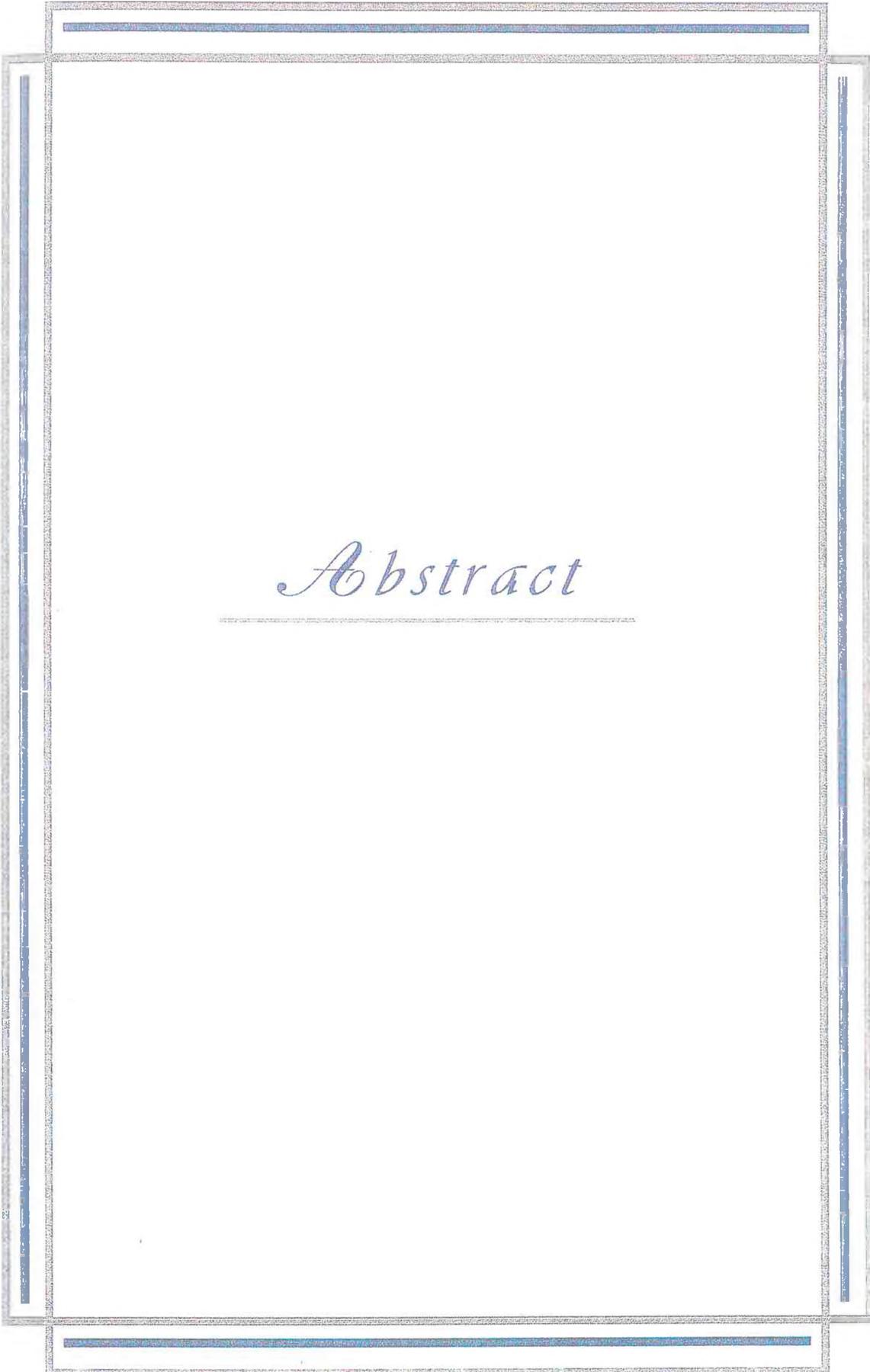
A elevada especificidade desses substratos foi demonstrada pela total resistência à ação de metaloproteases, serinoproteases e proteases presentes em preparações membranares de rim, pulmão, cérebro e outros tecidos do sistema reprodutor masculino e feminino humanos. O bloqueio amino e carboxi terminal protegeu esses peptídeos contra ação de aminopeptidases, carboxipeptidases e ACE. Além disso o aminoácido, dR assegurou total proteção dos peptídeos Abz-dRRL-EDDnp, Abz-dRRF-EDDnp e Abz-dRRV-EDDnp contra a ação da termolisina e tripsina.

Os parâmetros cinéticos da hidrólise do peptídeo Abz-GGdFLRRV-EDDnp da reação catalisada pela NEPr foi:  $K_m = 3.0 \mu\text{M}$ ,  $k_{cat} = 127 \text{ min}^{-1}$ ,  $k_{cat} / K_m = 42 \text{ min}^{-1} \mu\text{M}^{-1}$ . Embora o Abz-GGdFLRRV-EDDnp também apresente uma boa especificidade para NEP, ele é parcialmente suscetível a degradação por enzimas tripsina-símile que podem clivar a ligação R-R. Os resultados do presente estudo demonstram que: (i) o substrato Abz-GGdFLRRV-EDDnp é mais indicado que os peptídeos Abz-dRRL-EDDnp, Abz-dRRV-EDDnp e Abz-dRRF-EDDnp para o estudo da NEP em preparações enzimáticas purificadas e (ii) os substratos Abz-dRRL-EDDnp, Abz-dRRV-EDDnp e Abz-dRRF-EDDnp que demonstraram ser específicos para NEP, é melhor indicado para o estudo em preparações membranares cruas.

A atividade da NEP foi investigada no plasma seminal através dos ensaios fluorimétricos estudados no presente estudo. A NEP foi purificada à aparente homogeneidade utilizando ensaios com os substratos Abz-dRRL-EDDnp, Abz-dRRV-EDDnp e Abz-dRRF-EDDnp. Embora a enzima seja considerada exclusivamente ligada a membrana de células, sua atividade foi demonstrada no plasma seminal humano.

O estudo cinético de vários peptídeos derivados de precursores opióides realizado com uma forma solúvel de NEP recombinante demonstrou que: um resíduo de R em P'<sub>2</sub> ou R-R em P'<sub>2</sub> e P'<sub>3</sub>, respectivamente, impedem a hidrólise dos peptídeos opióides fluorogênicos derivados da dinorfina<sub>1-6</sub> e dinorfina<sub>1-7</sub>. Entretanto a substituição das argininas por aminoácidos neutros ou ácidos em P'<sub>2</sub> e P'<sub>3</sub> resultaram em peptídeos que são substratos para a NEP. Nos derivados da dinorfina A a presença de dupla R-R em P'<sub>2</sub> e P'<sub>3</sub> impede a hidrólise do peptídeo pela NEP e a presença de uma R em P'<sub>2</sub> ou P'<sub>3</sub> não impede a hidrólise desses compostos, ao contrário dos derivados da dinorfina A<sub>1-6</sub> e dinorfina A<sub>1-7</sub>.

Entretanto, observa-se que a presença da dupla de aminoácidos ácidos T-S em P'<sub>2</sub> e P'<sub>3</sub> origina um excelente substrato para a NEP. Assim pode-se concluir que a presença de uma arginina em P'<sub>2</sub> ou P'<sub>3</sub> dificulta a hidrólise desses substratos pela NEP.



*Abstract*

---

Neutral endopeptidase (NEP, enkephalinase, neprilysin, EC 3.4.24.11) is a broadly specific zinc metalloendopeptidase which hydrolyzes internal peptide bonds on the amino side of hydrophobic amino acid residues in P<sub>1</sub>' position, being Leu or Phe preferred amino acids. NEP is widely distributed in various tissues, and it is involved in the regulation and metabolism of a variety of biologically active peptides such as substance P, enkephalins, atrial natriuretic factor, bradykinin, gastrin, neurotensin and the chemotactic peptide.

It was found that four intramolecularly quenched fluorogenic peptides containing *o*-minobenzoyl (Abz) and ethylenediamine 2,4-dinitrophenyl (EDDnp) groups at amino- and carboxyl-terminal amino acid residues, Abz-dRRL-EDDnp, Abz-dRRV-EDDnp, Abz-dRRF-EDDnp and Abz-GGdFLRRV-EDDnp, were selectively hydrolyzed by neutral endopeptidase (NEP) at the Arg-Leu, Arg-Val, Arg-Phe and Arg-Val bonds, respectively. The kinetic parameters for the NEP catalyzed hydrolysis of Abz-dRRL-EDDnp, Abz-dRRV-EDDnp, Abz-dRRF-EDDnp were:  $K_m = 2.8 \mu\text{M}$ ,  $k_{\text{cat}} = 5.3 \text{ min}^{-1}$ ,  $k_{\text{cat}}/K_m = 2 \text{ min}^{-1} \mu\text{M}^{-1}$ ,  $K_m = 3.7 \mu\text{M}$ ,  $k_{\text{cat}} = 5.1 \text{ min}^{-1}$ ,  $k_{\text{cat}}/K_m = 1.3 \text{ min}^{-1} \mu\text{M}^{-1}$  and  $K_m = 5.0 \mu\text{M}$ ,  $k_{\text{cat}} = 7.0 \text{ min}^{-1}$ ,  $k_{\text{cat}}/K_m = 1.4 \text{ min}^{-1} \mu\text{M}^{-1}$ , respectively. The high specificity of these substrates was demonstrated by their total resistance to hydrolysis by metalloproteases [thermolysin, angiotensin-converting enzyme, serineproteases,  $\alpha$ -chymotrypsin and proteases present in tissue homogenates from kidney, lung, brain and testis. The blocked amino- and carboxyl-terminal amino acids protected these substrates against the action of aminopeptidases, carboxypeptidases and ACE. Furthermore, dR amino acid ensured a total protection of Abz-dRRL-EDDnp, Abz-dRRF-EDDnp and Abz-dRRF-EDDnp against the action of thermolysin and trypsin. The kinetic parameters for the NEP catalyzed hydrolysis of Abz-GGdFLRRV-EDDnp was:  $K_m = 3.0 \mu\text{M}$ ,  $k_{\text{cat}} = 127 \text{ min}^{-1}$ ,  $k_{\text{cat}}/K_m = 42 \text{ min}^{-1} \mu\text{M}^{-1}$ . Although Abz-GGdFLRRV-EDDnp also presents a good specificity for NEP, since it is resistant

to other metalloendopeptidases such as angiotensin-converting enzyme and thermolysin, it is partially susceptible to degradation by trypsin-like enzymes which may cleave the R-R bond of its sequence. In conclusion, (i) the previously described substrate Abz-GGdFLRRV-EDDnp, which presents the best parameters kinetics, is more suitable than Abz-dRRL-EDDnp, Abz-dRRV-EDDnp and Abz-dRRF-EDDnp for NEP assays in purified enzyme preparations and (ii) the substrates Abz-dRRL-EDDnp, Abz-dRRV-EDDnp and Abz-dRRF-EDDnp, which presents the best specificity, suits better than Abz-GGdFLRRV-EDDnp for NEP assays in crude enzyme preparations.

The presence of the neutral metallo-endopeptidase 3.4.24.11 activity was investigated by fluorimetric assay in seminal plasma. NEP was purified to homogeneity from seminal fluid. Enzyme assays were performed with Abz-dRRL-EDDnp, Abz-dRRF-EDDnp e Abz-dRRV-EDDnp. Although the enzyme was previously known to occur exclusively in membrane bound in the human or animal central nervous system, its activity was purified in seminal plasma human. The probable function of NEP in the male genital tract may be related to sperm maturation and proacrosin activation.

The kinetics of the reactions of thirteen intramolecularly quenched fluorogenic peptides with a recombinant soluble form of NEP (rNEP) have been determined. Abz-GGFLR-EDDnp, Abz-GGFLQ-EDDnp, Abz-GGFLRR-EDDnp, Abz-GGFLRQ-EDDnp, Abz-GGFLGQ-EDDnp, Abz-GGFLSQ-EDDnp, Abz-GGFLTQ-EDDnp, Abz-GGFLRRQ-EDDnp, Abz-GGFLTSQ-EDDnp, Abz-GGFLRSQ-EDDnp, Abz-GGFLTRQ-EDDnp, Abz-GGFLTSRQ-EDDnp, Abz-GGFLGGQ-EDDnp. The results of this study show that there are large differences in reactivities of the peptides containing the R in P<sub>2</sub>' position or R-R in P<sub>2</sub>' and P<sub>3</sub>' position, respectively. However the substitution of the arginines by neutral or acid

amino acids in P'<sub>2</sub> and P'<sub>3</sub> position result in peptides that are excellent substrats for NEP. The peptides containing acid amino acids S and T were more efficiently degraded than those G containing, a neutral amino acid.



# *Introdução*

## 1. ENDOPEPTIDASE NEUTRA

A endopeptidase neutra (NEP, EC 3.4.24.11, E.P. 24.11, Neprilisina, Enkefalina) é uma zinco metalo-endopeptidase transmembranar presente na superfície de várias células (LEMAY et al., 1989; GOUDREAU et al., 1994; CARVALHO et al., 1995; CARVALHO et al., 1996). Apesar de inicialmente identificada nas membranas em borda de escova das células do rim de coelho (KERR e KENNY, 1974a, b), estudos posteriores demonstraram que a NEP é largamente distribuída em uma grande variedade de tecidos de mamíferos incluindo estruturas específicas no sistema nervoso central, pulmões, trato genital masculino, intestino, neutrófilos, fibroblastos e células epiteliais (ERDOS e SKIDGEL, 1989).

A presença da NEP no cérebro de mamíferos foi mostrada estando implicada na inativação dos peptídeos opióides endógenos, [Met<sup>5</sup>]-encefalina e [Leu<sup>5</sup>]-encefalina (MALFROY et al., 1978b; ALMENOFF et al., 1981), razão pela qual é freqüentemente designada “encefalina”. Em seguida, foi comprovado o envolvimento da NEP na inativação fisiológica de outros neuropeptídeos, evidenciando que a função da NEP não era limitada a degradação das encefalinas mas estaria relacionada ao processamento pós-secretório e metabolismo de vários hormônios peptídicos e neuropeptídeos (STEPHENSON e KENNY, 1987a).

A NEP apresenta uma ampla seletividade de substratos e cliva vários pequenos peptídeos linear ou peptídeos cíclicos, tais como endotelina (FAGNY et al., 1991) ou ANP (STEPHENSON e KENNY, 1987a), assim como polipeptídeos de cadeia longa como a cadeia  $\beta$  da insulina (KERR e KENNY, 1974b) e a interleucina-1 $\alpha$  (PIERART et al., 1988).

A NEP hidrolisa também vários peptídeos de cadeia linear *in vitro* tais como, substância P e neurocininas (MATSAS et al., 1983; STEPHENSON e KENNY, 1987b), gastrina (MATSAS et al., 1984a; DURIEUX et al., 1986; ZUZEL et al., 1985), neurotensina (CHECLER et al., 1983) e o peptídeo Met-enkefalina-Arg-Fen. O peptídeo quimiotático formil-Met-Leu-Fen, foi também demonstrado ser hidrolisado pela NEP (ROQUES et al., 1993).

A distribuição da NEP na superfície das células de uma grande variedade de tecidos de mamíferos sugere que ela pode desempenhar múltiplas ações fisiológicas (ROQUES et al., 1993; VAGHY, et al.; 1995; CARVALHO et al., 1996). No rim a NEP está presente em altas concentrações na borda em escova das células epiteliais dos túbulos proximais (KERR e KENNY, 1974a, b), onde ela participa da inativação fisiológica do ANP (STEPHENSON e KENNY, 1987a; OLINS et al., 1989; ROQUES e BEAUMONT, 1990) e possivelmente de um fator ANP-símile (FONTELES et al., 1993); na superfície de células do sistema nervoso central (SCHWARTZ et al., 1981) a NEP está envolvida na inativação fisiológica das encefalinas e apresenta uma distribuição semelhante àquela do receptor opióide  $OP_1$  ( $\delta$ ) e  $OP_2$  ( $\mu$ ), incluindo as áreas envolvidas no controle da dor (MALFROY et al., 1978b; ALMENOFF et al., 1981); no pulmão, a NEP tem importante papel na inativação da substância P (SHEPPARD et al., 1988; SONT et al., 1997); na superfície dos neutrófilos, a NEP provavelmente está envolvida na hidrólise do peptídeo quimiotático bacteriano, fMet-Leu-Fen (CONNELY et al., 1985); devido sua ação em metabolizar peptídeos liberados durante processos inflamatórios, tais como, bradicinina, angiotensina II, substância P além de outros, foi sugerida sua ação no controle nos eventos inflamatórios. A NEP é encontrada nas microvilosidades intestinais (DANIELSEN et al., 1980), nos fibroblastos pulmonares (JOHNSON et al., 1985) e cutâneos (SCHULZ et al., 1988), na placenta

(JOHNSON et al., 1984), no trato genital masculino (ERDOS et al., 1985, ERDOS e SKIDGEL, 1989), tecidos vasculares (TAMBURINI et al., 1989) e na membrana celular de neutrófilos humanos (CONNELLY et al., 1985; SONT et al., 1997; TIKKANEN et al., 1996; ISHIMARU et al., 1997; CASALE et al., 1994), onde é idêntica ao antígeno das leucemias linfoblásticas agudas (CALLA, CD 10). A colocalização da NEP com placas senis no cérebro de pacientes portadores da síndrome de Alzheimer levantou a hipótese do possível envolvimento da NEP na degradação da proteína  $\beta$ -amilóide (SATO et al., 1991). Recentemente foi demonstrado a hidrólise do  $\beta$ -amilóide (fragmento 1-40) em vários sítios (ROQUES et al., 1993).

Exemplos de hormônios-peptídeos inativados pela NEP *in vivo* e *in vitro* são mostrados na **tabela 01**.

A NEP foi purificada de vários tecidos, tais como rim (KERR e KENNY, 1974), pituitária (ALMENOFF et al., 1981), cérebro (RELTON et al., 1983) e intestino (FULCHER et al., 1983; KENNY e FULCHER, 1983), utilizando detergentes para solubilizar essa proteína ligada à membrana. A obtenção de grandes quantidades de enzima pura, é de grande interesse para o conhecimento de sua estrutura e da sua função. Com esse objetivo, a utilização de substratos específicos e seletivos para a NEP é de fundamental importância.

Tabela 01 - Peptídeos degradados *in vivo* e *in vitro* pela NEP.

<b>Peptídeos degradados <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i> pela Endopeptidase Neutra</b>	
<i>in vivo</i>	<i>in vitro</i>
Encefalinas	Cadeia $\beta$ da insulina
Bradicinina	$\alpha$ e $\beta$ -neoendorfinas
Substância P	$\gamma$ -endorfina
Neurotensina	Angiotensina I e II
Peptídeo quimiotático	Neuroquininas A e B
Gastrina	$\beta$ -lipotropina
ANP	Neurotensina
	Ocitocina
	Gastrina
	Interleucina 1 $\beta$
	LHRH

## 1.1. ENSAIOS PARA QUANTIFICAR A ATIVIDADE DA NEP

Numerosos ensaios enzimáticos baseados na ampla seletividade de substratos para a NEP, foram desenvolvidos, sendo divididos em:

- (a) Substratos com marcadores radioativos baseados na determinação dos tripeptídeos [ $^3\text{H}$ ]Tir-Gli-Gli ou [ $^3\text{H}$ ]Tir-d-Ala-Gli, liberados pela NEP a partir dos substratos [ $^3\text{H}$ ]Leu-encefalina e [ $^3\text{H}$ ]d-Ala<sup>2</sup>-Leu-encefalina, respectivamente (VOGEL e ALTSTEIN, 1977; LLORENS et al., 1982).
- (b) Ensaio colorimétrico ou fluorométrico que envolve uma reação de dois passos usando substratos como glutaril-Ala-Ala-Fen-2NA (glutaril-AAF-2NA) e benzil-Gli-Arg-Arg-Leu-2NA (benzil-GRRL-2NA), catalisada seqüencialmente pela NEP e aminopeptidase N, liberando 2NA que pode ser quantificada após diazotização (ALMENOFF et al., 1981; ALMENOFF e ORLOWISK, 1984);
- (c) Ensaio fluorimétrico utilizando substratos com apagamento intramolecular tais como dansil-dAla-Gli-Fen(pNO<sub>2</sub>)-Gli [dansil-dAGF-(pNO<sub>2</sub>)-Gli] (FLORENTIN et al., 1984) e dansil-Gli-Fen(pNO<sub>2</sub>)-βAla [dansil-GF(pNO<sub>2</sub>)-βA] (GOUDREAU et al., 1994) os quais são degradados pela NEP na ligação Gli-Fen(pNO<sub>2</sub>) liberando produtos fluorescentes.

Em geral todos esses métodos apresentam algumas desvantagens, tais como, demora na realização do ensaio, baixa sensibilidade e freqüentemente é requerido o uso de inibidores de outras proteases durante a reação, devido a baixa especificidade desses substratos para NEP quando são utilizadas preparações membranares (CARVALHO et al., 1995).

## 1.2. BIOLOGIA MOLECULAR DA NEP

A estrutura primária completa da endopeptidase neutra foi deduzida a partir das seqüências de clones de DNAC de origem humana (MALFROY et al., 1988; LETARTE et al., 1988), de coelho (DEVAULT et al., 1987) e de rato (MALFROY et al., 1987). A metalopeptidase é uma proteína constituída de 749 aminoácidos, peso molecular em torno de 100.000 Dalton, apresentando três distintos domínios: uma pequena seqüência amino terminal citosólica (27 aminoácidos), seguida de um domínio hidrofóbico transmembranar (23 aminoácidos) e um longo domínio extracelular ou ectodomínio, responsável pela atividade catalítica da enzima (DEVAULT et al., 1987) (**figura 01**). Esses achados são consistentes com as sugestões prévias da organização topológica das ectoenzimas como a aminopeptidase N (ROQUES et al., 1993).

A NEP apresenta a seqüência His-Glu-Xaa-Xaa-His, característica de outras distintas metaloproteinases (BENCHETRIT et al., 1988). A NEP é uma ectopeptidase glicosilada que compartilha algumas semelhanças com a termolisina (EC 3.4.24.4), uma metalo-endopeptidase bacteriana. Ambas são metaloenzimas, inibidas pelo mesmo tipo de inibidor, o fosforamidon (DEVAULT et al., 1988;

SPUNGIN-BIALIK et al., 1996) e demonstram uma preferência em clivar substratos em resíduos aminoácidos hidrofóbicos (ERDOS et al., 1989; ROQUES et al., 1993).

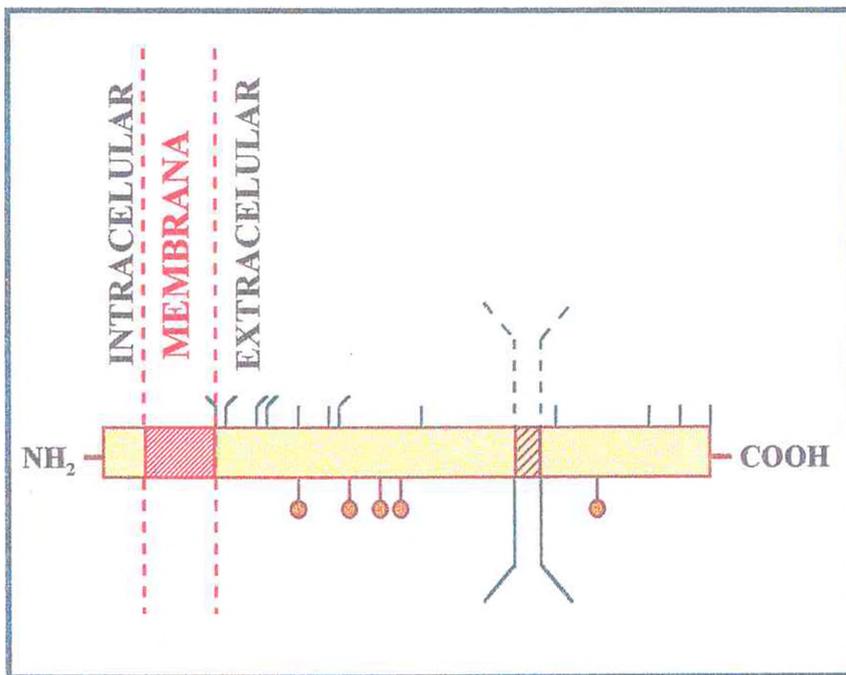
A especificidade de substratos da endopeptidase neutra e da termolisina (MATTHEWS et al., 1988), demonstra uma forte analogia entre as duas enzimas (KERR e KENNY, 1974a; ROQUES e FOURNIÉ-ZALUSKI, 1986). A maioria dos importantes aminoácidos presentes no sítio ativo da termolisina são conservados no sítio ativo NEP. Esses aminoácidos incluem: os resíduos de His<sup>583</sup> e His<sup>587</sup> na NEP, que provavelmente correspondem aos resíduos His<sup>142</sup> e His<sup>146</sup> presentes na termolisina, e dois resíduos de aminoácidos essenciais envolvidos na catálise, Glu<sup>584</sup> e His<sup>637</sup> na NEP e os resíduos Glu<sup>143</sup> e His<sup>231</sup> na termolisina (BEAUMONT e ROQUES, 1986; BATEMAN e HERSH, 1987; DEVAULT et al., 1987).

O papel de vários aminoácidos, como prováveis resíduos presentes no sítio ativo da NEP, foram testados por sítio de mutagênese dirigida, utilizando enzimas recombinantes expressadas em células COS-1. A substituição do resíduo Glu<sup>584</sup>, pela Val<sup>584</sup> aboliu completamente a degradação do substrato [<sup>3</sup>H]Leu-encefalina pela enzima mutante. Resultados semelhantes foram encontrados com a substituição do Glu<sup>584</sup> pelo Asp<sup>584</sup> (DEVAULT et al., 1988b). Esses resultados levantaram a hipótese de que o resíduo Glu<sup>584</sup> na NEP tem importante papel, semelhante ao Glu<sup>143</sup> na termolisina, o qual provavelmente está envolvido em vários passos da hidrólise da ligação peptídica (HANGAUER et al., 1984). Essas observações identificaram claramente a importância do resíduo Glu<sup>584</sup> como responsável pela atividade catalítica da NEP (DEVAULT et al., 1988b). Foram avaliados também o papel de três outros aminoácidos: His<sup>583</sup>, His<sup>587</sup> e His<sup>637</sup>,

correspondentes a His<sup>142</sup>, His<sup>146</sup> e His<sup>231</sup> presentes na termolisina, respectivamente. A substituição dos resíduos His<sup>583</sup> ou His<sup>587</sup> pela Fen<sup>583</sup> ou Fen<sup>587</sup>, reduziu drasticamente a atividade da NEPr, sugerindo que esses dois resíduos são essenciais para a catálise. Contrariamente a substituição do resíduo His<sup>637</sup> pela Fen<sup>637</sup>, não alterou a atividade da NEP mutante, levando a forte evidência de que o resíduo His<sup>637</sup> não apresenta papel significativo na catálise (DEVAULT et al., 1988a). Posteriormente ficou demonstrado que o resíduo His<sup>704</sup> era essencial para a catálise (BATEMAN et al., 1990; KIM et al., 1992a). Experimentos com a substituição do Glu<sup>646</sup> pela Val<sup>646</sup>, levou a perda da atividade da NEP (LE MOUAL et al., 1991).

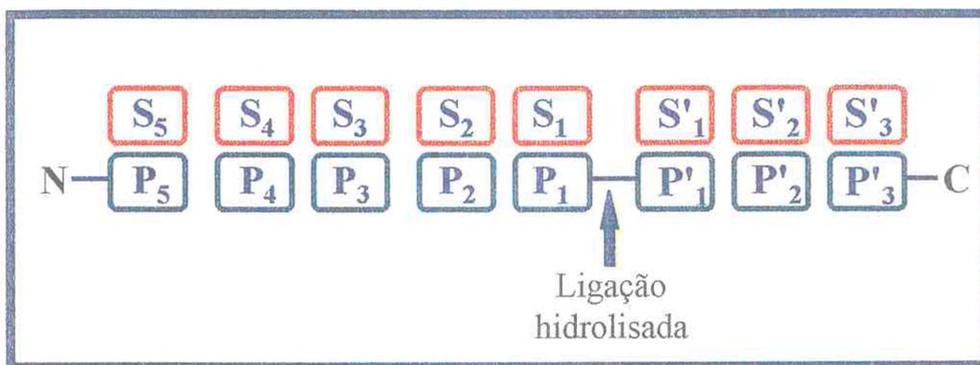
Vários grupos demonstraram a presença de resíduos Arg no sítio ativo da NEP. Estudos de mutagênese direcionada, obtendo-se enzimas mutantes, através da substituição da Arg<sup>102</sup> pela Glu<sup>102</sup> (BATEMAN et al., 1989) e da Arg<sup>747</sup> pela Met<sup>747</sup> (BEAUMONT et al., 1991) indicaram que esses dois resíduos têm importante papel na ligação com o substrato: a Arg<sup>102</sup> interagindo com o grupo carboxila livre do resíduo P'<sub>2</sub> (de acordo com a nomenclatura de SCHECHTER e BERGER, 1967) (**figura 02**) de alguns substratos e Arg<sup>747</sup> com o grupo carbonil amida do resíduo P'<sub>1</sub> (**figura 03**). A interação das encefalinas com o sítio catalítico da NEP é ilustrada na **figura 04**.

Comparando os achados estruturais entre NEP e termolisina, as duas enzimas apresentam uma preferência em clivar peptídeos em resíduos hidrofóbicos (Fen, Leu e Met) (ROQUES et al., 1986).



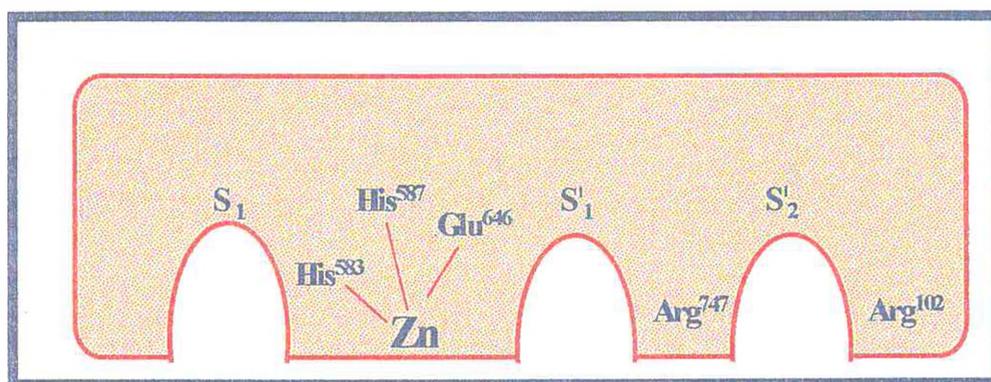
**Figura 01** - Modelo esquemático da estrutura primária da NEP.

O domínio intracelular (resíduos 1 a 27) é seguido por um domínio hidrofóbico preso à membrana plasmática (resíduo 28 a 50) seguido de um longo domínio extracelular ou ectodomínio.



**Figura 02** – Nomenclatura de SCHECHTER e BERGER, 1967.

Nomenclatura utilizada para descrever a interação entre enzimas e substratos. Os resíduos de aminoácidos no substrato são designados como P<sub>1</sub>, P<sub>2</sub>, P<sub>3</sub> e etc. em direção a extremidade N-terminal e P'<sub>1</sub>, P'<sub>2</sub>, P'<sub>3</sub> e etc. em direção a extremidade C-terminal a partir da ligação a ser hidrolisada. Os correspondentes subsítios na enzima são identificados pela letra S.



**Figura 03** - Modelo esquemático do sítio catalítico da NEP.

De acordo com esse modelo, os resíduos His<sup>583</sup>, His<sup>587</sup> e Glu<sup>646</sup> seriam os ligantes do zinco (DEVAULT et al., 1988a; LE MOUAL et al., 1991), a Arg<sup>102</sup> interagindo com o grupo carboxila livre do resíduo P<sub>2</sub>' (de acordo com a nomenclatura de SCHECHTER e BERGER, 1967) de alguns substratos e Arg<sup>747</sup> com o grupo carbonil amida do resíduo P<sub>1</sub>'.

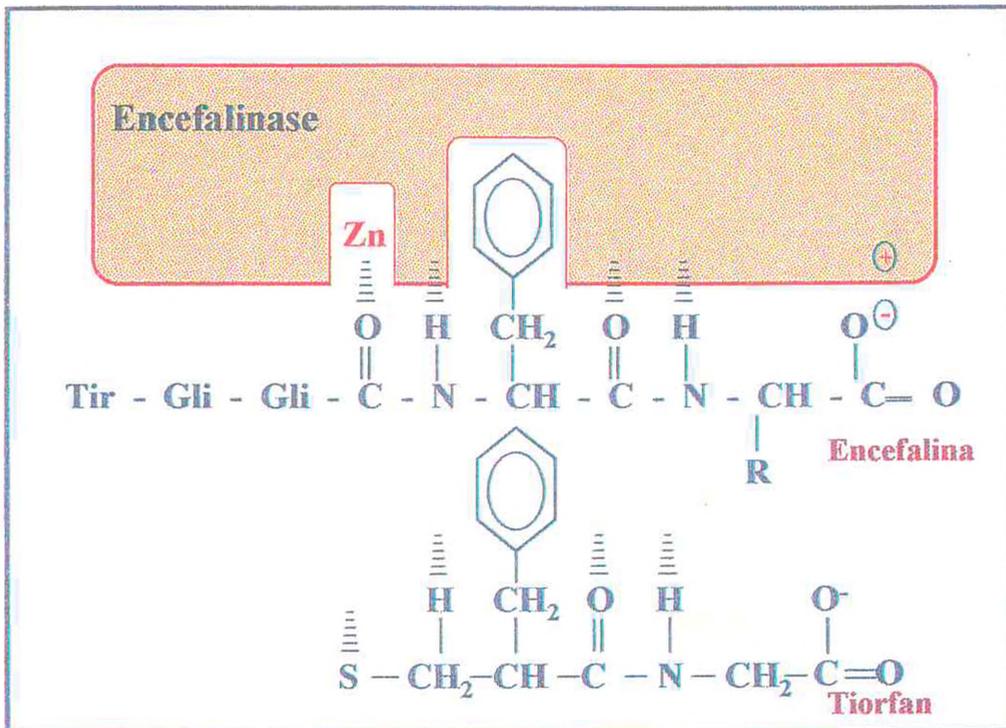


Figura 04 - Modelo de interação da encefalina e do tiorfan com o centro ativo da NEP.

### 1.3. INIBIDORES DA NEP

Um papel crucial da NEP a nível sináptico foi claramente demonstrado pelos efeitos analgésicos do tiorfan e retrotiorfan (ROQUES et al., 1993), inibidores altamente potentes dessa enzima (ROQUES et al., 1990) e pela inibição da NEP a nível periférico, resultando no aumento dos níveis de ANP plasmático (GROS et al., 1990).

O primeiro inibidor da NEP a ser identificado foi o fosforamidon (UMEZAWA, 1972), um composto de origem bacteriana inicialmente caracterizado como inibidor da termolisina (EC 3.4.24.4). Recentes estudos têm demonstrado que o fosforamidon também inibe a enzima conversora de endotelina (ECE), uma enzima responsável pela formação de endotelina I a partir da *big* endotelina (OPGENORTH et al., 1992). A NEP e a ECE podem ser diferenciadas por sua resposta ao tiorfan, o qual não inibe a ECE (XU et al., 1994).

Posteriormente, com a caracterização dos principais subsítios e do sítio ativo da NEP, os quais são responsáveis pela ligação do substrato e inibidores, foi sugerido o modelo do sítio ativo e vários potentes inibidores foram propostos como o tiorfan, retrotiorfan, acetorfan, sinorfan, além de outros (ROQUES e FOURNIÉ-ZALUSKI, 1986).

Entre os inibidores da NEP descritos, alguns têm sido utilizados para avaliar a participação da peptidase no metabolismo do ANF em estudos pré-clínicos e clínicos.

O desenvolvimento de inibidores sintéticos os quais têm sido empregados para estudar as funções fisiológicas da NEP e para o uso clínico através do aumento dos níveis de peptídeos endógenos que são substratos para essa enzima (ERDOS e SKIGEL et al., 1989; ROQUES et al., 1993; GROS et al., 1989) é de grande interesse devido o significativo envolvimento da NEP em múltiplas funções fisiológicas.

A interação das encefalinas e inibidores com o sítio catalítico da NEP é mostrado na **figura 04**.

## 2. PEPTÍDEOS DEGRADADOS PELA NEP

### 2.1 PEPTÍDEOS NATRIURÉTICOS

A demonstração das propriedades diuréticas e natriuréticas de extratos de grânulos atriais, estabeleceu a relação destes grânulos atriais com os rins e levou a descoberta e isolamento de uma nova classe de peptídeos, sendo o peptídeo natriurético atrial o principal representante dessa nova classe (DE BOLD et al., 1981). O fator natriurético atrial (ANF) é um hormônio peptídeo multifuncional e que participa de uma variedade de processos fisiológicos, regulando a homeostase cardiovascular (CANTI e GENEST, 1985, GENEST e CANTI, 1985). As ações elicítadas pelo ANF incluem: (a) redução da pressão sangüínea; (b) aumento da excreção de sal e água; (c) facilitação da passagem de água do plasma para o interstício e (d) inibição da liberação ou ações de vários hormônios, tais como aldosterona, angiotensina I, endotelina, renina e vasopressina (RUSKOAHO, 1992) (**figura 05**).

Inicialmente, o hormônio recebeu várias denominações, incluindo hormônio natriurético atrial, substância natriurética atrial, atriopeptin, atrin, auriculin, cardiodilatin e cardionatrin. Posteriormente, sua estrutura foi determinada e como se descobriu que se tratava de um peptídeo, ficou sendo denominado peptídeo natriurético atrial (ANP).

Todos os peptídeos atriais relacionados à atividade natriurética possuem em comum uma estrutura cíclica composta por 17 aminoácidos, fechada por

uma ponte dissulfeto entre as duas moléculas de cisteína que iniciam e terminam o anel (**figura 05**).

Outros peptídeos natriuréticos foram descobertos sendo denominados peptídeo natriurético cerebral (BNP) (SUDOH et al., 1988a) e peptídeo natriurético tipo-C (CNP) (SUDOH, et al., 1990). Em 1993, o grupo do Professor FONTELES identificou, no rim perfundido de coelho, uma substância com propriedades farmacológicas semelhantes ao ANP, a qual denominaram de Fator Natriurético Símile (FNS) (FONTELES et al., 1993). Estudos experimentais demonstraram que o FNS reduz a pressão arterial e tem efeito relaxante em aorta de coelho, além de diminuir os movimentos pendulares no íleo de coelho (SOUSA, 1995).

Como outros peptídeos biologicamente ativos, o ANP é originado de um precursor comum denominado pré-pró-ANP, constituído de 149 a 153 aminoácidos, dependendo da espécie. A seqüência do precursor humano consiste de 151 aminoácidos (NAKAYAMA et al., 1984; OIKAWA et al., 1984; ZIVIN et al., 1984) contendo em sua extremidade aminoterminal um peptídeo sinal constituído de 25 resíduos de aminoácidos. O pré-pró-ANP, ao perder o peptídeo sinal, é transformado em uma proteína com 126 aminoácidos denominada pro-ANP1-126 que constitui a forma predominante de estocagem do ANP no átrio (TANAKA et al., 1984; KANGAWA, et al., 1984c; NAKAO et al., 1984; BOLCH et al., 1985; LANG et al., 1985) e miócitos ventriculares (DAY et al., 1987, STOCKMANN et al., 1988). O pro-ANP1-126 após sinais específicos, é hidrolisado em um fragmento N-terminal denominado pro-ANP1-98 (MICHENER et al., 1986) e em hormônio peptídeo biologicamente ativo, da extremidade C-terminal, o ANP99 - 126 também denominado de ANP1-28, (SCHWARTZ et al., 1985).

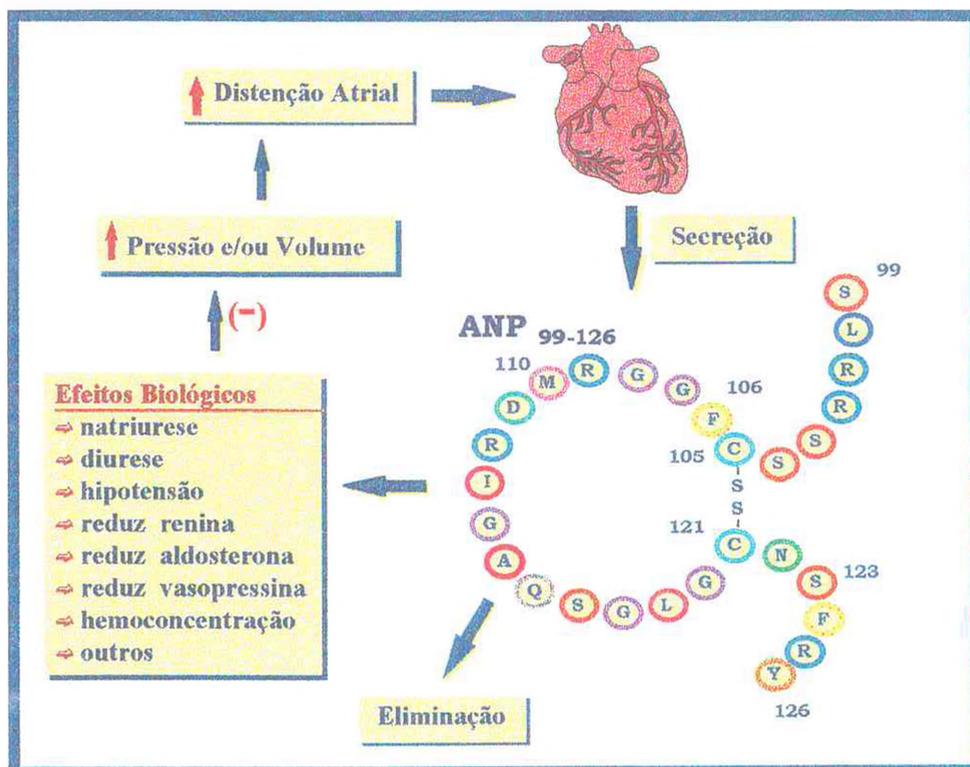


Figura 05 - Sistema hormonal do ANP.

As ações elicítadas pelo ANP incluem: redução da pressão sanguínea, aumento da excreção de sal e água, inibição da liberação ou ações de vários hormônios, tais como aldosterona, angiotensina I, endotelina, renina e vasopressina.

A estrutura em anel é essencial para a atividade biológica do ANP e, portanto, é conservada no peptídeo de 28 aminoácidos durante o processamento do pró-hormônio.

Uma vez liberado pelos miócitos atriais para circulação sistêmica, o ANP interage com receptores presentes em tecidos alvo. Sítios ligantes específicos para o ANP foram demonstrados em vários órgãos incluindo o rim, vasos sanguíneos, glândula adrenal, pulmões, fígado, intestino e sistema nervoso central.

A nível molecular, o ANP exerce suas ações fisiológicas via aumento das concentrações de GMP cíclico intracelular, conseqüente ao acoplamento do ANP a seus receptores. Dois tipos de receptores para o ANP são descritos: os receptores acoplados à adenilato ciclase, denominados ANP A, GC-A ou ANP-R1 e ANP B ANP-R3 ou GC-B (CHINKERS e GARBERS, 1991) e o receptor que tem a função de *clearance*, denominado ANPC ou ANP-R2 (MAACK et al., 1987). Os receptores tipo ANP A respondem ao ANP e ao BNP (CHANG et al., 1989) de forma semelhante. O receptor ANP B é mais seletivo para o CNP que para o ANP ou BNP (KOLLER et al., 1991; SUGA et al., 1992). Estudos recentes têm demonstrado que os mecanismos de transdução de sinal dos peptídeos natriuréticos envolvem a inibição da adenilato ciclase, com redução das concentrações de AMPc em vários tecidos alvo (ANAND-SRIVASTAVA e TRACHITE, 1993; SAVOIE et al., 1995). A ativação da fosfolipase C pelo ANP foi observada em tecidos vasculares (RESINK et al., 1988), porém um efeito inibitório foi observado no rim (BARNETT et al., 1990). O significado da influência do ANP sobre a atividade da fosfolipase C necessita ser esclarecido.

Os receptores ANP C (ANP-R2) também denominadas receptores de *clearance* são largamente distribuídos em vários tecidos ou células e contribuem para eliminar o excesso de ANP circulante (MAACK et al., 1987). A interação do ANP com esses receptores resulta em uma rápida internalização por endocitose e subsequente liberação para ser hidrolisado pelas peptidases lisosomais (MAACK et al., 1987; RATHINAVELU e ISOM, 1991).

A identificação do papel do receptor ANPc tem indicado que no mínimo dois mecanismos operam na inativação do ANP circulante; um processo de *clearance* e um processo enzimático envolvendo a endopeptidase neutra (NEP, EC 3.4.24.11). A incubação do ANP com fração membrana de rim de coelho resultou na hidrólise da ligação  $\text{Cis}^{105} - \text{Fen}^{106}$  (ou  $\text{Cis}^7 - \text{Fen}^8$ ) como ilustrado na **figura 06** (OLINS et al., 1987a). No entanto, a contribuição de cada processo no metabolismo do ANP na fisiologia e fisiopatologia é extremamente incerta. Compostos seletivos para os receptores ANPc impedem o *clearance* do ANP e conseqüentemente elevam temporariamente os níveis de ANP circulante. Experimentos realizados *in vivo*, com a administração simultânea de compostos seletivos para os receptores ANPc e inibidores seletivos para NEP, produziram elevação dos níveis de ANP e essa resposta foi mais pronunciada que a administração de cada composto isoladamente (CHIU et al., 1991; KUKKONEN et al., 1992). Observou-se que esse efeito não persistia por muito tempo sugerindo-se a idéia do envolvimento de outras vias de metabolização do ANP circulante, distinta do papel do receptor ANPc e da NEP (DELPORTE et al., 1992; CARVALHO et al., 1993).

Os peptídeos natriuréticos estão presentes nas células da granulosa de mamíferos, em oócitos e no fluido folicular (KIM et al., 1992; KIM et al., 1993), porém o papel fisiológico do ANP nessas localizações ainda permanece

desconhecido. A presença de ANP no fluido folicular pode explicar parcialmente sua capacidade de induzir a reação acrossômica, em várias espécies (ANDERSON et al., 1994). Pesquisas recentes têm sugerido a presença de um receptor espermático associada a guanilato ciclase, específico para a atividade quimioatraente do ANP (ANDERSON et al., 1995).



## 2.2 BRADICININAS

MAURÍCIO ROCHA E SILVA e colaboradores em 1949 demonstraram que a incubação do veneno da *Bothrops jararaca* ou tripsina com a fração globulina do plasma do cão resultou na formação de uma substância que produzia contração lenta do íleo de cobaio isolado. A essa substância foi atribuída a denominação de bradicinina (do grego "kinein" significa movimento e "brady" significa lento) (ROCHA E SILVA et al., 1949). Na mesma época, uma substância liberada de um precursor inativo presente no plasma e que contraia o músculo liso foi denominada de calidina (WERLE e BEREK, 1949).

Subseqüentemente vários outros peptídeos relacionados a calidina e a bradicinina em suas propriedades farmacológicas foram descobertos no veneno de vários insetos e foram denominados bradicininas (SCHACHTER e THAIN, 1954).

As cininas, denominadas bradicinina, Lis-bradicinina (calidina) e Met-Lis-bradicinina são liberadas do cininogênio por enzimas formadoras de cininas, as cininogenases, também denominadas calicreínas (CARRETERO et al., 1993; BHOOLA et al., 1992). As calicreínas constituem duas formas distintas de enzimas denominadas: calicreína plasmática e calicreína tissular e que podem ser ativadas por diferentes mecanismos. Estão presentes no plasma sendo também encontradas em outros tecidos como o pâncreas, glândulas salivares, cólon e pele (BHOOLA et al., 1992).

O precursor da caliceína denominado pré-caliceína é hidrolisado e ativado na presença de superfície ativadora de contato ou fator XII (fator de Hageman), uma protease comum a cascata da coagulação intrínseca e a cascata das cininas. Em contato com superfícies carregadas negativamente como colágeno, membrana basal, lipopolissacarídeos bacterianos ou cristais de urato, o fator XII é ativado e converte a pré-caliceína em caliceína (MEIYERS et al., 1992). Evidências preliminares sugerem que o fator XIIa (fator XII ativado) inicia vários processos envolvidos nas defesas do hospedeiro tais como quimiotaxia, aumento da permeabilidade vascular, vasodilatação, entre outros, processos esses relacionados com a resposta inflamatória.

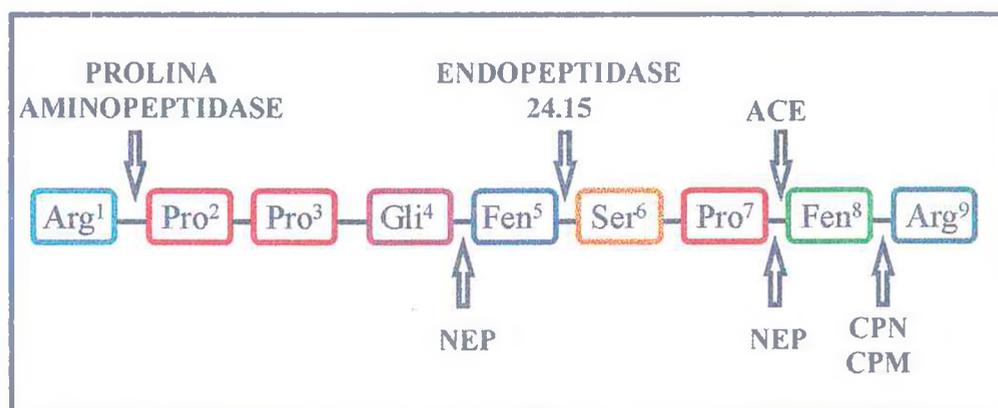
Os substratos das caliceínas são denominados cininogênio de alto peso molecular (110.000 Dalton) e o cinogênio de baixo peso molecular (70.000 Dalton). O cininogênio de alto peso molecular é clivado pela caliceína plasmática e tissular para liberar bradicinina e calidina respectivamente. O cininogênio de baixo peso molecular é o substrato da caliceína tissular formando como produto a calidina (CARRETERO et al., 1993).

As diferentes cininas são inativadas rapidamente por peptidases chamadas cininases encontradas no sangue, células endoteliais e outros tecidos (CAMPBELL et al., 1993). As cininases são divididas em duas famílias: cininase I (KI) e cininase II (KII). A família da KI é representada pela carboxipeptidase N plasmática (CPN) (BHOOLA et al., 1992; ERDOS, 1990) e a carboxipeptidase M (CPM) presentes nas membranas celulares (JOHNSON et al., 1984), ambas removem a Arg<sup>9</sup> carboxiterminal das moléculas das cininas formando des-Arg<sup>9</sup>-bradicinina e des-Arg<sup>10</sup>-calidina. O grupo das KII inclui a enzima conversora de angiotensina (ACE) que remove os resíduos Fen<sup>8</sup>-Arg<sup>9</sup> carboxiterminal e a endopeptidase neutra

(NEP) que hidrolisa as ligações  $\text{Gli}^4\text{-Fen}^5$  e  $\text{Pro}^7\text{-Fen}^8$  (LINZ et al., 1993). Duas endopeptidases, designadas como cininase A e B foram purificadas do cérebro de coelho (CAMARGO et al., 1973; OLIVEIRA et al., 1976). A cininase A, recentemente caracterizada das membranas sinápticas do cérebro de rato, como metalo-endopeptidase 24.15, cliva a ligação  $\text{Fen}^5\text{-Ser}^6$  da bradicinina. A cininase B, uma peptidil dipeptidase também identificada nas membranas sinápticas do cérebro de rato, hidrolisa a ligação  $\text{Pro}^7\text{-Fen}^8$  (ORAWSKI e SIMONS, 1989). As enzimas envolvidas na inativação da bradicinina são ilustradas na **figura 07**.

As cininas desempenham importantes funções biológicas através da interação com receptores específicos, classificados como B1 e B2 (REGOLI e BARABE., 1980). Os receptores B1 têm uma alta afinidade pela  $\text{des-Arg}^9\text{-bradicinina}$  e  $\text{des-Arg}^{10}\text{-calidina}$ , metabólitos da KI, enquanto os receptores B2 demonstram uma alta afinidade pela bradicinina e calidina (BURCH e KYLE., 1992). Ao interagir com os receptores B2 acoplados a proteína G, a bradicinina promove através da estimulação da fosfolipase A2 e C, aumento da concentração do cálcio citosólico (BUSSE e LAMOTAGNE., 1991) com formação de prostaglandinas e óxido nítrico, potentes vasodilatadores.

As cininas estão envolvidas em vários processos fisiológicos e fisiopatológicos, no entanto, a mais importante função das cininas é o seu papel nas respostas inflamatórias. Participam na regulação da pressão sangüínea, afetam a composição e o volume de urina, produzem broncoconstrição, modulam o metabolismo de glicose, regulam o fluxo sangüíneo de várias glândulas exócrinas influenciando desta maneira suas secreções e estão envolvidas nas funções reprodutivas; nas desordens inflamatórias as cininas causam vasodilatação e aumento da permeabilidade capilar resultando em edema local.



**Figura 07** – Enzimas envolvidas na inativação da bradicinina.

A CPN (ERDOS, 1979; ERDOS, 1990) e a CPM (JOHNSON et al., 1984), removem a Arg<sup>9</sup> carboxiterminal da bradicinina formando des-Arg<sup>9</sup>-bradicinina. A ACE remove os resíduos Fen<sup>8</sup>-Arg<sup>9</sup> carboxiterminal e a NEP hidrolisa as ligações Gli<sup>4</sup>-Fen<sup>5</sup> e Pro<sup>7</sup>-Fen<sup>8</sup> (LINZ et al., 1993). A metaloendopeptidase 24.15, cliva a ligação Fen<sup>5</sup>-Ser<sup>6</sup> da bradicinina (ORAWSKI e SIMONS, 1989).

## 2.3 ANGIOTENSINAS

Angiotensina II um produto do sistema renina-angiotensina é um octapeptídeo vasoativo gerada pela clivagem de um grande precursor, o angiotensinogênio, pela renina (RIORDAN, 1995; LEE et al., 1995; URATA, et al., 1995). Desempenha importante papel na regulação da pressão sistêmica e no equilíbrio hidroeletrolítico. Os fatores que reduzem a concentração de sódio no túbulo distal, que diminuem a pressão de perfusão renal ou que restringem o volume sanguíneo atuam como estímulos para a secreção de renina.

A renina, uma aspartil protease, é um importante modulador da pressão sanguínea em humanos e está presente na circulação não somente na sua forma ativa, mas também como um precursor inativo, denominado de pró-renina (MERCURE et al., 1995). A pró-renina é sintetizada como uma pró-enzima constituída de 406 aminoácidos e ao ser ativada são removidos 43 aminoácidos para formar renina. Acredita-se que o segmento de 43 aminoácidos removidos por uma atividade desconhecida, seja o responsável pelo bloqueio do acesso do substrato da renina ao sítio ativo da enzima (MERCURE et al., 1995).

Na circulação, a renina atua sobre seu substrato denominado angiotensinogênio, uma globulina sintetizado no fígado formando o decapeptídeo angiotensina I. Ao passar na circulação pulmonar a angiotensina I é convertida em angiotensina II por ação da enzima conversora de angiotensina (ACE). A angiotensina II pode ainda ser convertida por uma aminopeptidase a angiotensina III, a qual apresenta também atividade biológica, porém seu papel fisiológico é desconhecido.

As principais funções da angiotensina II incluem, vasoconstrição e a secreção de aldosterona do córtex da supra renal, resultando em retenção de sódio e água e conseqüente aumento da pressão arterial. Além desses efeitos, a ativação dos receptores da angiotensina está relacionada a estimulação ou modulação do crescimento celular, especialmente das células musculares cardíacas e vasculares (OWENS, 1985).

Os efeitos da angiotensina II são exercidos através de receptores específicos na superfície das células designados receptores AT1 e AT2 (SASAKI et al., 1991; MUKOYAMA et al., 1993; BUMPUS et al., 1991). A estimulação desses receptores leva a ativação da fosfolipase C, resultando no aumento das concentrações de cálcio intracelular. Em alguns tipos de células a ativação desses receptores resulta em inibição da adenilciclase (PEACH, 1981).

Dos componentes do sistema renina-angiotensina o interesse clínico está direcionado aos inibidores deste sistema. Sob este aspecto, os inibidores da enzima conversora de angiotensina (ACE) são bastante utilizados na terapia, e muitos antagonistas não-peptídicos do receptor da angiotensina II encontram-se em fase de desenvolvimento clínico, sendo o losartan o primeiro agente disponível para uso clínico. Dentre os inibidores da ACE, o captopril mostrou-se eficaz por via oral sendo portanto, considerado o mais ativo (CUSHMAN et al., 1977). Posteriormente outros inibidores foram sintetizados sendo denominados enalapril, enalaprilato, lisinopril, benazepril, fosinopril, quinapril, ramipril, espirapril e moexipril. Esses agentes desempenham importante papel no tratamento de doenças cardiovasculares.

A enzima conversora de angiotensina (ACE) e a NEP, duas metalopeptidases, são responsáveis pela formação da angiotensina II e pela degradação do ANP, respectivamente, e assim exercem papel crítico no metabolismo de hormônios peptídicos que apresentam essencialmente ações opostas na regulação dos eventos cardiovasculares. Com o objetivo de atuar nos dois sistemas simultaneamente, foram desenvolvidos inibidores duplos da ACE e da NEP, denominados glicoprilat e alatrioprilat. Estudos *in vitro* demonstraram que as duas combinações inibem a atividade da ACE e da NEP. A elevada potência dessas drogas é atribuída a interação com o subsítio S<sub>1</sub> da ACE e com o anel aromático do subsítio S'<sub>1</sub> da NEP (GROS et al., 1991; BRALET et al., 1994).

### 3. OS PEPTÍDEOS OPIÓIDES

Foi a partir da demonstração de sítios ligantes estereoespecíficos para a morfina e seus derivados, em cérebro de mamíferos (PERT e SNYDER, 1973; SIMON et al., 1973; TERENIUS, 1973), que a pesquisa no campo dos opióides tomou grande impulso. A existência dessas moléculas ligantes específicas para morfina e seus derivados levantou a hipótese da ocorrência de compostos endógenos no sistema nervoso central que, ao se ligarem a esses receptores, apresentassem ações morfina-símile. Essa hipótese foi confirmada em 1975 pelo grupo de KOSTERLITZ e HUGHES que purificaram e caracterizaram, utilizando extrato de cérebro de porco, dois pentapeptídeos com grande afinidade pelos receptores opióides, com a seguinte seqüência de aminoácidos: (a) tirosina-glicina-glicina-fenilalanina-metionina (Tir-Gli-Gli-Fen-Met) e (b) tirosina-glicina-glicina-fenilalanina-leucina (Tir-Gli-Gli-Fen-Leu), peptídeos que foram denominados, respectivamente, [Met<sup>5</sup>]-encefalina e [Leu<sup>5</sup>]-encefalina (HUGHES et al., 1975). O grupo de Li e Chung, na mesma época, isolou da hipófise de camelo um outro peptídeo opióide de 31 aminoácidos denominado de  $\beta$ -endorfina, que possuía em sua extremidade aminoterminal a seqüência da [Met<sup>5</sup>]-encefalina (LI e CHUNG, 1976). A  $\beta$ -endorfina apresenta a mesma seqüência de aminoácidos 61 a 91 da beta-lipotropina ( $\beta$ -LPH), precursor hormonal presente na hipófise anterior que contém também a seqüência do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH).

Posteriormente, vários outros peptídeos possuindo a seqüência da [Met<sup>5</sup>]-encefalina ou a [Leu<sup>5</sup>]-encefalina em sua estrutura foram descobertos. Atualmente já é bem conhecido que todos os peptídeos opióides contém a seqüência

da [Met<sup>5</sup>]-encefalina ou da [Leu<sup>5</sup>]-encefalina em sua extremidade aminoterminal (**figura 08**) e que três distintas famílias desses peptídeos pró-encefalina, pró-dinorfina e pró-opiomelanocortina estão presentes em diferentes sistemas neuronais dentro do sistema nervoso central. Com o avanço das técnicas de genética molecular ficou demonstrado que cada família de peptídeos opióides é derivada de três precursores distintos com distribuição anatômica característica. Esses precursores são designados como pró-encefalina, pró-opiomelanocortina e pró-dinorfina (**figura 08**). A estrutura dos genes que codificam esses precursores são semelhantes, sugerindo portanto a hipótese de um gene ancestral comum.

Apesar dos peptídeos opióides endógenos atuarem como neurotransmissores, moduladores da neurotransmissão ou neuro-hormônios, o significado fisiológico da grande diversidade desses peptídeos ainda permanece desconhecido devido sua freqüente coexistência com outros neurotransmissores, em um mesmo neurônio.

### 3.1 FAMÍLIA DOS PEPTÍDEOS OPIÓIDES ENDÓGENOS

Os vários peptídeos opióides são derivados de três precursores biossintéticos e são portanto classificados em três distintos grupos: pré-pró-opiomelanocortina, pré-pró-encefalina A e pré-pró-encefalina B. A estrutura primária dessas proteínas precursoras em várias espécies foram deduzidas através das técnicas de DNA recombinante. Através desta técnica foi possível determinar a

seqüência de nucleotídeos o que levou a elucidação da seqüência de aminoácidos dessas proteínas precursoras.

Na pele das rãs da família *Phyllomedusa sinae*, os peptídeos opióides estão presentes e do ponto de vista estrutural representam os únicos peptídeos isolados de tecidos de vertebrados que contêm um D-enantiômero em substituição ao isômero normal (L-aminoácido) (DHAWAN et al., 1996; CAMARÃO, 1995). Esses peptídeos são denominados dermorfinas A, B e C (ERSPAMER et al., 1989; LAZARUS et al., 1994); e deltorfinas B e C (RICHTER et al., 1990).

### 3.1.1. PRÉ-PRÓ-OPIOMELANOCORTINA

A pré-pró-opiomelanocortina (PRÉ-POMC) também designada precursor da corticotropina- $\beta$ -lipotropina (ACTH- $\beta$ -LPH) foi a primeira proteína precursora dessa família a ter sua estrutura conhecida, a qual foi determinada do lobo intermediário da hipófise bovina (ROBERTS e HERBERT, 1977; NAKANISHI et al., 1979). Posteriormente, a estrutura primária da pré-pró-opiomelanocortina humana foi deduzida através das mesmas técnicas de DNA recombinante (TAKAHASHI et al., 1981; COCHET et al., 1982; WHITFIELD et al., 1982). A pré-pró-opiomelanocortina é uma macromolécula constituída de 265 aminoácidos, incluindo o peptídeo sinal de 26 aminoácidos (resíduos 1-26). Ao perder o seu peptídeo sinal, a pré-pró-opiomelanocortina transforma-se em pró-opiomelanocortina, uma proteína de 241 aminoácidos, produzida no sistema nervoso central, essencialmente nos lobos anterior e intermediário da hipófise. Porém, nessas localizações, o processamento da POMC origina diferentes peptídeos

(CIVELLI et al., 1984), apesar da seqüência desse pró-hormônio ser idêntica nessas duas localizações da hipófise (**figura 09**).

A maturação da POMC no lobo anterior da hipófise origina um fragmento de 16 resíduos com extremidade aminoterminal glicosilada, um peptídeo de junção (JP), o hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) e a beta-lipotropina ( $\beta$ -LPH). Cerca de 50% da  $\beta$ -LPH, é processada originando a gama-lipotropina ( $\gamma$ -LPH) e beta-endorfina ( $\beta$ -endorfina). Na seqüência do ACTH estão presentes: alfa-melanotropina ( $\alpha$ -MSH) e peptídeo do lobo intermediário corticotropina *similar* (CLIP).

Dentro da molécula da beta-lipotropina ( $\beta$ -LPH), existe a seqüência de aminoácidos da beta-endorfina ( $\beta$ -endorfina) (LI & CHUNG, 1976), da beta-melanotropina ( $\beta$ -MSH) e gama-lipotropina ( $\gamma$ -LPH). Apesar de todos esses fragmentos serem encontrados em espécies que apresentam desenvolvimento de um lobo intermediário (ex. no rato), eles não são secretados como hormônios separados em humanos.

No lobo intermediário da hipófise, as clivagens proteolíticas iniciais parecem semelhantes às do lobo anterior, mas além disso, a maturação da pró-opiomelanocortina atinge um estágio mais avançado, originando peptídeos menores. O fragmento de 16 resíduos origina o gama-melanotropina ( $\gamma$ -MSH); o hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) é processado dando origem ao alfa-melanotropina ( $\alpha$ -MSH) e um fragmento denominado de peptídeo do lobo intermediário corticotropina *similar* (CLIP); a beta-lipotropina ( $\beta$ -LPH) é inteiramente processada em gama-lipotropina ( $\gamma$ -LPH) e várias formas de  $\beta$ -endorfina com diferentes números de resíduos aminoácidos; a gama-lipotropina ( $\gamma$ -LPH) origina o beta-

melanotropina ( $\beta$ -MSH). A descoberta inicial de que a seqüência da [Met<sup>5</sup>]-encefalina é idêntica à seqüência aminoterminal da  $\beta$ -endorfina além aparente potência elevada da  $\beta$ -endorfina, levou alguns investigadores a sugerir que a  $\beta$ -endorfina seria o precursor desse peptídeo.

Esta hipótese foi descartada pelas seguintes evidências: a) a [Leu<sup>5</sup>]-encefalina não estava contida na cadeia peptídica da  $\beta$ -LPH; b) a [Met<sup>5</sup>]-encefalina presente na extremidade aminoterminal da  $\beta$ -LPH não era seguida de um par de aminoácidos básicos, requerimento essencial para a proteólise enzimática; c) através de estudos imunohistoquímicos ficou demonstrado que a distribuição das encefalinas não era paralela à da  $\beta$ -endorfina (BLOOM et al., 1978); d) a  $\beta$ -endorfina possuía atividade maior que da encefalina.

No sistema nervoso central, a maturação da POMC é semelhante aquela presente no lobo intermediário da hipófise.

Fica evidente portanto que a função fisiológica do lobo anterior e do lobo intermediário da hipófise é diferenciada, uma vez que o lobo intermediário não produz ACTH e  $\beta$ -LPH íntegra, mas o processamento da POMC nessa área resulta em vários hormônios melanócitos estimulantes e  $\beta$ -endorfina de diferentes tamanhos. A maturação da POMC produz um único peptídeo opióide representado pela  $\beta$ -endorfina e que, apesar de conter na sua extremidade aminoterminal a seqüência da [Met<sup>5</sup>]-encefalina, não é o precursor desse peptídeo.

⇒	<b>PETÍDEOS DERIVADOS DA PRÓ-OPIOMELANOCORTINA</b>
	$\beta$ -endorfina (humana): <b>Tir-Gli-Gli-Fen-Met</b> -Thr-Ser-Glu-Lis-Ser-Gln-Thr-Pro-Leu-Val-Thr-Leu-Fen-Lis-Asn-Ala-Ile-Ile-Lis-Asn-Ala-Tir-Lis-Lis-Glu
	$\beta$ -endorfina (1-27): <b>Tir-Gli-Gli-Fen-Met</b> -Thr-Ser-Glu-Lis-Ser-Gln-Thr-Pro-Leu-Val-Thr-Leu-Fen-Lis-Asn-Ala-Ile-Ile-Lis-Asn-Ala-Tir
	$\beta$ -endorfina (1-26): <b>Tir-Gli-Gli-Fen-Met</b> -Thr-Ser-Glu-Lis-Ser-Gln-Thr-Pro-Leu-Val-Thr-Leu-Fen-Lis-Asn-Ala-Ile-Ile-Lis-Asn-Ala
	$\alpha$ -endorfina: $\beta$ -endorfina (1-16): <b>Tir-Gli-Gli-Fen-Met</b> -Thr-Ser-Glu-Lis-Ser-Gln-Thr-Pro-Leu-Val-Thr
	$\gamma$ -endorfina: $\beta$ -endorfina (1-17): <b>Tir-Gli-Gli-Fen-Met</b> -Thr-Ser-Glu-Lis-Ser-Gln-Thr-Pro
⇒	<b>PEPTÍDEOS DERIVADOS DA PRÓ-ENCEFALINA (PRÓ-ENCEFALINA A)</b>
	Leu-encefalina: <b>Tir-Gli-Gli-Fen-Leu</b>
	Met-encefalina: <b>Tir-Gli-Gli-Fen-Met</b>
	Heptapeptídeo: <b>Tir-Gli-Gli-Fen-Met</b> -Arg-Fen
	Octapeptídeo: <b>Tir-Gli-Gli-Fen-Met</b> -Arg-Gli-Leu
⇒	<b>PEPTÍDEOS DERIVADOS DA PRÓ-DINORFINA (PRÓ-ENCEFALINA B)</b>
	Dinorfina A (1-17): <b>Tir-Gli-Gli-Fen-Leu</b> -Arg-Arg-Ile-Arg-Pro-Lis-Leu-Lis-Trp-Asp-Asn-Gln
	Dinorfina A (1-8): <b>Tir-Gli-Gli-Fen-Leu</b> -Arg-Arg-Ile
	Dinorfina A ou Rimorfina: <b>Tir-Gli-Gli-Fen-Leu</b> -Arg-Arg-Gln-Fen-Lis-Val-Val-Thr
	$\alpha$ -Neo-endorfina: <b>Tir-Gli-Gli-Fen-Leu</b> -Arg-Lis-Tir-Pro-Lis
	$\beta$ -Neo-endorfina <b>Tir-Gli-Gli-Fen-Leu</b> -Arg-Lis-Tir-Pro

**Figura 08** - Seqüência de aminoácidos dos principais peptídeos opióides derivados de três distintas proteínas precursoras. A seqüência da [Met5]-encefalina ou da [Leu5]-encefalina presente em cada peptídeo estão em vermelho.

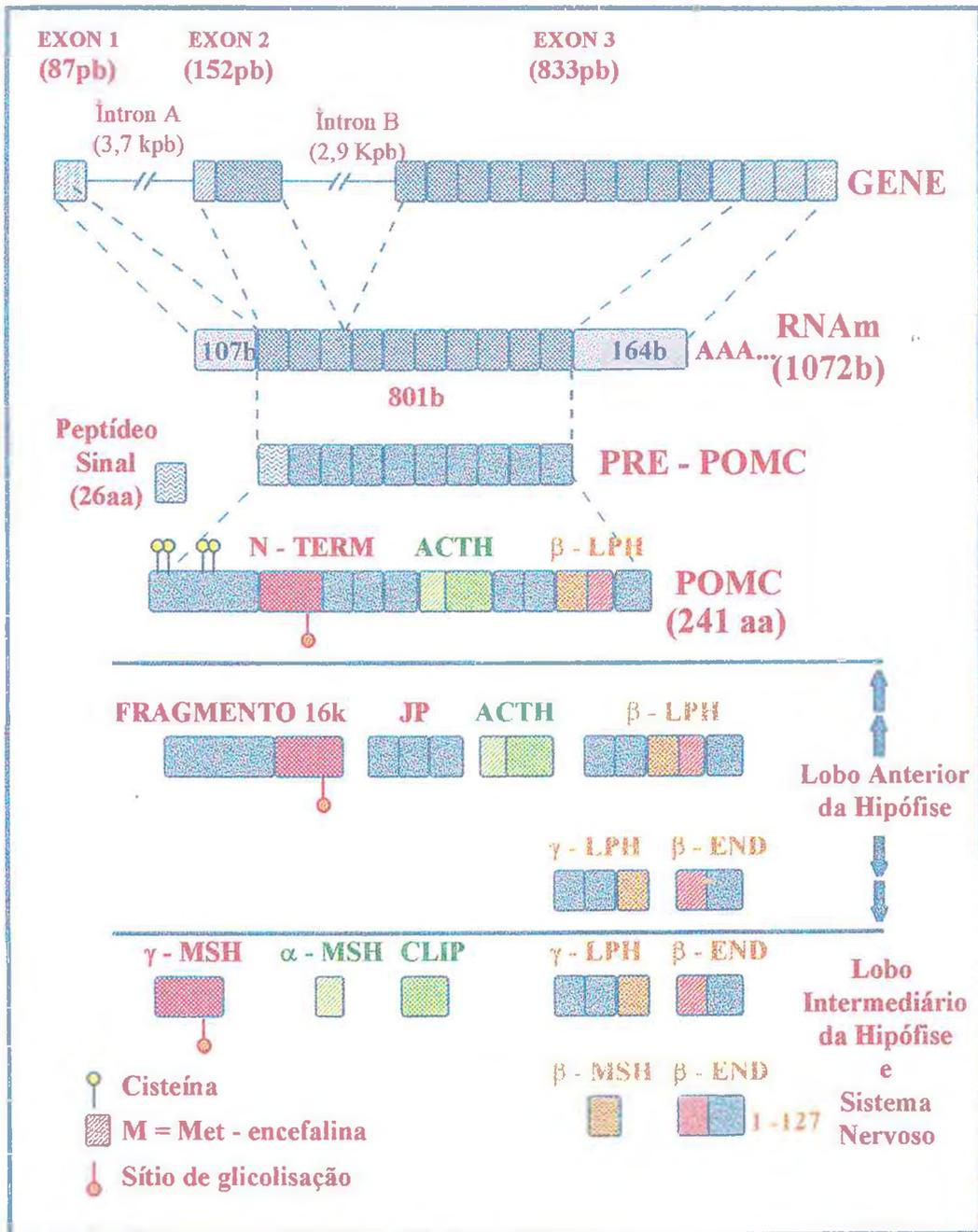


Figura 09 - Biossíntese e maturação da pró-opiomelanocortina.

### 3.1.2. PRÉ-PRÓ-DINORFINA

Na mesma época da descoberta das encefalinas, um outro peptídeo opióide distinto da  $\beta$ -endorfina foi descoberto da hipófise de porco e denominado dinorfina (COX et al., 1975; GOLDSTEIN et al., 1979; GOLDSTEIN et al., 1981). Após purificação por meio de técnicas bioquímicas clássicas, verificou-se que esse peptídeo continha 17 aminoácidos, com a seqüência da leu-encefalina em sua extremidade aminoterminal, sendo portanto, um dos primeiros peptídeos relacionados a [Leu<sup>5</sup>]-encefalina a ser caracterizado. Em seguida, foram igualmente purificados (GOLDSTEIN, 1984) a alfa-neo-endorfina ( $\alpha$ -neo-endorfina), beta-neo-endorfina ( $\beta$ -neo-endorfina) e a dinorfina B, também denominada rimorfina. Todos esses peptídeos contêm a seqüência da [Leu<sup>5</sup>]-encefalina seguida de dois resíduos de aminoácidos básicos (arginina-arginina ou arginina-lisina) e isto os tornava candidatos em potencial a precursores da [Leu<sup>5</sup>]-encefalina (PATEY e ROSSIER, 1986).

Em 1982, através de técnicas de DNA recombinante, (KAKIDANI et al., 1982) a seqüência da pré-pro-dinorfina ou pré-pro-encefalina B, foi determinada a partir da hipófise de porco, tratando-se de uma proteína semelhante à pró-opiomelanocortina, constituída de 256 aminoácidos incluindo o peptídeo sinal. Através de processamento proteolítico origina a pro-dinorfina ou pro-encefalina B, uma proteína de 234 aminoácidos. A pré-pro-encefalina B bovina contém em sua estrutura a seqüência da neo-endorfina ( $\alpha$ -neo-endorfina,  $\beta$ -neo-endorfina) e dinorfina, portanto representando o precursor comum desses peptídeos opióides.

Os peptídeos biologicamente ativos, oriundos da pró-dinorfina estão agrupados na extremidade carboxiterminal na molécula precursora: a  $\alpha$ -neo-

endorfina e  $\beta$ -neo-endorfina estão separadas da dinorfina A e dinorfina B por peptídeo inativo (**figura 10**).

No lobo anterior da hipófise, as enzimas proteolíticas clivam a pro-dinorfina em um peptídeo de 6000 Dalton contendo a dinorfina A, a dinorfina B e a extremidade carboxiterminal da pro-dinorfina.

Na neurohipófise e sistema nervoso central, os peptídeos liberados da pro-dinorfina estão presentes dentro dos mesmos neurônios que expressa vasopressina. A liberação local de vasopressina (VP) e dinorfina pode exercer um efeito inibitório parácrino direto sobre a liberação de ocitocina. Condições de estresse tais como medo, raiva ou desidratação, induzem aumento da liberação de vasopressina-dinorfina, conseqüentemente inibindo a secreção de ocitocina via receptor  $k$  presente nas terminações nervosas que expressam ocitocina, como demonstrado em ratas (ZAMIR et al., 1985; SUMMY-LONG, 1990). Admite-se que a co-liberação do neuromodulador (dinorfina) com o neurohormônio (vasopressina) pode atenuar a liberação de ocitocina.

Os peptídeos derivados da pró-dinorfina estão distribuídos através do sistema nervoso central e tecidos periféricos, provavelmente refletindo a complexidade de suas funções fisiológicas.

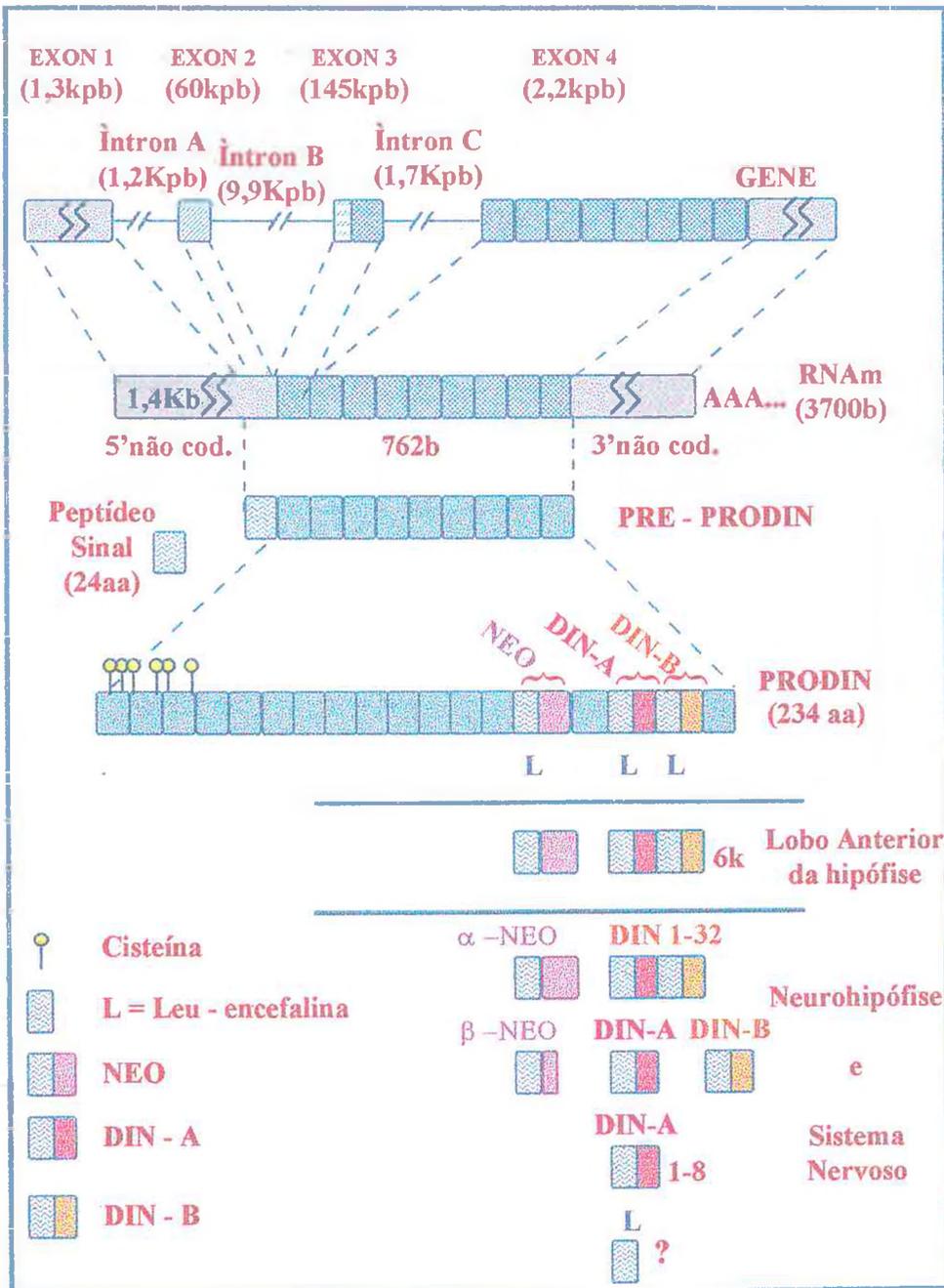


Figura 10 - Biossíntese e maturação da pró-dinorfina.

### 3.1.3. PRÉ-PRÓ-ENCEFALINA

Em 1978, o grupo de HÖKFELT demonstrou que o precursor das encefalinas se encontrava nas células cromafins da medula supra-renal de certos mamíferos (SCHULTZBERG et al., 1978). A partir de então, inúmeros peptídeos opióides foram purificados dessa glândula, incluindo encefalinas (LEWIS et al., 1979; STERN et al., 1980) e polipeptídeos contendo encefalinas (LEWIS et al., 1980; KIMURA et al., 1980; MIZUNO et al., 1980). Posteriormente, ficou estabelecido que todos os peptídeos opióides purificados dessa glândula estão presentes na seqüência de uma macromolécula precursora (UNDERFRIEND e KILPATRICK, 1983).

As técnicas de genética molecular que permitiram deduzir a seqüência da pré-pro-dinorfina foram fundamentalmente as mesmas utilizadas para clonagem da pré-pro-encefalina ou pré-pro-encefalina A. Utilizando essas técnicas, a seqüência de nucleotídeos da pré-pro-encefalina presente na glândula adrenal bovina foi deduzida (NODA et al., 1982a; GUBLER et al., 1982). Na mesma época a seqüência da pró-encefalina humana foi determinada da medula adrenal (NODA et al., 1982b; COMB et al., 1982 a e b).

A pré-pro-encefalina A bovina é composta de 263 aminoácidos e contém quatro cópias de [Met<sup>5</sup>]-encefalina e uma cópia de: [Leu<sup>5</sup>]encefalina, [Met<sup>5</sup>]-encefalina-Arg<sup>6</sup>-Fen<sup>7</sup> (STERN et al., 1979) e [Met<sup>5</sup>]-encefalina-Arg<sup>6</sup>-Gli<sup>7</sup>-Leu<sup>8</sup> (STERN et al., 1979, KILPATRICK et al., 1981a). As mesmas cópias de peptídeos opióides são também encontradas na seqüência da pré-pro-encefalina A humana (COMB et al., 1982a; NODA et al., 1982b), demonstrando a elevada homologia entre as duas macromoléculas. Peptídeos maiores contendo em sua seqüência os

pentapeptídeos [Met<sup>5</sup>]-encefalina e [Leu<sup>5</sup>]-encefalina são encontrados também no precursor. Esses peptídeos são denominados: peptídeo F (JONES et al., 1980), peptídeo I (STERN et al., 1981), peptídeo E (KILPATRICK et al., 1981b), BAM-22P (MIZUNO et al., 1980b), BAM 20P, BAM 12P (MIZUNO et al., 1980a) e peptídeo B (STERN et al., 1981).

A maturação da pré-pro-encefalina A no sistema nervoso central produz quatro cópias de [Met<sup>5</sup>]-encefalina, uma cópia de [Leu<sup>5</sup>]-encefalina, o heptapeptídeo [Met<sup>5</sup>]-encefalina-Arg<sup>6</sup>-Fen<sup>7</sup> e o octapeptídeo [Met<sup>5</sup>]-encefalina-Arg<sup>6</sup>-Gli<sup>7</sup>-Leu<sup>8</sup>. Na medula da supra-renal, a maturação da pré-pró-encefalina origina os mesmos peptídeos produzidos no sistema nervoso central além de outros peptídeos contendo encefalinas tais como, BAM-12P, BAM-20P, BAM-22P, peptídeos B, I, E e F (**figura 11**).

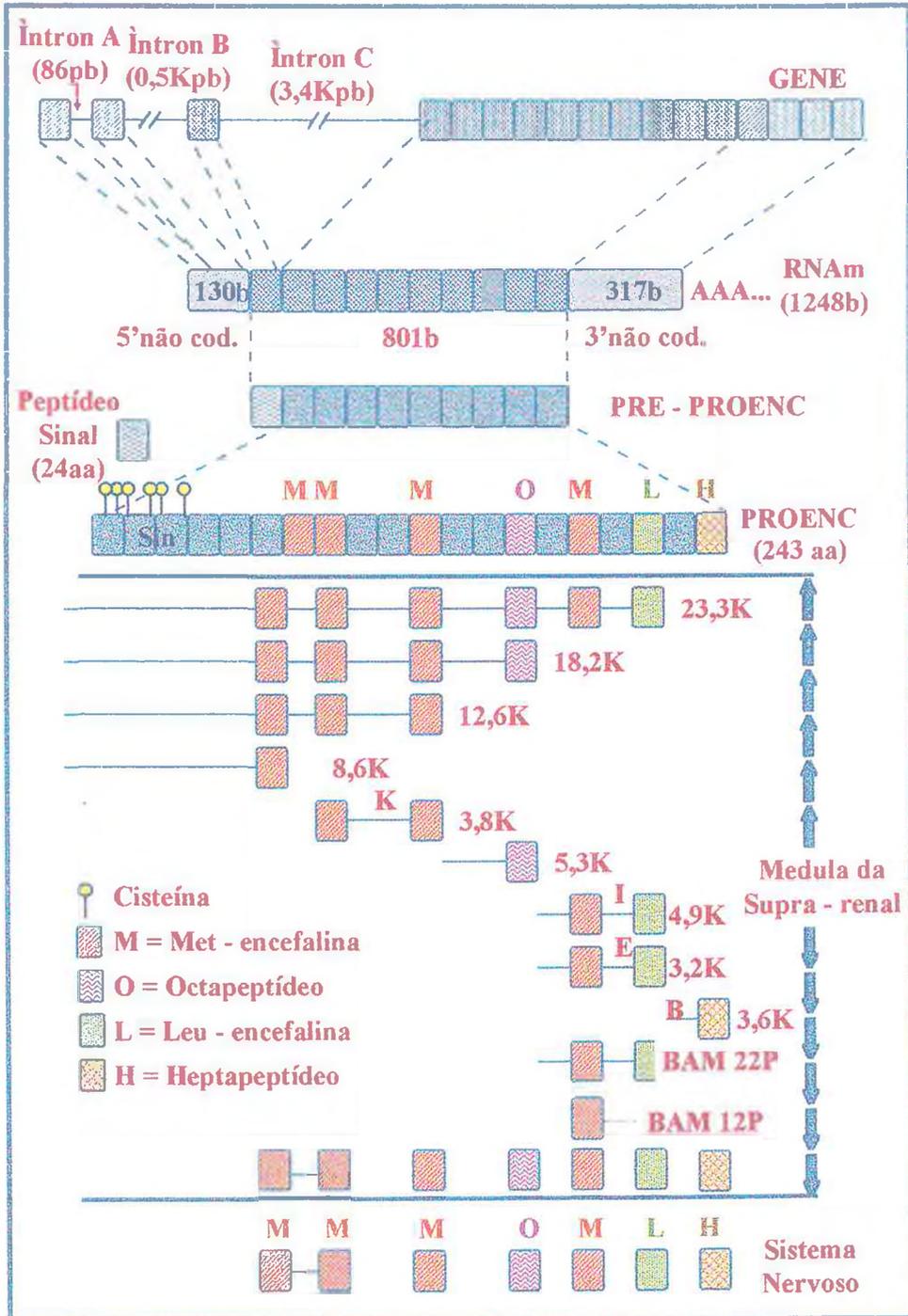


Figura 11 - Biossíntese e maturação da pró-encefalina.

## 4. FUNÇÕES FISIOLÓGICAS DOS PEPTÍDEOS OPIÓIDES

O mecanismo de analgesia opióide a nível periférico e central não são completamente conhecidos. Os receptores opióides exercem seus efeitos por atuarem na proteína G acoplada a sistemas efetores, tais como, canais iônicos e segundos mensageiros. As encefalinas ao serem liberadas do interneurônio, interagem com receptores opióides presentes no botão terminal do neurônio sensorial nociceptivo. O acoplamento dos receptores opióides à proteína G inibitória ( $G_i$ ) causa inibição da adenilciclase, reduzindo o nível intracelular de AMPc (adenosina monofosfato cíclico), um segundo mensageiro, resultando na inibição de uma proteína quinase dependente de AMPc. Como consequência ocorre uma hiperpolarização por aumento da condutância ao potássio para o interior da célula. Dessa maneira, a informação da sensação dolorosa seria bloqueada antes de chegar ao nível cortical.

Os peptídeos opióides produzem seus efeitos fisiológicos através de sua interação com distintos receptores denominados: Mu ( $\mu$ ), Kappa ( $\kappa$ ), Sigma ( $\sigma$ ) (MARTIN et al., 1976) e Delta ( $\delta$ ) (LORD et al., 1977). Outros receptores para o sistema opióide foram sugeridos e denominados: Epsilon ( $\epsilon$ ) (WUSTER et al., 1979), zeta ( $\zeta$ ) (ZAGON et al., 1991) e receptor lambda ( $\lambda$ ) (GREVEL et al., 1985).

Recentemente a *International Union of Pharmacology (IUPHAR) Committee on Receptor and Drug Classification* sugeriu uma nova nomenclatura para os receptores opióides baseada na ordem cronológica referente à demonstração formal da existência desses receptores pela clonagem e

sequenciamento (VANHOUTTE et al., 1996). De acordo com a nova nomenclatura os receptores nos quais todos os opióides atuam como agonistas são designados **OP**.

Como o receptor delta ( $\delta$ ) foi o primeiro a ser clonado (EVANS et al., 1992) foi designado de  $OP_1$ . Os receptores Kapa ( $\kappa$ ) e Mu ( $\mu$ ) clonados posteriormente (KIEFFER et al., 1995; SATOH e MINAMI, 1995) receberam a denominação de receptores  $OP_2$  e  $OP_3$ , respectivamente. A existência de subtipos dos receptores opióides é uma hipótese a ser esclarecida (VANHOUTTE et al., 1996).

A maioria das drogas utilizadas clinicamente são relativamente mais seletivas para os receptores  $OP_3$  ( $\mu$ ). Os receptores  $OP_3$  ( $\mu$ ) são mais seletivos para  $\beta$ -endorfina, dinorfina A e [Met<sup>5</sup>]-encefalina. A ativação dos receptores  $OP_3$  ( $\mu$ ) produz analgesia, depressão respiratória e da motilidade gastrointestinal, miose e euforia; os receptores  $OP_2$  ( $\kappa$ ), são mais seletivos para as dinorfinas, estão envolvidos com analgesia, miose e sedação; os receptores  $OP_1$  ( $\delta$ ) são mais seletivos para encefalinas. Foi demonstrado recentemente que a estimulação do receptor opióide  $OP_1$  ( $\delta$ ) leva a ativação da fosfolipase C, assim como inibição ou estimulação de distintas isoformas de adenilciclase (CHAN et al., 1995).

Como verdadeiros hormônios da adenohipófise, os opióides endógenos estão em íntima correlação com o sistema endócrino. Os peptídeos opióides endógenos gerados na hipófise anterior inibe a secreção de gonadotrofinas por suprimir a liberação hipotalâmica do hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH) (SHOUP et al., 1985). Os principais opióides que afetam a liberação de GnRH são  $\beta$ -endorfina e dinorfina. Trabalhos recentes têm sugeridos que os

peptídeos opióides endógenos estão envolvidos no controle local da função testicular. As células de Leydig sintetizam e secretam  $\beta$ -endorfina e dinorfinas os quais atuam em sítios ligantes específicos na membrana das células de Sertoli. Acredita-se que esses peptídeos opióides presentes no testículo podem atuar como moduladores da função intragonadal (BOITANI et al., 1989).

Atualmente, já está estabelecido o envolvimento dos peptídeos opióides na modulação do sistema imune. O sistema neuroendócrino e o sistema imune estão intimamente relacionados e a interação entre esses dois sistemas ocorre de forma bidirecional. No sistema nervoso central, um dos alvos do sistema imune é o astrócito. Essas células gliais estimuladas pela interleucina 1- $\beta$  sintetizam peptídeos opióides da família da pró-encefalina e aumentam expressão do receptor opióide  $OP_3$  ( $\mu$ ) (RUZICKA et al., 1996). Existe forte evidência do envolvimento da  $\beta$ -endorfina na patogênese das doenças autoimunes. Há relatos de que o aumento da produção de citocinas em desordens imunoinflamatórias induz produção de  $\beta$ -endorfinas pela pituitária e pelos linfócitos; a elevação dos níveis de  $\beta$ -endorfina causa inibição dos linfócitos T-helper e ativação das células natural killer com supressão da função dos linfócitos B. A  $\beta$ -endorfina exerceria efeitos inibitórios diretos na produção de anticorpos. Diante dessas observações, postulou-se a hipótese de que nas desordens autoimunes, o aumento dos níveis de citocinas, via estimulação da produção de  $\beta$ -endorfinas, pode exercer um efeito de *feed back* negativo na produção de anticorpos e potencialização da produção de autoanticorpos (MORCH e PEDERSEN, 1995). Os peptídeos opióides têm sido empregados no tratamento de algumas desordens imunológicas. Em pacientes portadores da síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS), a Met-encefalina foi utilizada experimentalmente na terapêutica por produzir aumento das células

T-helper, ativar as células T e linfócitos B (PLOTNIKOFF et al., 1986). Os peptídeos opióides são considerados, portanto, moduladores do sistema imune através da regulação da função das células imunocompetentes (RUZICKA et al., 1996).

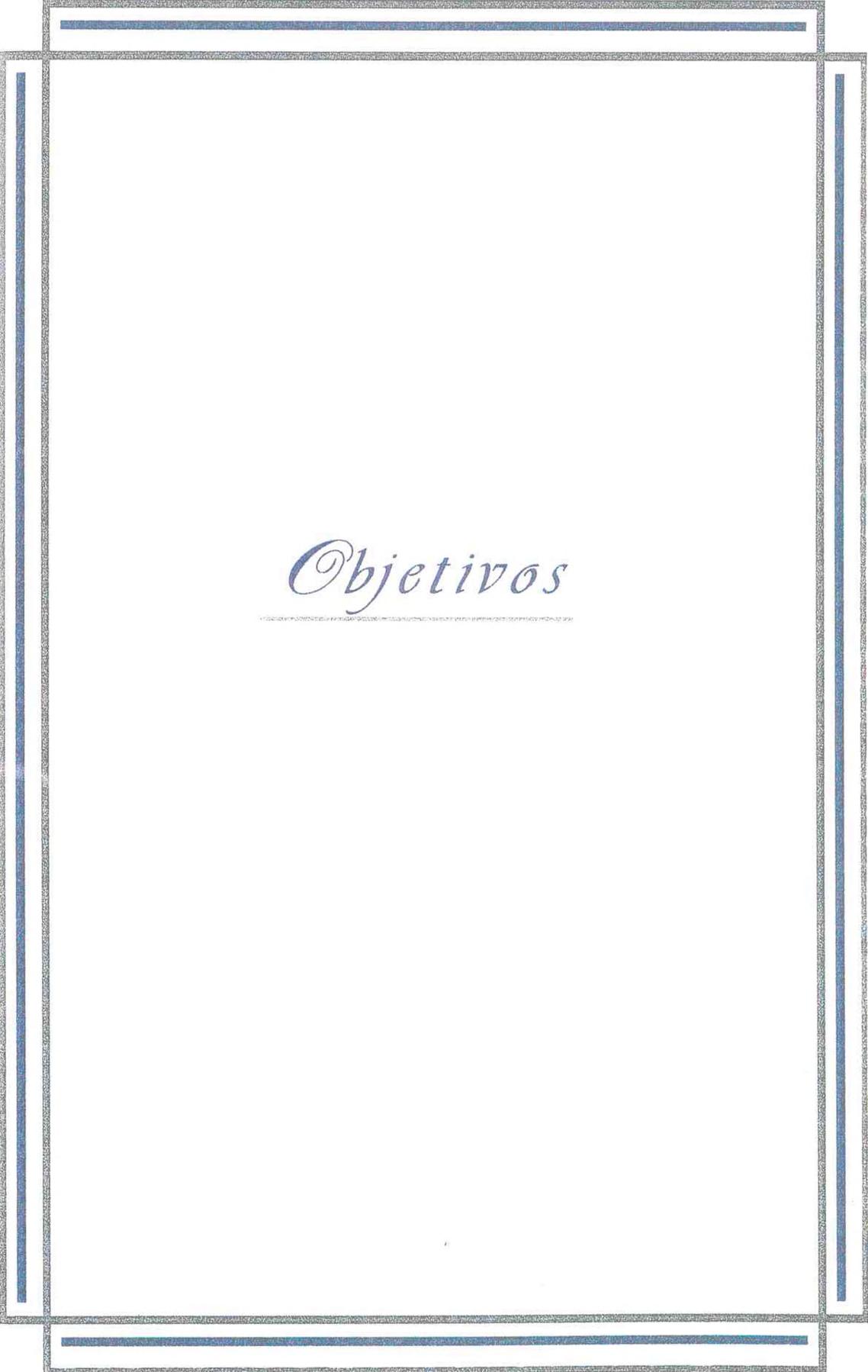
## 5. ENVOLVIMENTO DA ENDOPEPTIDASE NEUTRA (NEP) NO METABOLISMO DOS PEPTÍDEOS OPIÓIDES

Estudos têm indicado que a NEP é uma enzima chave na homeostase dos peptídeos opióides [Met<sup>5</sup>]-encefalina e [Leu<sup>5</sup>]-encefalina no cérebro de mamíferos (MALFROY et al., 1978b; ALMENOFF et al., 1981; MATSAS et al., 1984).

Várias evidências têm indicado que a atividade que hidrolisa a ligação Gli<sup>3</sup>-Fen<sup>4</sup> dos peptídeos opióides [Met<sup>5</sup>]-encefalina e [Leu<sup>5</sup>]-encefalina, pode ser responsável pela inativação fisiológica desses pentapeptídeos. Essa atividade capaz de hidrolisar a ligação Gli<sup>3</sup>-Fen<sup>4</sup>, foi atribuída a NEP (HERSH, 1984). Essa convicção é baseada nas seguintes observações: a) os produtos resultantes da hidrólise das encefalinas são metabólitos biologicamente inativos, b) o aumento da potência biológica de vários análogos sintéticos das encefalinas, pode ser explicado pela resistência desses peptídeos sintéticos à NEP c) a administração de tiorfan, um inibidor seletivo da NEP, resultou em um efeito antinociceptivo dependente do naloxone, o qual foi provavelmente devido a proteção das encefalinas endógenas da ação da NEP (ROQUES et al., 1980).

O maior metabólito da [Met<sup>5</sup>]-encefalina em preparações *in vivo* e *in vitro* de cérebro de rato foi o tripeptídeo Tir-Gli-Gli (CRAVES et al., 1978; MALFROY et al., 1978). Estudos mostraram que o inibidor da NEP, tiorfan, quando adicionado em preparações de cérebro, causava aumento da liberação de encefalinas (ROQUES et al., 1993). Todos esses estudos demonstram a importância da NEP no metabolismo das encefalinas.

Apesar dos peptídeos opióides serem bons substratos para NEP, alguns como por exemplo, as dinorfinas,  $\beta$ -endorfinas,  $\alpha$  e  $\beta$ -neoendorfinas, são pouco degradados por essa enzima. Todos esses eles apresentam a seqüência da [Met<sup>5</sup>]-encefalina ou [Leu<sup>5</sup>]-encefalina, considerados bons substratos para NEP, na extremidade aminoterminal. Porém, por razões ainda desconhecidas dinorfina<sub>1-9</sub>, dinorfina<sub>1-13</sub>,  $\beta$ -endorfina,  $\alpha$ -neo-endorfina e  $\beta$ -neo-endorfina são considerados pobres substratos para NEP. Acredita-se que, por razões conformacionais as ligações peptídicas alvo, seriam protegidas da ação da NEP (ROQUES et al., 1993; HUPE-SODMANN et al., 1995).



# *Objetivos*

1. Esclarecer o envolvimento da endopeptidase neutra (NEP, EC 3.4.24.11, Neprilisina, Enkefalinaase) na degradação fisiológica dos peptídeos opióides endógenos.
2. Desenvolver novos ensaios para quantificação da atividade catalítica da NEP com rapidez, alta sensibilidade e elevada especificidade.



*Material*

### 3.1. Fonte de Enzimas

Uma forma solúvel recombinante de NEP (NEPr) (LEMAY et al., 1989; FOSSIEZ et al., 1992) foi cedida gentilmente pelo Professor GUI BOILEAU do Département de Biochimie, Faculté de Medicine, Université de Montréal, Montréal, Canadá.

Frações membranares cruas foram obtidas de placenta, membrana amniótica e cordão umbilical de 6 pacientes da clínica obstétrica da Maternidade-Escola Assís Chateaubriand do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Ceará. As pacientes foram submetidas a cesareana eletiva por cesárea anterior (sem patologias clínicas e/ou obstétricas prévias).

Frações membranares cruas, foram obtidas de cérebro, pulmão e rim de tecidos de ratos wistar oriundos do biotério do Departamento de Fisiologia e Farmacologia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Ceará.

As amostras de sêmen foram obtidas de pacientes do Serviço de Reprodução Humana da Maternidade-Escola Assís Chateaubriand do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Ceará. Essas amostras eram destinadas à avaliação da infertilidade conjugal.

Enzima conversora de angiotensina foi purificada do soro de coelho como previamente descrito (DORER et al., 1970).

### 3.2. Reagentes

Acetonitrila - Acetonitrile for HPLC

ERBA - Reagenti - Montedison Group

Ácido Acético P.A. - E. Merck, Darmsdatt

Ácido Clorídrico P.A. - Merck, Ind. Brasileira

Ácido Tricloroacético P.A. - E. Merck, Darmsdatt

Albumina Bovina - Milles Laboratories Inc. USA

Blue Dextran - Pharmacie Fine Chemicals, Upalla, Suécia

Comasie Blue, lote 18C-032, nº B1131, Sigma

DEAE-cellulose - (DE-52) microgranular, lote 245243, Whatman,  
Maisdatone, England

Etanol P.A. - Merck, Ind. Brasileira

Tris-hidroxi-metil-aminometano - E. Merck, Darmsdatt

### 3.3. Peptídeos Fluorogênicos

Os peptídeos foram gentilmente cedidos pelo PROFESSOR LUIZ JULIANO do Departamento de Biofísica da Escola Paulista de Medicina da Universidade Federal de São Paulo. A lista abaixo representa os peptídeos sintetizados pelo PROFESSOR JULIANO e que foram usados como substratos em vários experimentos:

Abz - Gli - Gli - Fen - Leu - Arg - EDDnp  
Abz - Gli - Gli - Fen - Leu - Arg - Arg - EDDnp  
Abz - Gli - Fen - Leu - Arg - Arg - Val - EDDnp  
Abz - Fen - Leu - Arg - Arg - Val - EDDnp  
Abz - Gli - Gli - Fen - Leu - Arg - Arg - Val - EDDnp  
Abz - Ala - Ala - Fen - Leu - Arg - Arg - Val - EDDnp  
Abz - dAla - Gli - Fen - Leu - Arg - Arg - Val - EDDnp  
Abz - Gli - dAla - Fen - Leu - Arg - Arg - Val - EDDnp  
Abz - Gli - Gli - dFen - Leu - Arg - Arg - Val - EDDnp  
Abz - Gli - Gli - Fen - Leu - Tre - Ser - Gln - EDDnp  
Abz - Gli - Gli - Phe - Met - Tre - Ser - Gln - EDDnp  
Abz - Gli - Gli - Fen - Leu - Arg - Arg - Val - Gln - EDDnp  
Abz - Gli - Gli - Fen - Leu - Arg - Arg - Val - Glu - EDDnp  
Abz - Gli - Gli - Fen - Leu - Arg - Arg - Gln - EDDnp  
Abz - Gli - Gli - Fen - Leu - Arg - Arg - Ala - Gln - EDDnp  
Abz - Gli - Gli - Fen - Ile - Arg - Arg - Val - Gln - EDDnp  
Abz - Gli - Gli - Fen - Ile - Arg - Arg - Gln - EDDnp  
Abz - Gli - Gli - Fen - Leu - Arg - Gln - EDDnp  
Abz - Fen - Leu - Arg - Gln - EDDnp  
Abz - Gli - Gli - Fen - Leu - Pro - Gln - EDDnp  
Abz - Gli - Gli - Fen - Leu - Gln - EDDnp  
Abz - Gli - Gli - Fen - Leu - Tre - Gln - EDDnp  
Abz - Gli - Gli - Fen - Leu - Ser - Gln - EDDnp  
Abz - Gli - Gli - Fen - Leu - Tre - Ser - Gln - EDDnp  
Abz - Gli - Gli - Fen - Leu - Tre - Ser - Arg - Gln - EDDnp  
Abz - Gli - Gli - Fen - Leu - Tre - Arg - Gln - EDDnp  
Abz - Gli - Gli - Fen - Leu - Arg - Ser - Gln - EDDnp

Abz - Gli - Gli - Fen - Leu - Gli - Gln - EDDnp  
Abz - Gli - Gli - Fen - Leu - Gli - Gli - Gln - EDDnp  
Abz - dArg - Arg - Leu - EDDnp  
Abz - dArg - Arg - Fen - EDDnp  
Abz - dArg - Arg - Val - EDDnp  
Abz - Arg - Arg - Val - EDDnp

### 3.4. Aparelhos diversos

Agitador de tubos - AP 56 - Phoenix  
Agitador e placa aquecedora - Fisatom  
Balança analítica - Marte AM 550 - Automarte  
Banho - Maria  
Banho de circulação - Thermostat - U10  
Bomba peristáltica - Technicon Instruments Corporation -  
New Yor  
Câmara fria  
Centrífuga Excelsa Baby modelo 206 - FANEM  
Centrífuga refrigerada - Beckman, modelo J-212C  
Coluna de HPLC - Nucleosil 5 $\mu$ m C<sub>18</sub>, 145 x 4,5 mm  
Coluna de vidro para cromatografia de DEAE-celulose  
Espectrofluorômetro Shimadzu modelo F 2000  
Espectrofotômetro modelo G-2000 - Beckman Instruments Inc.  
Munchen DDR

Fonte para eletroforese - Intec Instrumental Tecnico Cientific LTDA

Freezer

Homogeneizador Potter

HPLC - Shimadzu, modelo SCL 10A

Liofilizador - Edwards

Liquidificador - Walita - Beta

Microseringas - Hamilton r

Pipetas automáticas

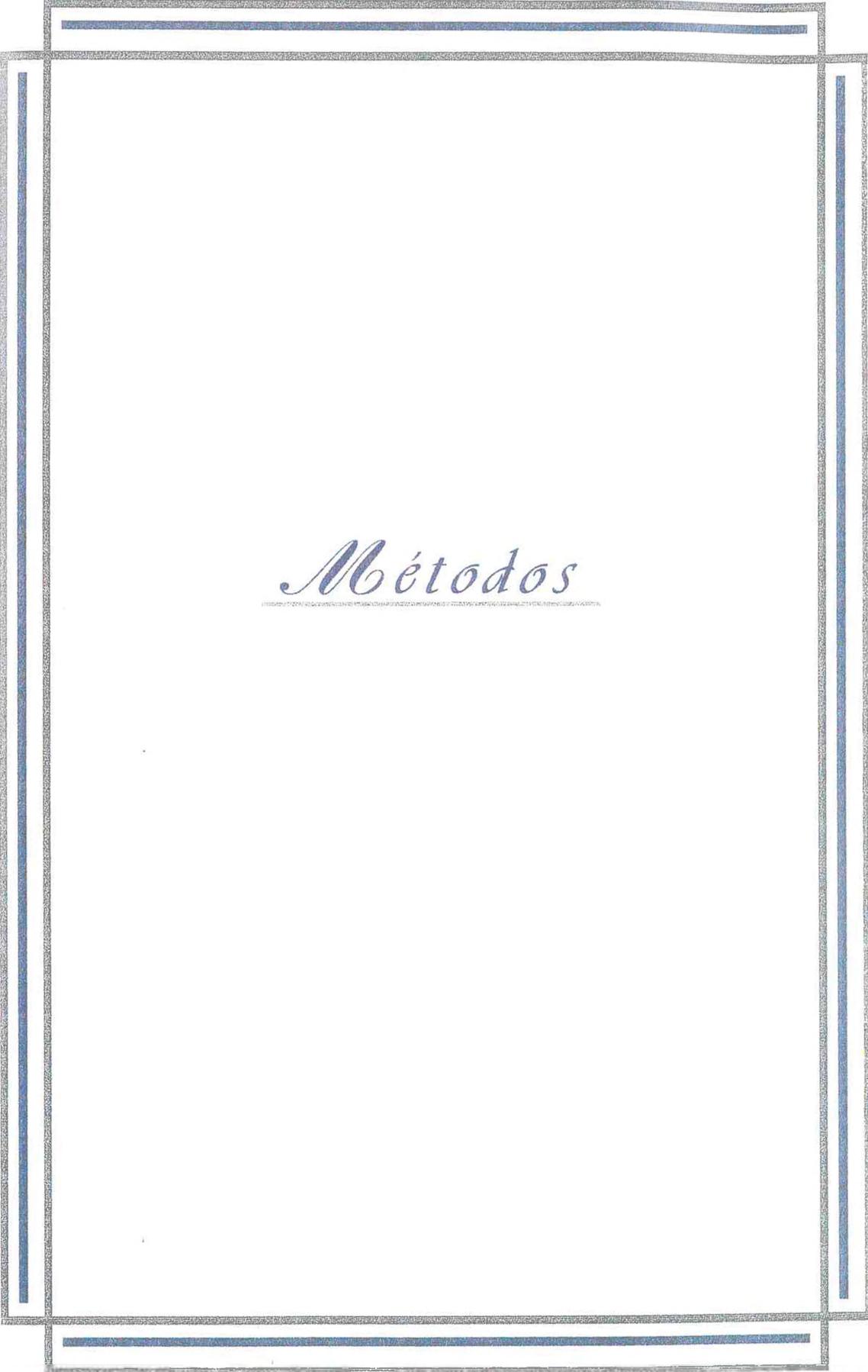
Ponteiras

Potenciômetro MV85 - Clamman & Granhert, Oresden, DDR

Refrigerador

Rotores J.A. 14 e 20, Beckman Instruments, Inc. Califórnia, USA

Tubos de ensaio



*Métodos*

#### 4.1. Enzimas

Uma forma solúvel recombinante de NEP (NEPr) foi expressada usando o sistema *baculovirus/insect-cell*, e purificada por imunoafinidade como previamente descrito (LEMAY et al., 1989; FOSSIEZ et al., 1992).

As frações membranares cruas foram obtidas de placenta, membrana amniótica, cordão umbilical, tecidos de ratos de cérebro, pulmão e rim. Todas as frações membranares foram submetidas a homogeneização em tampão Tris-HCl, 50 mM, pH 7,5 (1/4), usando-se um homogeneizador Potter, a 4°C. O homogenato foi centrifugado por 10 minutos a 1.000 g e o precipitado foi descartado. O sobrenadante foi centrifugado a 80.000 g por 60 minutos. O precipitado foi lavado, 5 vezes consecutivas, pela ressuspensão em tampão Tris-HCl, 50 mM contendo NaCl 0,1M, pH 7,5 e centrifugado a 80.000 g por 30 minutos. O precipitado resultante, foi ressuspendido em tampão Tris-HCl 50 mM, pH 7,5 ( 1/4 ) e utilizado como fonte de enzima (CARVALHO et al., 1995, CARVALHO et al., 1996).

As amostras de sêmen foram obtidas por masturbação de pacientes submetidos a investigação da infertilidade conjugal. Ao chegar ao laboratório, o sêmen era dividido em duas frações sendo uma usada para análise seminal, de acordo com os critérios descritos *World Health Organization (WHO)* e outra fração foi centrifugada a 80.000 g por 60 minutos para obtenção do plasma seminal que foi então usado como fonte de enzima.

## 4.2. Ensaio Enzimático

Para o ensaio enzimático foram utilizados substratos fluorogênicos com apagamento intramolecular de fluorescência sintetizados pelo método de solução (CHAGAS et al., 1990; OLIVEIRA et al., 1992). Esses peptídeos fluorogênicos contêm um grupamento fluorescente, *orto*-aminobenzóico (Abz), na extremidade aminoterminal e um grupamento apagador 2,4- etilenodiaminodinitrifeno (EDDnp) na extremidade carboxiterminal. O substrato apresenta uma baixa fluorescência devido ao eficiente efeito apagador do grupo EDDnp sobre o grupo fluorescente Abz, possivelmente resultante da proximidade entre as extremidades aminoterminal e carboxiterminal do peptídeo (OLIVEIRA et al., 1992). Uma vez hidrolisado em qualquer ligação peptídica, ocorre aumento da fluorescência e esse aumento é muito sensível a distância entre os grupos doador e aceptor. Essa elevação da fluorescência, é medida com os espectros de excitação ( $\lambda_{ex}$ ) de 320 nm e emissão ( $\lambda_{em}$ ) de 420 nm, utilizando-se um espectrofluorômetro. A **figura 12** resume o conceito de substratos com apagamento intramolecular da fluorescência.

A hidrólise dos substratos fluorogênicos foi monitorizada pelo aumento da fluorescência ( $\lambda_{em} = 420$  nm e  $\lambda_{ex} = 320$  nm) em um espectrofluorômetro modelo Shimadzu F 2000. Em uma cubeta medindo 0,5 cm de largura e 1 cm de comprimento foram adicionados 250  $\mu$ l de Tris-HCl 50 mM, pH 7,5 e os substratos, na concentração de 10 a 20  $\mu$ M. Em seguida, foi adicionada NEPr (0,5  $\mu$ g ml<sup>-1</sup>) e o aumento da fluorescência foi avaliada continuamente durante 5-15 minutos. Nas mesmas condições foram utilizadas termolisina (0,15  $\mu$ g ml<sup>-1</sup>),  $\alpha$ -quimotripsina (8  $\mu$ g ml<sup>-1</sup>), tripsina (15  $\mu$ g ml<sup>-1</sup>) e enzima conversora de angiotensina (10  $\mu$ g ml<sup>-1</sup>) (DORER et al., 1970).

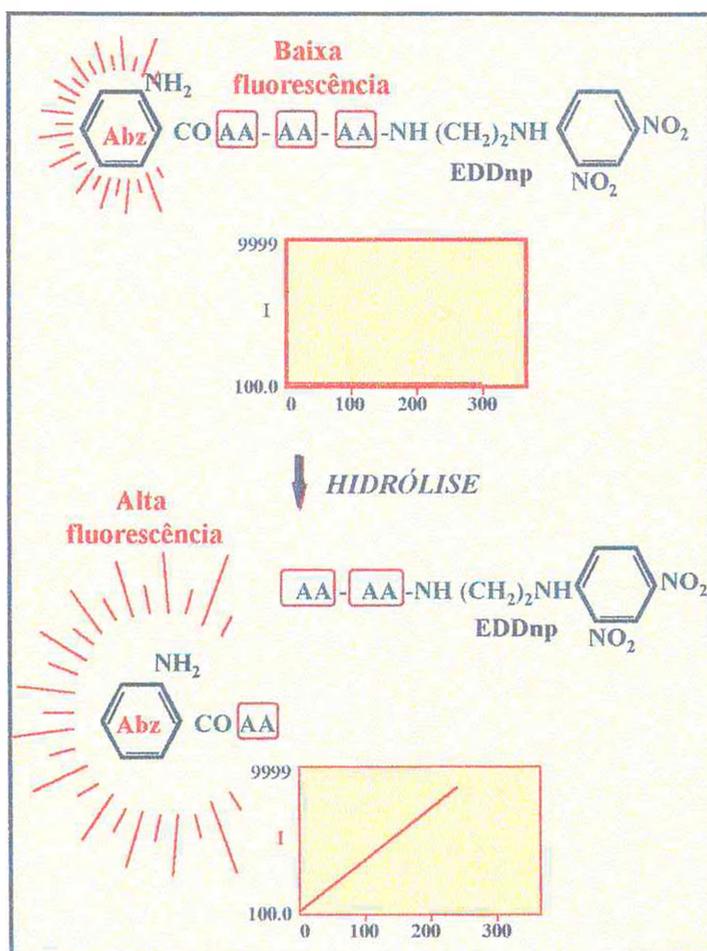


Figura 12 - Conceito de substratos fluorogênicos com apagamento intramolecular de fluorescência.

Para os ensaios de inibição, NEPr era pré-incubada com fosforamidon  $1 \mu\text{M}$  ou captopril  $1 \mu\text{M}$  por um período de 20 minutos, a  $37^\circ\text{C}$ , antes da adição do substrato. A fluorescência máxima foi convertida em moles do produto liberado por minuto, usando uma curva de calibração obtida a partir do correspondente fragmento aminoterminal fluorescente sintético, em diferentes concentrações. Essa curva foi utilizada para converter os valores de fluorescência do produto liberado das incubações enzimáticas em moles do substrato hidrolisado por unidade de tempo.

#### **4.3. Ensaio fluorimétrico após tempo de reação fixo**

Outro método para realização do ensaio enzimático utilizando os peptídeos fluorogênicos é através da fixação do tempo de incubação, interrupção da reação e leitura no espectrofluorômetro comparando a fluorescência final com a inicial no tempo zero de reação. Esse método tem a vantagem de quantificar-se rapidamente a atividade enzimática de um grande número de frações eluídas das colunas cromatográficas, assim como permite a quantificação de uma determinada enzima quando se utiliza nos ensaios homogenato de tecidos.

Em uma cubeta medindo  $0,5 \text{ cm}$  de largura e  $1 \text{ cm}$  de comprimento foram adicionados  $250 \mu\text{l}$  de Tris-HCl  $50 \text{ mM}$ , pH  $7,5$ , os substratos na concentração de  $6$  a  $20 \mu\text{M}$  e as frações membranares cruas ( $10$ - $50 \mu\text{l}$ ), NEPr ( $1$ - $10 \mu\text{l}$ ) ou frações eluídas das cromatografias ( $50 \mu\text{l}$ ). Para os ensaios utilizando inibidores, fração membranares crua, frações eluídas das cromatografias ou NEPr foram pré-incubadas com fosforamidon  $1 \mu\text{M}$  ou captopril  $1 \mu\text{M}$  por um período de 20 minutos, a  $37^\circ\text{C}$

antes da adição do substrato. A reação foi interrompida por aquecimento durante 5 minutos, a 100°C e centrifugada a 10.000 g por 10 minutos. Para a quantificação dos produtos formados durante a reação, a fluorescência da fração sobrenadante era diretamente medida no espectrofluorômetro ( $\lambda_{em} = 420$  nm e  $\lambda_{ex} = 320$  nm) e convertida em moles dos produtos liberados por minuto, utilizando uma curva de calibração.

#### **4.4. Determinação da concentração de proteínas**

A concentração de proteínas nas frações enzimáticas foi determinada pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976), utilizando albumina sérica bovina (1mg/ml) como padrão.

#### **4.5. Diálise da amostra**

Plasma seminal foi submetido à diálise com três trocas do tampão Tris-HCl 50 mM, a cada 12 horas (1:5, v/v).

#### **4.6. Cromatografia de troca iônica em coluna de DEAE-Celulose**

O material dialisado foi submetido a uma cromatografia de troca iônica numa coluna (30 x 2,6 cm) de DEAE-Celulose equilibrada com tampão Tris-HCl 50 mM, pH 7,5, com fluxo de 60 ml/h e temperatura de 4°C. Após aplicação da amostra, a coluna foi desenvolvida por gradiente de NaCl nas concentrações de 50 mM, 100 mM, 200 mM e 500 mM no mesmo tampão. A atividade enzimática foi monitorizada utilizando o substrato fluorogênico Abz-dRRF-EDDnp e eluída com força iônica de 100 mM de NaCl. A absorbância do efluente da coluna foi monitorizada em 280 nm. As frações colhidas foram de 10 ml e as alíquotas para o ensaio da atividade enzimática, de 50 µl.

#### **4.7. Concentração das frações enzimáticas**

As frações ativas obtidas da cromatografia do DEAE-Trissacryl foram reunidas em “pool” e concentradas usando-se os concentradores do tipo amicon.

#### **4.8. Cromatografia de troca iônica-HPLC**

A fração enzimática obtida da cromatografia de troca iônica em coluna de DEAE-Celulose, foi submetida a cromatografia de troca iônica em HPLC da marca Shimadzu modelo SCL 10A, equipado com uma coluna medindo 7,6 x 100 mm.

Após aplicação da amostra, a coluna foi desenvolvida por gradiente de NaCl nas concentrações de 30 - 100%.

#### **4.9. Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)**

Para a separação dos produtos de hidrólise foi utilizado um equipamento de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) da marca Shimadzu modelo SCL 10A, equipado com uma coluna de fase reversa do tipo Nucleosil 5 $\mu$ m ((145 x 4,5 mm). Os substratos fluorogênicos (10 a 20 nmol) foram incubados com NEPr purificada (100 ng), enzima conversora de angiotensina (DORER et al., 1970) ou frações membranares cruas (10-50 $\mu$ l) em um volume final de 100 $\mu$ l com Tris-HCl 50mM, pH 7,5 a 37°C, por um período de 30-60 minutos. A reação era interrompida por aquecimento a 100°C, por 5 minutos. Após centrifugação a 10.000 g por 10 minutos, a fração sobrenadante constituída do substrato intacto e dos produtos resultantes da hidrólise eram separados por cromatografia líquida de alta performance (HPLC) usando uma coluna de fase reversa do tipo Nucleosil C18, 5 $\mu$ M (145 x 4,5 mm) e eluída com acetonitrila contendo 0,05% de ácido trifluoroacético com fluxo de 1ml/min. Os gradientes foram ajustados para cada peptídeo e encontram-se descritos nas legendas dos gráficos de HPLC em resultados. O substrato intacto e produtos eram detectados com absorbância de 220 nm e fluorescência ( $\lambda_{em}$  = 420nm e  $\lambda_{ex}$  = 320nm) com os detectores arranjados em série e coletados para identificar o sítio de clivagem através de análise de aminoácidos (CARVALHO et al., 1995; CARVALHO et al., 1996). Para os ensaios de inibição, frações membranares cruas ou NEPr eram pré-incubadas com

fosforamidon 1  $\mu\text{M}$  ou captopril 1  $\mu\text{M}$  por um período de 20 minutos, a 37°C antes de sua incubação com o substrato.

#### **4.10. Eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE)**

As amostras recuperadas da cromatografia de DEAE-HPLC foram submetidas a eletroforese em gel de poliacrilamida a 6%, em condições de dissociação e não dissociação com gradiente de 8-25% e 4-15% respectivamente. Para eletroforese com SDS as amostras foram preparadas por aquecimento a 90°C, por 5 minutos, na presença de 2-mercaptoetanol. As proteínas usadas como marcadores de peso molecular foram: anidrase carbônica (29 kD) ovalbumina (45 kD), albumina bovina (66 kD), fosforilase B (97 kD),  $\beta$ -galactosidase (116 kD) e miosina (205 kD). As proteínas foram visualizadas através coloração pelo *Coomassie Brilliant Blue* (CBB).

#### **4.11. Análise de Aminoácidos**

A análise de aminoácidos dos produtos de hidrólise e dos substratos foi realizada pelo sistema Pico-Tag da *Waters* ((CARVALHO et al., 1992) pelo método de acoplamento com fenilisotiocianato (PITC). O método Pico-Tag envolve três passos.

- 1 - Hidrólise da amostra com HCl 6N / Fenol
- 2 - Derivatização com fenilisotiocianato (PITC)
- 3 - Análise em HPLC

Os fragmentos gerados por hidrólise enzimática dos diversos substratos com NEPr eram separados por cromatografia em HPLC e secados em “speed vacuum”. Em seguida o material era hidrolisado a 110°C, durante um período de 24 horas, em vapor de HCl 6N, com 1% de fenol (por volume). Após essa etapa, eram realizadas três ressecagens com uma solução consistindo da mistura de etanol:água:triethylamina (2:2:1, por volume). Após ressecagem o material era submetido à reação de acoplamento com PITC utilizando um volume da solução de etanol:triethylamina:água:PITC (7:1:1:1, por volume) por um período de três horas à temperatura ambiente. Finalmente a amostra era diluída em tampão e submetida à análise em HPLC, com absorvância de 269 nm. A quantificação era feita por comparação com padrão de aminoácidos da *Pierce*.

#### 4.12. Determinação das constantes cinéticas

O ensaio foi monitorizado pelo aumento da fluorescência ( $\lambda_{em}=420nm$  e  $\lambda_{ex}=320nm$ ) em espectrofluorômetro. Em uma cubeta, medindo 0,5 cm de largura e 1 cm de comprimento, era adicionado 250  $\mu l$  de Tris-HCl 50 mM, pH 7,5 e NEPr (10  $\mu l$ ). O substrato fluorogênico, em diferentes concentrações (2 - 30  $\mu M$ ) era adicionado e o aumento da fluorescência era monitorizada durante tempo fixo. Com menos de 5% de hidrólise do substrato, a reação era interrompida para posterior adição do substrato. Os valores de  $K_m$  e  $V_{max}$  eram determinados, tomando-se os valores das velocidades iniciais versus concentrações respectivas dos

substratos pelo “plot” de *Lineweaver-Burk*, utilizando o programa ENZFITTER (R. J. Leatherbarrow). O peso molecular da NEPr é em torno de 87.000 Dalton (FOSSIEZ et al., 1992) e esse valor foi utilizado para o cálculo do  $k_{cat}$ .



*Resultados*

### 5.1. Hidrólise dos substratos fluorogênicos com apagamento intramolecular de fluorescência pela NEPr recombinante (NEPr)

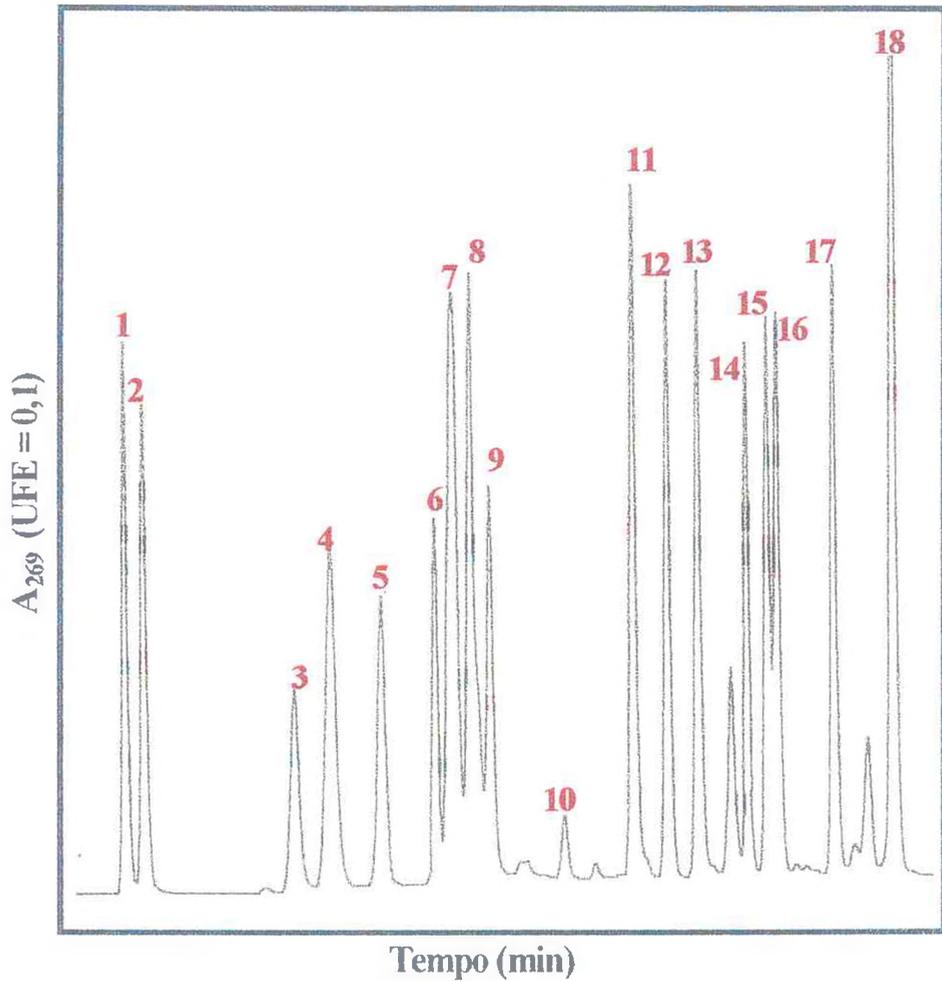
A hidrólise dos substratos sintéticos foi monitorada através do registro da fluorescência contínua. A caracterização dos substratos sintéticos e seus produtos de hidrólise foi realizada através de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). Os substratos fluorogênicos, Abz-GGFLRRV-EDDnp, Abz-GGdFLRRV-EDDnp, Abz-dRRV-EDDnp, Abz-RRV-EDDnp, Abz-dRRL-EDDnp e Abz-dRRF-EDDnp foram seletivamente hidrolisados pela NEPr.

Os fragmentos gerados após a reação dos substratos com NEPr foram separados por cromatografia em HPLC e submetidos a hidrólise ácida para identificação da seqüência de aminoácidos e conseqüentemente, a indicação da ligação peptídica hidrolisada. A seqüência de aminoácidos dos vários substratos sintéticos e dos produtos gerados após hidrólise com NEPr ou preparações membranares foi realizada comparando-se com um padrão de aminoácidos (**Figura 13**). Nesse cromatograma cada pico corresponde a um aminoácido.

O substrato Abz-dRRF-EDDnp, foi hidrolisado na ligação R-F pela NEPr, formando como produtos os fragmentos Abz-dRR e F-EDDnp (**Figura 14A**). No ensaio com registro da fluorescência contínua do substrato Abz-dRRF-EDDnp com NEPr, a hidrólise é demonstrada pelo aumento da fluorescência (**Figura 14B**). O pico de número 1 da reação do substrato Abz-dRRF-EDDnp com NEPr (**Figura 14A**) após hidrolisado e separado por HPLC, correspondeu aos aminoácidos R (**Figura 15**), o segundo pico ao aminoácido F (**Figura 16**) e o terceiro pico foi identificado como sendo o substrato intacto apresentando em sua

seqüência duas moléculas de arginina (R) e uma molécula de fenilalanina (F) (**Figura 17**). Através dessa mesma analogia foi identificada a seqüência dos vários produtos gerados da reação dos demais peptídeos sintéticos com NEPr e frações membranares.

Os substratos, Abz-GGFLRRV-EDDnp, Abz-GGdFLRRV-EDDnp, Abz-dRRV-EDDnp e Abz-RRV-EDDnp foram hidrolisados pela NEPr na ligação R-V. O substrato Abz-dRRL-EDDnp foi hidrolisado na ligação peptídica R-L.



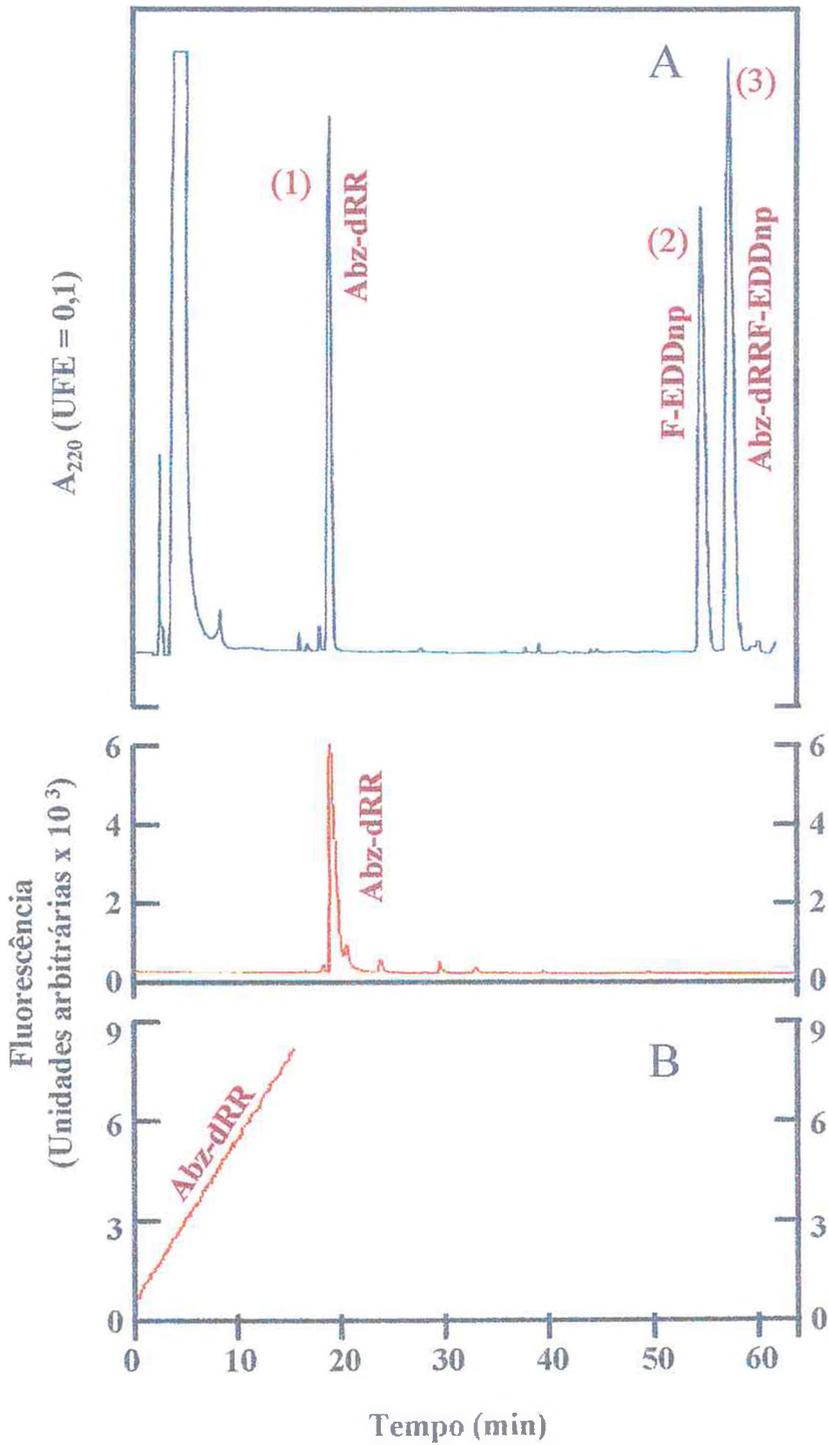
<b>1</b> - Aspartato	⇨ 1,7 min
<b>2</b> - Glutamato	⇨ 2,0 min
<b>3</b> - Serina	⇨ 3,9 min
<b>4</b> - Glicina	⇨ 4,3 min
<b>5</b> - Histidina	⇨ 5,2 min
<b>6</b> - Arginina	⇨ 5,9 min
<b>7</b> - Treonina	⇨ 6,1 min
<b>8</b> - Alanina	⇨ 6,6 min
<b>9</b> - Prolina	⇨ 6,9 min

<b>10</b> - NH <sub>3</sub>	⇨ 7,3 min
<b>11</b> - Tirosina	⇨ 8,2 min
<b>12</b> - Valina	⇨ 8,6 min
<b>13</b> - Metionina	⇨ 9,0 min
<b>14</b> - Cisteína	⇨ 9,4 min
<b>15</b> - Isoleucina	⇨ 9,6 min
<b>16</b> - Leucina	⇨ 10,0 min
<b>17</b> - Fenilalanina	⇨ 10,7 min
<b>18</b> - Lisina	⇨ 11,5 min

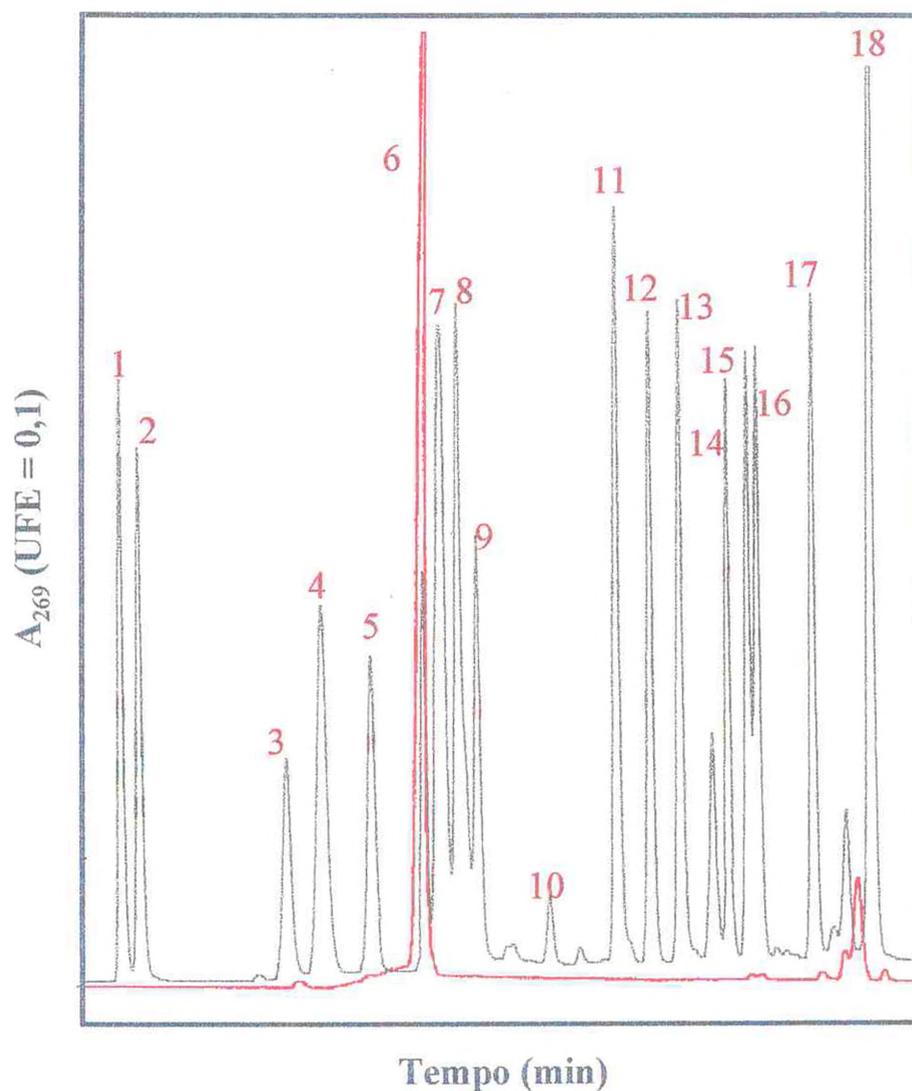
**Figura 13** - Perfil de eluição do padrão de aminoácidos.

**Figura 14 – Hidrólise do substrato Abz-dRRF-EDDnp pela NEPr.**

A figura 14A representa o perfil de eluição do substrato Abz-dRRF-EDDnp e seus produtos de hidrólise após incubação com NEPr. A incubação do substrato (10 nmol) com NEPr (600 ng) foi realizada em um volume final de 100  $\mu$ l de tampão Tris-HCl, 50 mM pH 7,5 a 37°C por 60 minutos. A reação era interrompida através de aquecimento durante 5 minutos a 100°C e os produtos resultantes da hidrólise eram separados por cromatografia líquida de alta performance (HPLC) usando-se uma coluna de fase reversa do tipo Nucleosil C<sub>18</sub>, 5 $\mu$ m (145 x 4,5 mm). O gradiente era de 20 a 40% de acetonitrila contendo 0,05% de ácido trifluoracético durante um período de 60 minutos, com fluxo de 1 ml  $\text{min}^{-1}$ . Substrato e produtos foram detectados com absorvância UV (220 nm) e fluorescência ( $\lambda_{\text{em}} = 420 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{ex}} = 320 \text{ nm}$ ) com os detectores arranjados em série e coletados para identificar o sítio de hidrólise através de análise de aminoácidos como descrito em materiais e métodos. Na figura 14B é ilustrado outro experimento onde a hidrólise do substrato Abz-dRRF-EDDnp (10  $\mu$ M) com NEPr (0,5  $\mu\text{g ml}^{-1}$ ) (B) é demonstrada através do registro do aumento da fluorescência contínua ( $\lambda_{\text{em}} = 420 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{ex}} = 320 \text{ nm}$ ).

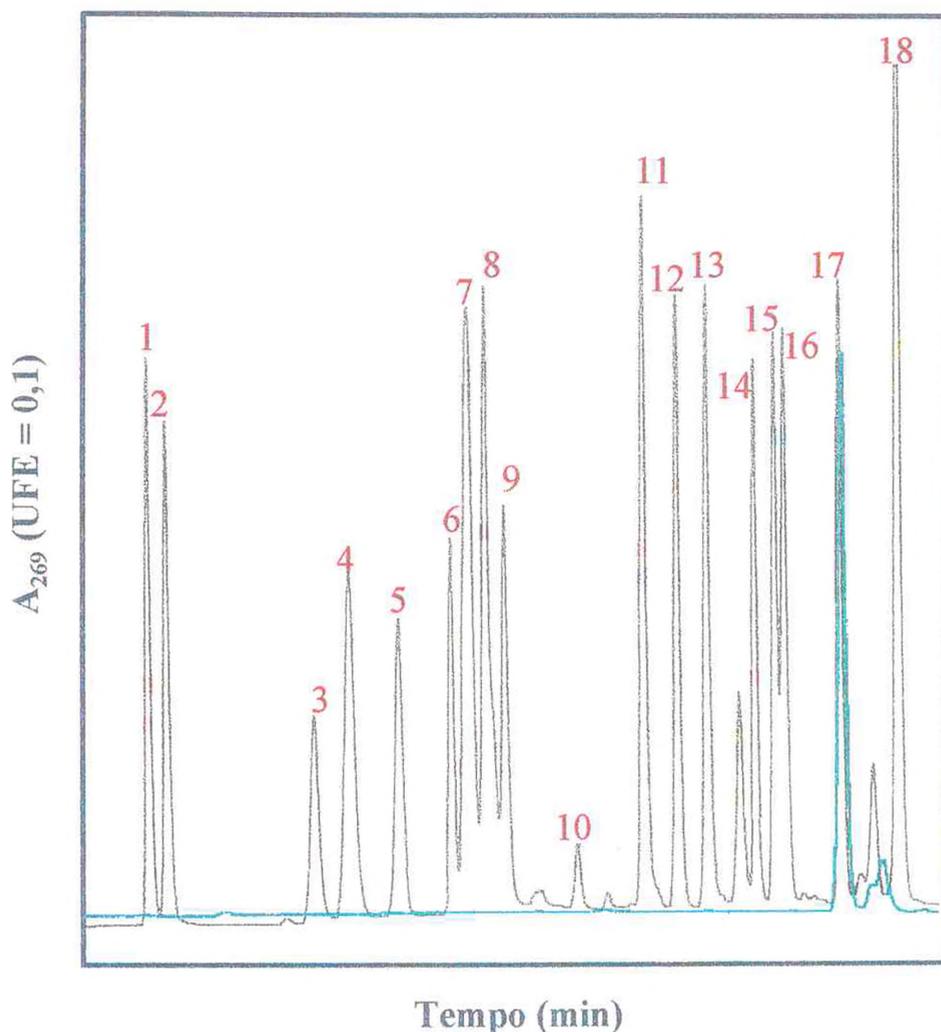


**Figura 14** - Perfil de eluição dos produtos de hidrólise gerados após incubação do Abz-dRRF-EDDnp com NEPr (A). Registro da fluorescência contínua da hidrólise do substrato Abz-dRRF-EDDnp ( $10 \mu\text{M}$ ) com NEPr ( $0,5 \mu\text{g ml}^{-1}$ ) (B).



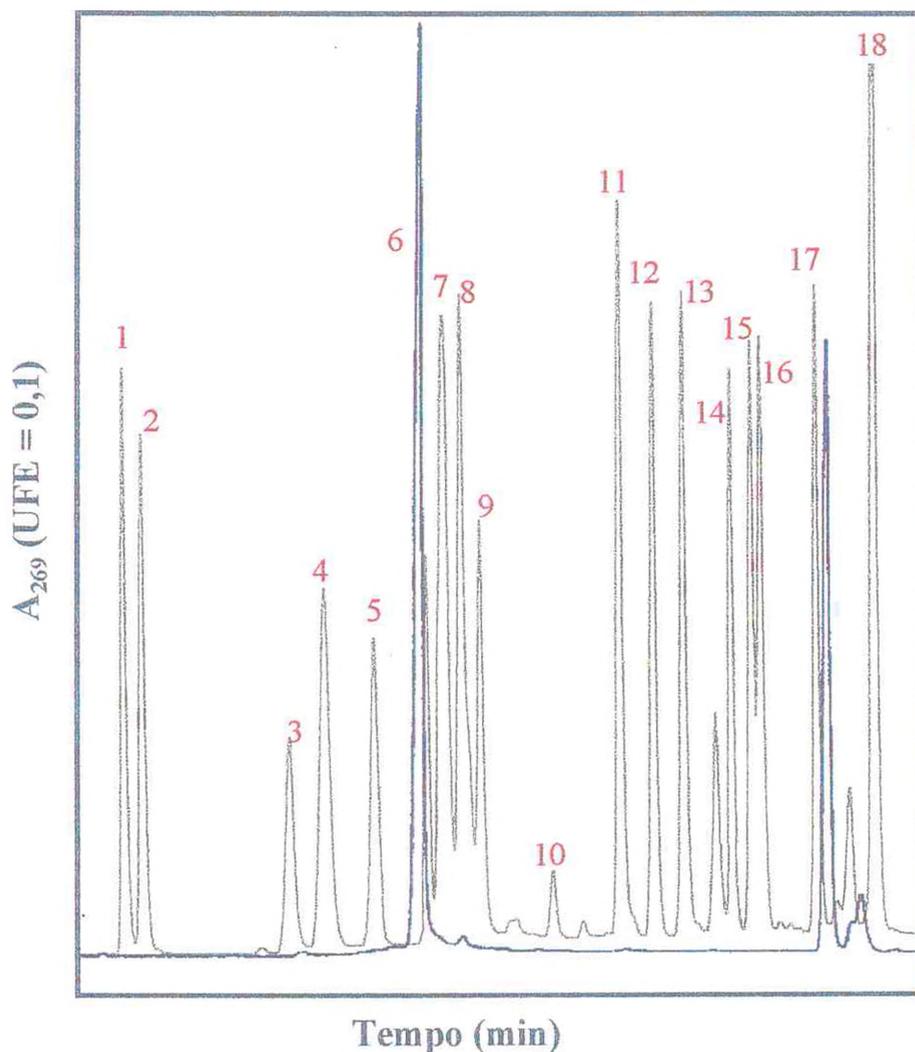
**Figura 15** - Composição de aminoácidos do produto Abz-dRR, gerado após incubação do substrato Abz-dRRF-EDDnp com NEPr.

O gradiente era de 0 a 55% de acetonitrila durante um período de 10 minutos, com fluxo de  $1\text{ml min}^{-1}$ . Os aminoácidos eram detectados com absorvância UV de 269 nm. O gráfico cinza representa o padrão de aminoácidos onde cada pico corresponde a um aminoácido. O pico vermelho corresponde aos dois aminoácidos, dR e R, representando o produto Abz-dRR.



**Figura 16** - Composição de aminoácidos do produto F-EDDnp, gerado após incubação do substrato Abz-dRRF-EDDnp com NEPr.

O gradiente era de 0 a 55% de acetonitrila durante um período de 10 minutos, com fluxo de  $1\text{ml min}^{-1}$ . Os aminoácidos eram detectados com absorvância UV de 269 nm. O gráfico cinza representa o padrão de aminoácidos onde cada pico corresponde a um aminoácido. O pico verde corresponde ao aminoácido F, representando o produto F-EDDnp.



**Figura 17** - Composição de aminoácidos do substrato Abz-dRRF-EDDnp.

O gradiente era de 0 a 55% de acetonitrila durante um período de 10 minutos, com fluxo de  $1\text{ ml min}^{-1}$ . Os aminoácidos eram detectados com absorvância UV de 269 nm. O gráfico cinza representa o padrão de aminoácidos onde cada pico corresponde a um aminoácido. O primeiro pico azul representa os aminoácidos dR e R e o segundo pico azul representa o aminoácido F, correspondendo a composição de resíduos do substrato Abz-dRRF-EDDnp.

## 5.2. Parâmetros cinéticos da hidrólise dos substratos fluorogênicos com apagamento intramolecular de fluorescência pela NEPr recombinante (NEPr)

Os valores dos parâmetros cinéticos  $K_m$ ,  $k_{cat}$  e a razão  $k_{cat} / K_m$  para os vários peptídeos fluorogênicos Abz-dRRL-EDDnp, Abz-dRRF-EDDnp, Abz-dRRV-EDDnp, Abz-RRV-EDDnp, Abz-GGFLRRV-EDDnp e Abz-GGdFLRRV-EDDnp estão na **tabela 02**.

Os peptídeos Abz-GGFLR-EDDnp derivado da dinorfina  $A_{1-6}$ , Abz-GGFLRR-EDDnp e Abz-GGFLRQ-EDDnp derivados da dinorfina  $A_{1-7}$  e Abz-GGFLRRQ-EDDnp derivado da dinorfina A não foram hidrolisados pela NEPr. Os valores dos parâmetros cinéticos  $K_m$ ,  $k_{cat}$  e a razão  $k_{cat} / K_m$  para os demais peptídeos fluorogênicos derivados da dinorfina  $A_{1-6}$ , dinorfina  $A_{1-7}$  e da dinorfina A e  $\beta$ -endorfina hidrolisados pela NEPr estão nas **tabelas 03, 04 e 05**, respectivamente. Na tabela 03, dois peptídeos derivados da dinorfina  $A_{1-6}$  foram submetidos à hidrólise pela NEPr: o peptídeo contendo R na posição  $P'_2$  não foi hidrolisado, enquanto o peptídeo contendo Q na posição  $P'_2$  foi eficientemente hidrolisado ( $k_{cat} / K_m = 7,156$ ) na ligação F-L (90%). Os peptídeos contendo R-R e R-Q em  $P'_2$  e  $P'_3$ , respectivamente foram resistentes à hidrólise pela NEPr. A substituição da R em  $P'_2$  por G, S ou T originou peptídeos substratos hidrolisados pela NEPr (**Tabela 04**).

**Tabela 02** - Parâmetros cinéticos da hidrólise dos substratos Abz-GGFLRRV-EDDnp, Abz-GGdFLRRV-EDDnp, Abz-dRRV-EDDnp, Abz-RRV-EDDnp, Abz-dRRL-EDDnp e Abz-dRRF-EDDnp pela NEPr.

Substratos	$K_m$ ( $\mu\text{M}$ )	$k_{cat}$ ( $\text{min}^{-1}$ )	$k_{cat}/K_m$ ( $\text{min}^{-1} \mu\text{M}^{-1}$ )
Abz-dR-R ↓ L-EDDnp	$2,8 \pm 1,5^a$	5,3	2
Abz-dR-R ↓ F-EDDnp	$5 \pm 1,5^a$	7	1,4
Abz-dR-R ↓ V-EDDnp	$3,7 \pm 1,5^a$	5,1	1,3
Abz-R-R ↓ V-EDDnp	$1,8 \pm 1,5^a$	5,6	3,1
Abz-G-G-F-L-R-R ↓ V-EDDnp	$17 \pm 1,5^a$	736	43
Abz-G-G-dF-L-R-R ↓ V-EDDnp	$3 \pm 2^a$	127	42

<sup>a</sup> valores da média  $\pm$  E. P. M. de 6 determinações independentes.

Os valores de  $K_m$  e  $V_m$  foram determinados como descrito em material e métodos. Os substratos Abz-GGFLRRV-EDDnp, Abz-GGdFLRRV-EDDnp, Abz-dRRV-EDDnp, Abz-RRV-EDDnp, Abz-dRRL-EDDnp e Abz-dRRF-EDDnp foram incubados numa concentração final variando de 2 a 30  $\mu\text{M}$  com NEPr (10  $\mu\text{l}$ ). As flechas indicam o ponto de hidrólise.

**Tabela 03** - Parâmetros cinéticos dos peptídeos fluorogênicos derivados da Dinorfina A<sub>1-6</sub> hidrolisados pela NEPr.

Peptídeos derivados da Dinorfina A <sub>1-6</sub>	K <sub>m</sub> ( $\mu\text{M}$ )	k <sub>cat</sub> (seg <sup>-1</sup> )	k <sub>cat</sub> / K <sub>m</sub> (seg <sup>-1</sup> $\mu\text{M}^{-1}$ )
Abz-G-G-F-L-R-EDDnp		não ocorre hidrólise	
Abz-G-G↓F↓L-Q-EDDNP	3,2 <sup>a</sup>	22.900	7.156

<sup>a</sup> valores da média  $\pm$  E. P. M. de 6 determinações independentes.

Os valores de K<sub>m</sub> e V<sub>m</sub> foram determinados como descrito em material e métodos. Os substratos foram incubados numa concentração final variando de 2 a 30  $\mu\text{M}$  com NEPr (10  $\mu\text{l}$ ).

↓ - maior hidrólise

↓ - menor hidrólise

**Tabela 04** - Parâmetros cinéticos dos peptídeos fluorogênicos derivados da Dinorfina A<sub>1-7</sub> hidrolisados pela NEPr.

Peptídeos derivados da Dinorfina A <sub>1-7</sub>	K <sub>m</sub> (μM)	k <sub>cat</sub> (seg <sup>-1</sup> )	k <sub>cat</sub> / K <sub>m</sub> (seg <sup>-1</sup> μM <sup>-1</sup> )
Abz-G-G-F-L-R-R-EDDnp	não ocorre hidrólise		
Abz-G-G-F-L-R-Q-EDDnp	não ocorre hidrólise		
Abz-G-G↓F↓L-G-Q-EDDNP	3,0 <sup>a</sup>	2.400	800
Abz-G-G↓F↓L-S-Q-EDDNP	7,8 <sup>a</sup>	11.200	1435
Abz-G-G↓F↓L-T-Q-EDDNP	6,9 <sup>a</sup>	20.200	2.927

<sup>a</sup> valores da média ± E. P. M. de 6 determinações independentes.

Os valores de K<sub>m</sub> e V<sub>m</sub> foram determinados como descrito em material e métodos. Os substratos foram incubados numa concentração final variando de 2 a 30 μM com NEPr (10 μl).

↓ - maior hidrólise

↓ - menor hidrólise

**Tabela 05** - Parâmetros cinéticos dos peptídeos fluorogênicos derivados da Dinorfina A e  $\beta$ -Endorfina hidrolisados pela NEPr.

Peptídeos derivados da Dinorfina A e $\beta$ -Endorfina	$K_m$ ( $\mu\text{M}$ )	$k_{cat}$ ( $\text{seg}^{-1}$ )	$k_{cat} / K_m$ ( $\text{seg}^{-1} \mu\text{M}^{-1}$ )
Abz-G-G-F-L-R-R-Q-EDDnp	não ocorre hidrólise		
Abz-G-G↓F↓L-T-S-Q-EDDNP	1,3 <sup>a</sup>	11.100	8.538
Abz-G-G↓F↓L-R-S-Q-EDDNP	3,2 <sup>a</sup>	4.800	1.500
Abz-G-G↓F↓L-T-R-Q-EDDNP	1,8 <sup>a</sup>	5.600	3111
Abz-G-G↓F↓L-T-S-R-Q-EDDNP	2,6 <sup>a</sup>	5.970	2.296
Abz-G-G↓F↓L-G-G-Q-EDDNP	5,1 <sup>a</sup>	19.100	3.745

<sup>a</sup> valores da média  $\pm$  E. P. M. de 6 determinações independentes.

Os valores de  $K_m$  e  $V_m$  foram determinados como descrito em material e métodos. Os substratos foram incubados numa concentração final variando de 2 a 30  $\mu\text{M}$  com NEPr (10  $\mu\text{l}$ ).

↓ - maior hidrólise

↓ - menor hidrólise

### 5.3. Estudo da especificidade dos substratos

Frações membranares de tecidos de rato foram utilizadas como fonte de enzima para o estudo da especificidade dos substratos. A incubação do substrato Abz-GGFLRRV-EDDnp com fração membranares de rim, resultou na formação dos produtos Abz-GGFLRR, V-EDDnp, Abz-GGF e Abz-GGFL (**Figura 18A**). Na presença de 1  $\mu$ M de fosforamidon, a atividade da NEP foi totalmente inibida, como demonstrado pela exclusiva ausência dos produtos Abz-GGFLRRV e V-EDDnp, porém o fosforamidon não inibiu a atividade que hidrolisou esse substrato com formação dos produtos Abz-GGF, Abz-GGFL, RRV-EDDnp e LRRV-EDDnp (**Figura 19A**). Resultados semelhantes foram encontrados quando esse peptídeo foi incubado com frações membranares de cérebro e pulmão.

O registro da fluorescência contínua do substrato Abz-GGFLRRV-EDDnp com fração membranares de rim na ausência (**Figura 18B**) e na presença de fosforamidon 1  $\mu$ M (**Figura 19B**), demonstrou também que a NEP não era a única enzima presente nessa preparação, capaz de clivar esse substrato. Nos experimentos com registro da fluorescência contínua utilizando preparações membranares de cérebro e pulmão foram observados os mesmos resultados dos experimentos com preparações membranares de rim utilizando esse substrato.

A atividade presente no homogenato de rim, hidrolisou o substrato Abz-GGdFLRRV-EDDnp na ligação R-V com formação dos fragmentos complementares Abz-GGdFLRR e V-EDDnp (**Figura 20A**). Na presença de 1  $\mu$ M de fosforamidon, um inibidor altamente específico da NEP, essa atividade foi totalmente inibida (**Figura 21A**), mas não na presença de 1  $\mu$ M de captopril, um inibidor específico da enzima conversora de angiotensina (ACE).

Sob as mesmas condições experimentais, resultados semelhantes foram encontrados com preparações membranares de cérebro e pulmão. No ensaio com registro da fluorescência contínua do substrato Abz-GGdFLRRV-EDDnp com fração membranares de rim (**Figura 20B**) a hidrólise é demonstrada pelo aumento da fluorescência, não ocorrendo esse aumento na presença de fosforamidon na concentração de 1  $\mu\text{M}$  (**Figura 21B**), indicando que a atividade da NEP presente nessa preparação foi totalmente inibida.

O peptídeo fluorogênico Abz-dRRL-EDDnp, quando incubado com fração membranares de rim os produtos liberados foram os fragmentos complementares Abz-dRR e L-EDDnp (**Figura 22A**) e essa atividade foi totalmente inibida na presença de fosforamidon 1  $\mu\text{M}$  (**Figura 23A**). Resultados semelhantes foram encontrados quando os substratos sintéticos Abz-dRRV-EDDnp (hidrólise na ligação R-V) e Abz-dRRF-EDDnp (hidrólise na ligação R-F) foram incubados sob as mesmas condições na ausência e na presença de fosforamidon 1  $\mu\text{M}$ . O experimento utilizando o substrato Abz-dRRL-EDDnp com fração membranares de rim, também foi realizado através da monitorização da fluorescência na ausência (**Figura 22B**) e na presença de fosforamidon 1  $\mu\text{M}$  (**Figura 23B**).

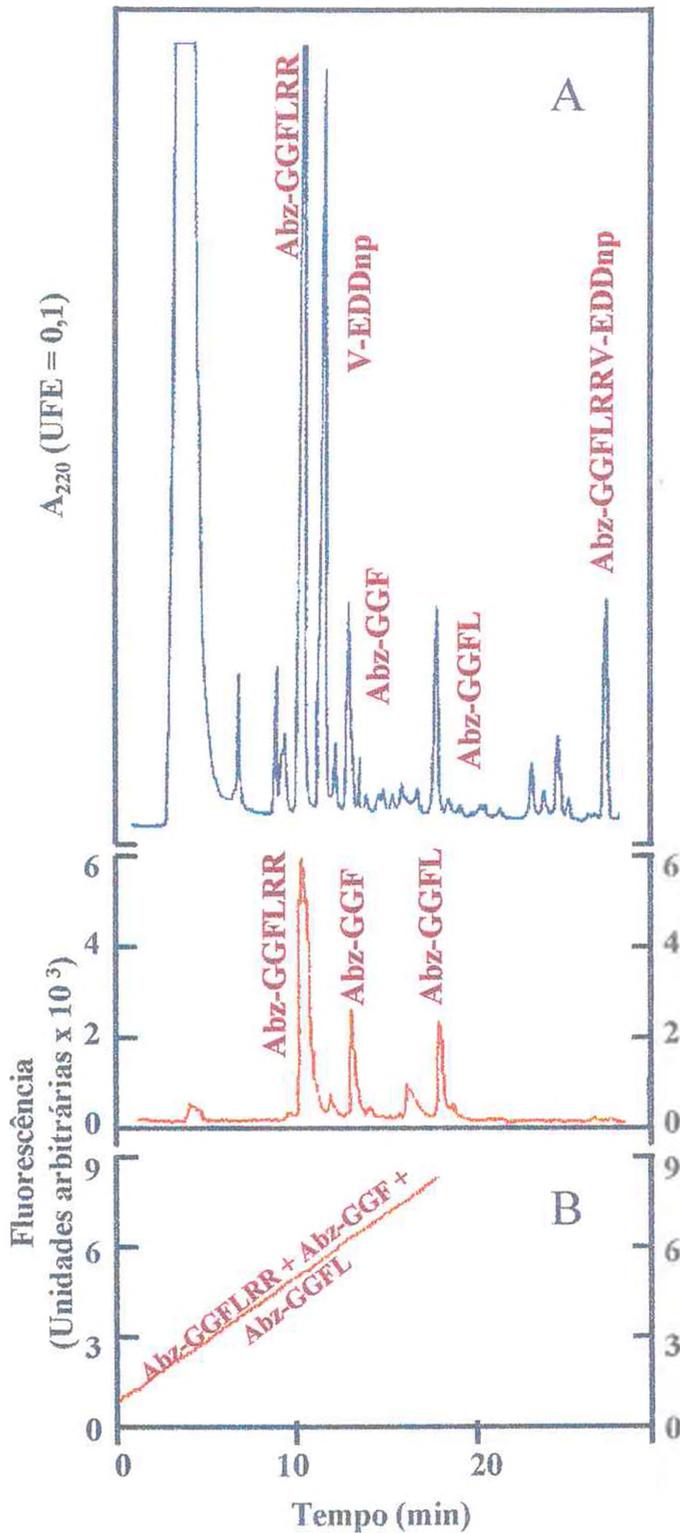
A reação dos peptídeos Abz-dRRL-EDDnp, Abz-dRRV-EDDnp e Abz-dRRF-EDDnp com preparações membranares de pulmão e cérebro resultou na hidrólise da ligação R-L, R-V e R-F, respectivamente. Essa atividade foi totalmente inibida na presença de fosforamidon 1  $\mu\text{M}$ , mas não, na presença de captopril na concentração de 1  $\mu\text{M}$ .

O ensaio fluorogênico através do registro contínuo da fluorescência utilizando outras metaloenzimas (ACE e termolisina) e serinoproteases (tripsina e

quimotripsina) demonstrou que o substrato Abz-dRRL-EDDnp foi totalmente resistente a hidrólise pela ACE (**Figura 24B**), tripsina (**Figura 25B**), termolisina (**Figura 26B**), e  $\alpha$ -quimotripsina (**Figura 27B**). Os substratos Abz-dRRV-EDDnp e Abz-dRRF-EDDnp semelhante ao substrato Abz-dRRL-EDDnp, foram totalmente resistentes à hidrólise por essas atividades. Os peptídeos Abz-RRV-EDDnp e Abz-GGdFLRRV-EDDnp, ao contrário dos substratos Abz-dRRV-EDDnp, Abz-dRRF-EDDnp e Abz-dRRL-EDDnp, foram hidrolisados pela tripsina. Com um tempo de incubação mais longo (60 minutos), a reação do substrato Abz-dRRL-EDDnp com ACE (**Figura 24A**), termolisina (**Figura 25A**), tripsina (**Figura 26A**) e quimotripsina (**Figura 27A**) confirmou a resistência desse peptídeo à hidrólise por essas enzimas, como observado pela ausência específica dos produtos. Resultados semelhantes foram observados com os peptídeos Abz-dRRF-EDDnp e Abz-dRRV-EDDnp. Esses resultados são mostrados na **tabela 06**.

**Figura 18** – Hidrólise do substrato Abz-GGFLRRV-EDDnp com fração membranar de rim de rato.

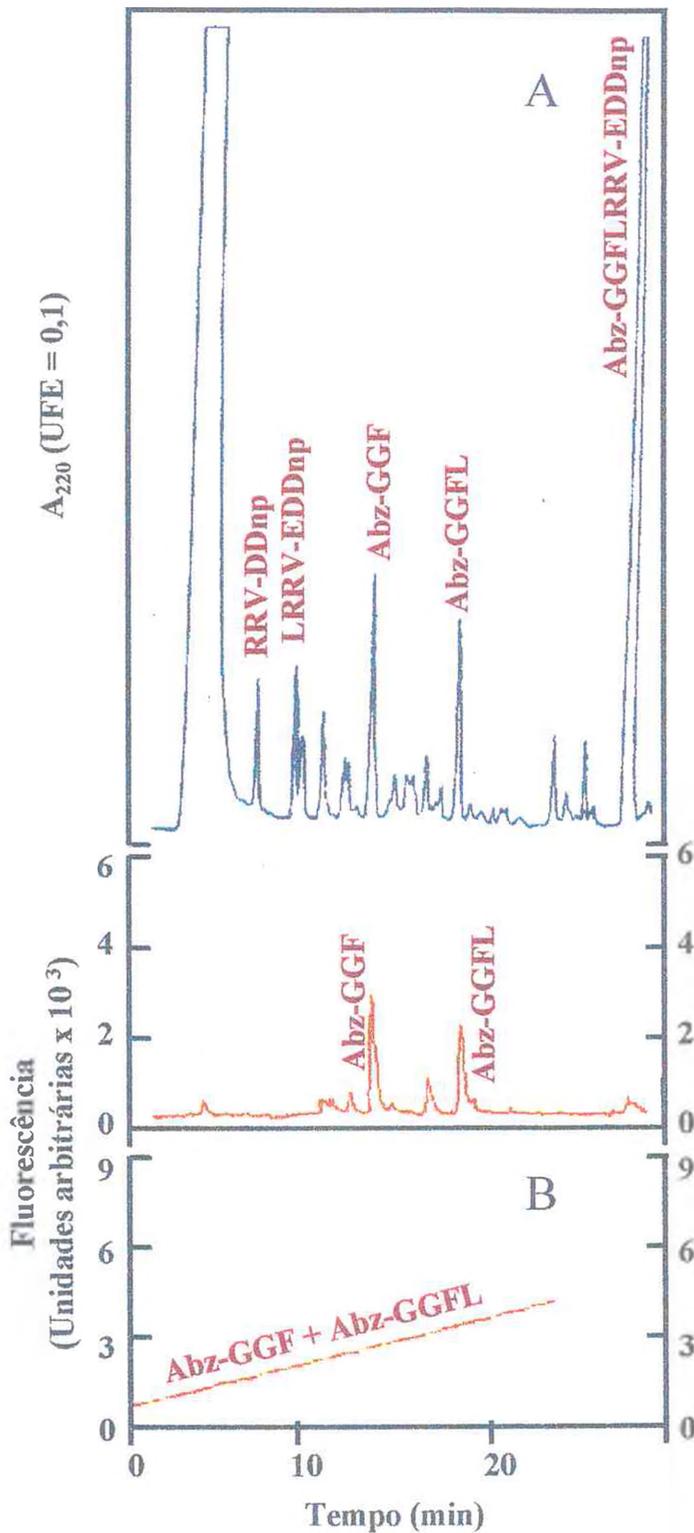
A figura 18A ilustra o perfil de eluição do substrato Abz-GGFLRRV-EDDnp e seus produtos gerados após incubação com homogenato de rim de rato. A incubação do substrato (10 nmol) com 10  $\mu$ l de homogenato de rim (180  $\mu$ g ml<sup>-1</sup>) foi realizada em um volume final de 100  $\mu$ l de tampão Tris-HCl, 50 mM, pH 7,5 a 37°C por 30 minutos. A reação era interrompida através de aquecimento durante 5 minutos a 100°C e os produtos resultantes da hidrólise eram separados por cromatografia líquida de alta performance (HPLC) usando-se uma coluna de fase reversa do tipo Nucleosil C<sub>18</sub>, 5 $\mu$ m (145 x 4,5 mm). O gradiente era de 20 a 40% de acetonitrila contendo 0,05% de ácido trifluoracético durante um período de 30 minutos, com fluxo de 1 ml min<sup>-1</sup>. Substrato e produtos eram detectados com absorvância UV (220 nm) e fluorescência ( $\lambda_{em}$  = 420 nm,  $\lambda_{ex}$  = 320 nm) com os detectores arranjados em série e coletados para identificar o sítio de hidrólise através de análise de aminoácidos como descrito em materiais e métodos. Na figura 18B é ilustrado outro experimento onde a hidrólise do substrato Abz-GGFLRRV-EDDnp com fração membranar de rim é demonstrada através do registro do aumento da fluorescência contínua ( $\lambda_{em}$  = 420 nm,  $\lambda_{ex}$  = 320 nm).



**Figura 18** - Perfil de eluição dos produtos de hidrólise gerados após incubação do Abz-GGFLRRV-EDDnp com fração membrana de rim (A). Registro da fluorescência contínua da hidrólise do substrato Abz-GGFLRRV-EDDnp com fração membrana de rim (B).

**Figura 19** – Hidrólise do substrato Abz-GGFLRRV-EDDnp com fração membranar de rim de rato na presença de fosforamidon 1 $\mu$ M.

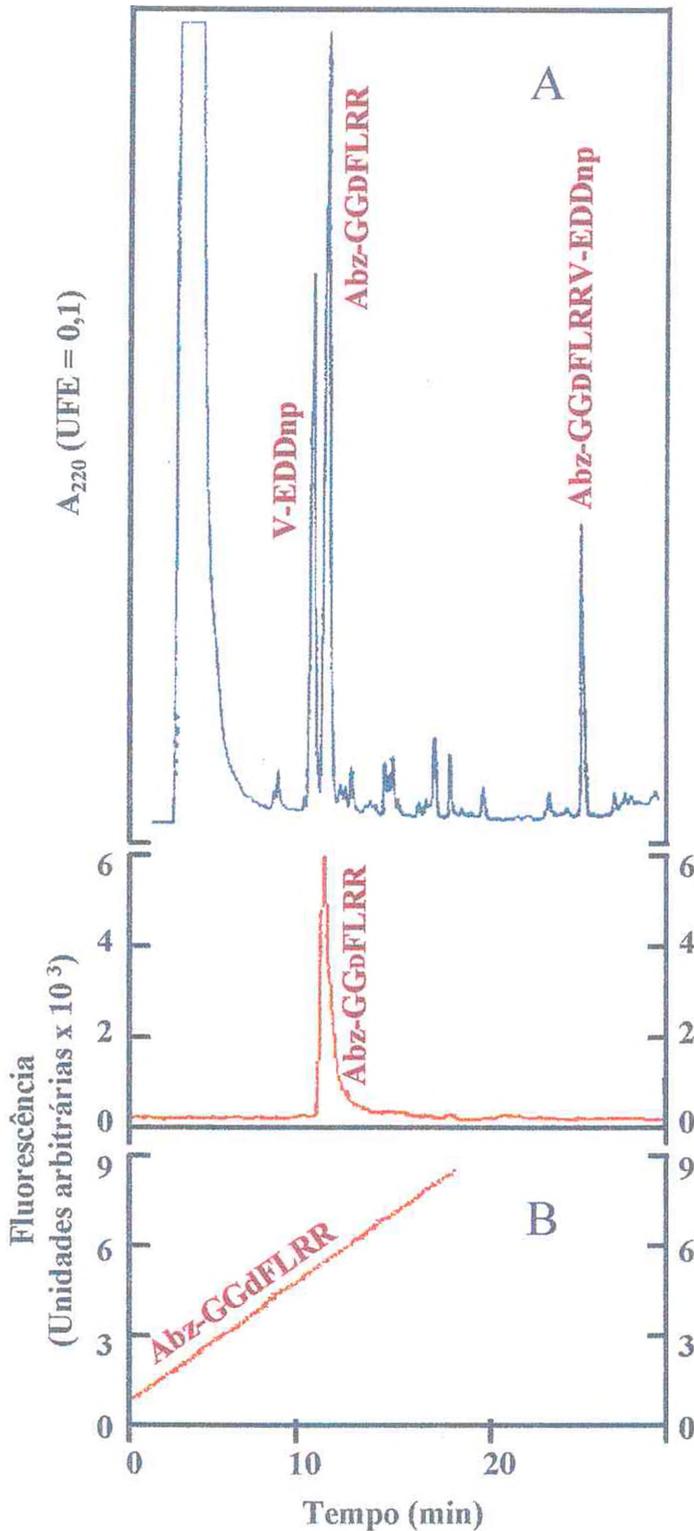
A figura 19A representa o perfil de eluição do substrato Abz-GGFLRRV-EDDnp e seus produtos de hidrólise gerados após incubação com homogenato de rim de rato na presença de fosforamidon 1 $\mu$ M. A incubação do substrato (10 nmol) com 10  $\mu$ l de homogenato de rim (180  $\mu$ g ml<sup>-1</sup>) na presença de fosforamidon 1 $\mu$ M foi realizada em um volume final de 100  $\mu$ l de tampão Tris-HCl, pH 7,5 a 37°C por 30 minutos. A reação era interrompida através de aquecimento durante 5 minutos a 100°C e os produtos resultantes da hidrólise eram separados por cromatografia líquida de alta performance (HPLC) usando-se uma coluna de fase reversa do tipo Nucleosil C<sub>18</sub>, 5 $\mu$ m (145 x 4,5 mm). O gradiente era de 20 a 40% de acetonitrila contendo 0,05% de ácido trifluoracético durante um período de 30 minutos, com fluxo de 1 ml min<sup>-1</sup>. Substrato e produtos eram detectados com absorvância UV (220 nm) e fluorescência ( $\lambda_{em}$  = 420 nm,  $\lambda_{ex}$  = 320 nm) com os detectores arranjados em série e coletados para identificar o sítio de hidrólise através de análise de aminoácidos como descrito em materiais e métodos. Na figura 19B é ilustrado o experimento onde a hidrólise do substrato Abz-GGFLRRV-EDDnp com fração membranar de rim na presença de fosforamidon 1  $\mu$ M é demonstrada através do registro do aumento da fluorescência contínua ( $\lambda_{em}$  = 420 nm,  $\lambda_{ex}$  = 320 nm).



**Figura 19** - Perfil de eluição dos produtos de hidrólise gerados após incubação do Abz-GGFLRRV-EDDnp com fração membrana de rim na presença de  $1 \mu\text{M}$  de fosforamidon (A). Registro da fluorescência contínua da hidrólise do substrato Abz-GGFLRRV-EDDnp com fração membrana de rim na presença de  $1 \mu\text{M}$  de fosforamidon (B).

**Figura 20** – Hidrólise do substrato Abz-GGdFLRRV-EDDnp com fração membranar de rim de rato.

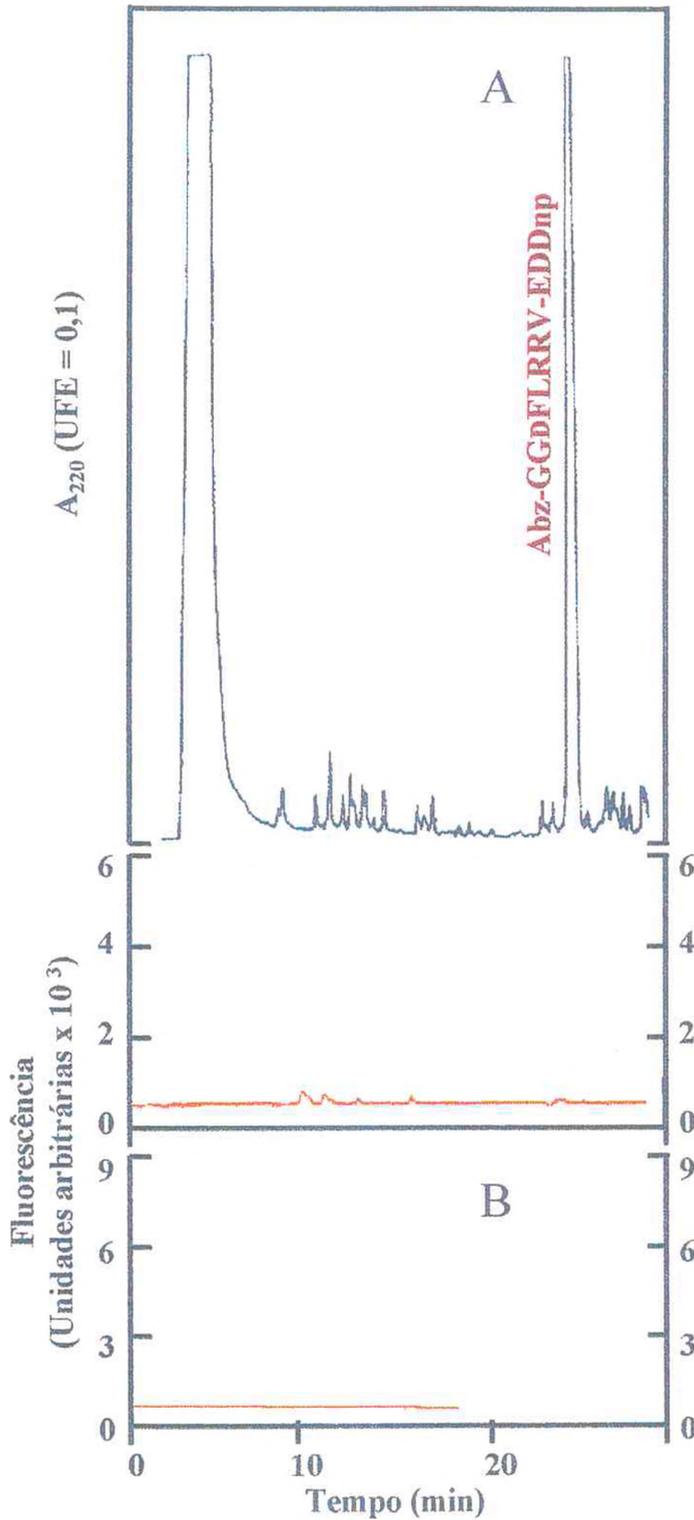
A figura 20A ilustra o perfil de eluição do substrato Abz-GGdFLRRV-EDDnp e seus produtos gerados após incubação com homogenato de rim de rato. A incubação do substrato (10 nmol) com 10  $\mu$ l de homogenato de rim (180  $\mu$ g ml<sup>-1</sup>) foi realizada em um volume final de 100  $\mu$ l de tampão Tris-HCl, 50 mM, pH 7,5 a 37°C por 30 minutos. A reação era interrompida através de aquecimento durante 5 minutos a 100°C e os produtos resultantes da hidrólise eram separados por cromatografia líquida de alta performance (HPLC) usando-se uma coluna de fase reversa do tipo Nucleosil C<sub>18</sub>, 5 $\mu$ m (145 x 4,5 mm). O gradiente era de 20 a 40% de acetonitrila contendo 0,05% de ácido trifluoracético durante um período de 30 minutos, com fluxo de 1 ml.min<sup>-1</sup>. Substrato e produtos eram detectados com absorvância UV (220 nm) e fluorescência ( $\lambda_{em}$  = 420 nm,  $\lambda_{ex}$  = 320 nm) com os detectores arranjados em série e coletados para identificar o sítio de hidrólise através de análise de aminoácidos como descrito em materiais e métodos. Na figura 20B é ilustrado o experimento onde a hidrólise do substrato Abz-GGdFLRRV-EDDnp com fração membranar de rim é demonstrada através do registro do aumento da fluorescência contínua ( $\lambda_{em}$  = 420 nm,  $\lambda_{ex}$  = 320 nm).



**Figura 20** - Perfil de eluição dos produtos gerados após incubação do Abz-GGdFLRRV-EDDnp com fração membrana de rim (A). Registro da fluorescência contínua da hidrólise do substrato Abz-GGdFLRRV-EDDnp com fração membrana de rim (B).

**Figura 21** – Reação do substrato Abz-GGdFLRRV-EDDnp com fração membranar de rim de rato na presença de fosforamidon 1  $\mu$ M.

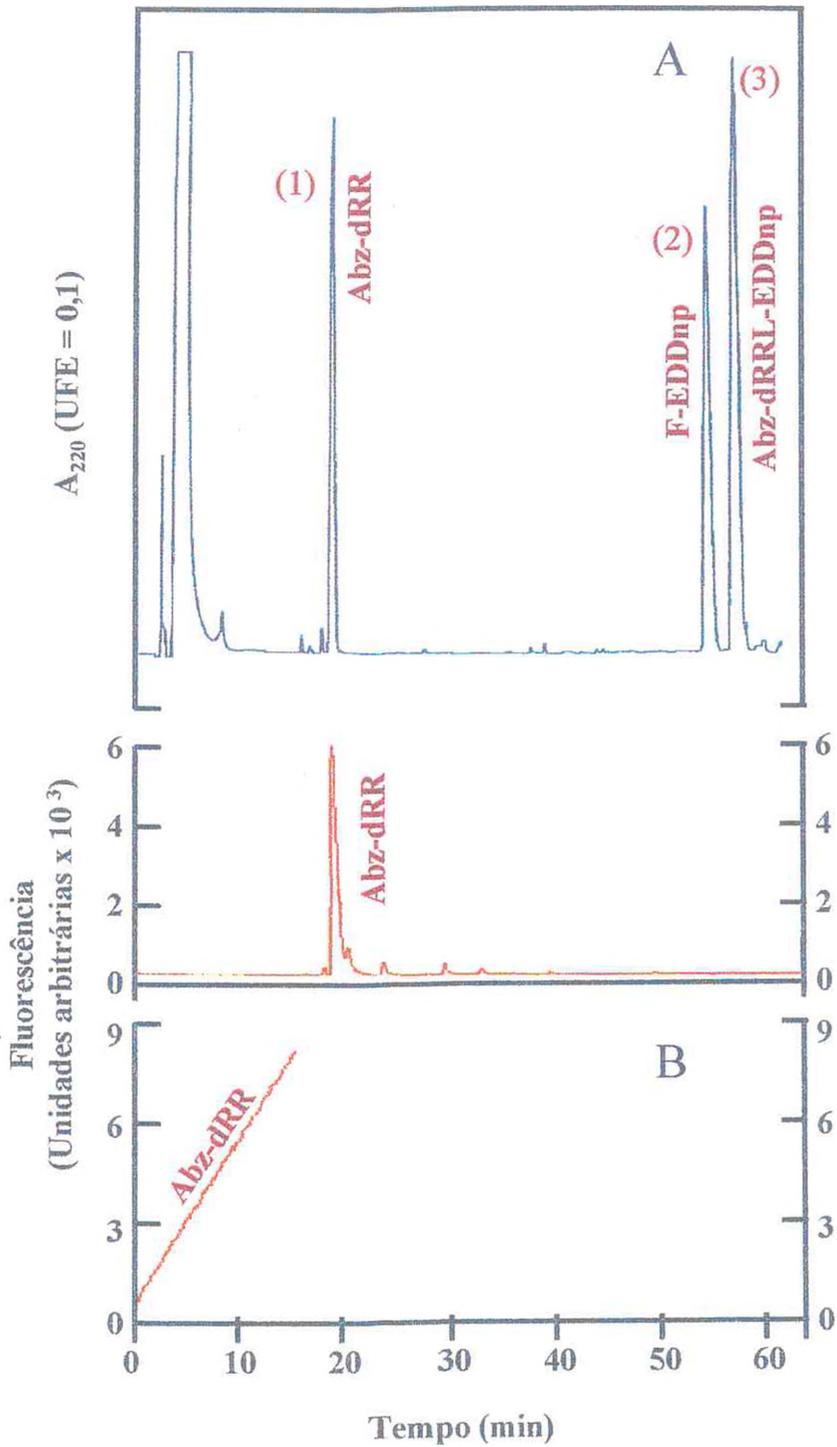
A figura 21A mostra o perfil de eluição do substrato Abz-GGdFLRRV-EDDnp e seus produtos de hidrólise após incubação com homogenato de rim de rato na presença de fosforamidon 1  $\mu$ M. A incubação do substrato (10 nmol) com 10  $\mu$ l de homogenato de rim (180  $\mu$ g ml<sup>-1</sup>) na presença de fosforamidon 1  $\mu$ M foi realizada em um volume final de 100  $\mu$ l de tampão Tris-HCl 50 mM, pH 7,5 a 37°C por 30 minutos. A reação era interrompida através de aquecimento durante 5 minutos a 100°C e os produtos resultantes da hidrólise eram separados por cromatografia líquida de alta performance (HPLC) usando-se uma coluna de fase reversa do tipo Nucleosil C<sub>18</sub>, 5  $\mu$ m (145 x 4,5 mm). O gradiente era de 20 a 40% de acetonitrila contendo 0,05% de ácido trifluoracético durante um período de 30 minutos, com fluxo de 1 ml.min<sup>-1</sup>. A reação era detectada com absorvância UV (220 nm) e fluorescência ( $\lambda_{em}$  = 420 nm,  $\lambda_{ex}$  = 320 nm) com os detectores arranjados em série e coletados para identificar o sítio de hidrólise através de análise de aminoácidos como descrito em materiais e métodos. Na figura 21B é ilustrado o experimento onde a reação do substrato Abz-GGdFLRRV-EDDnp com fração membranar de rim na presença de fosforamidon 1  $\mu$ M é demonstrada através do registro da fluorescência contínua ( $\lambda_{em}$  = 420 nm,  $\lambda_{ex}$  = 320 nm).



**Figura 21** - Perfil de eluição do substrato Abz-GGdFLRRV-EDDnp com fração membranaar de rim na presença de fosforamidon 1  $\mu$ M (A). Registro da fluorescência contínua do substrato Abz-GGdFLRRV-EDDnp com fração membranaar de rim na presença de 1  $\mu$ M de fosforamidon (B).

**Figura 22** – Hidrólise do substrato Abz-dRRL-EDDnp com fração membranar de rim de rato.

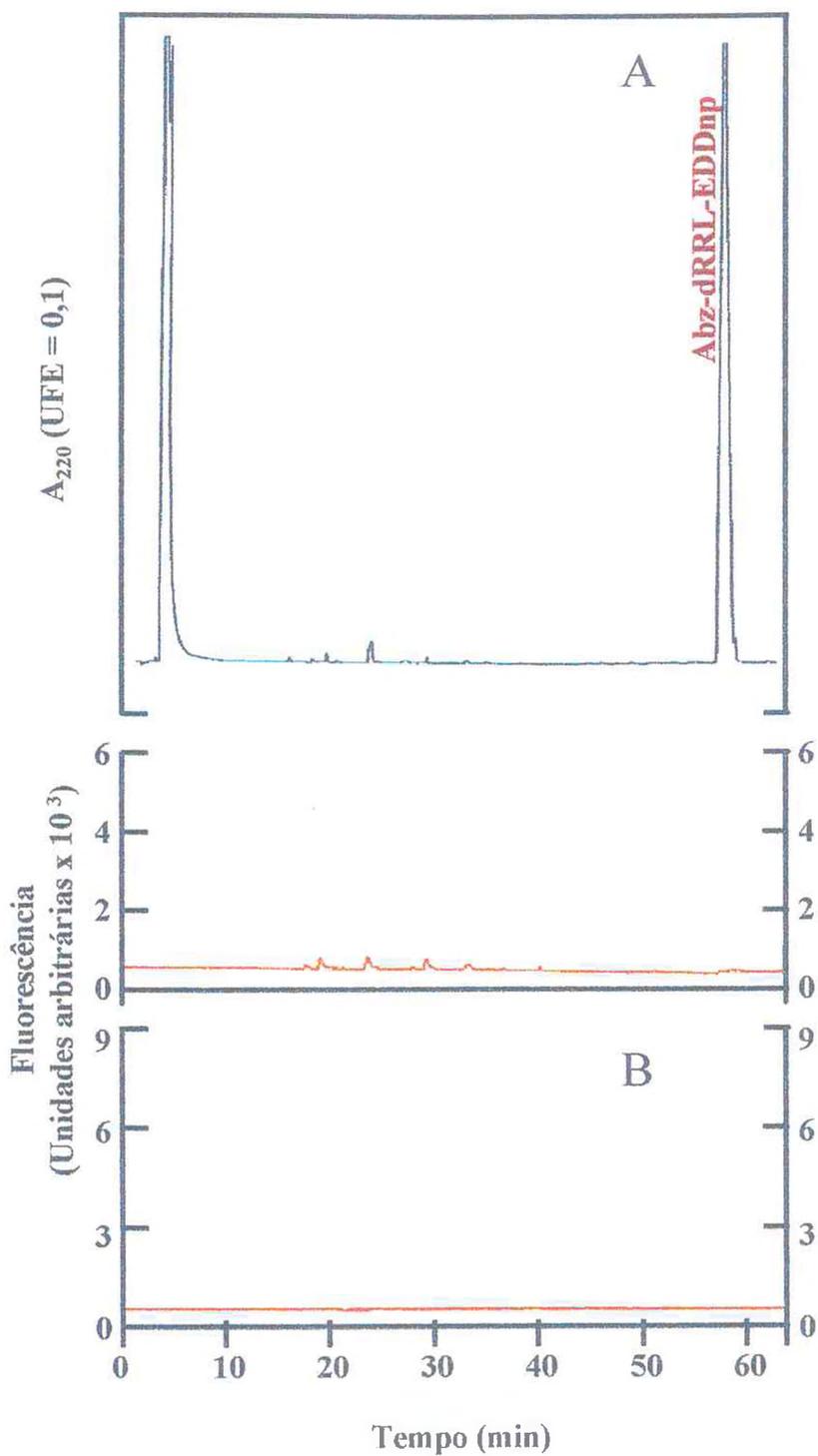
Perfil de eluição do substrato Abz-dRRL-EDDnp e seus produtos gerados após incubação com homogenato de rim de rato (A). A incubação do substrato (10 nmol) com 10  $\mu$ l de homogenato de rim (180  $\mu$ g ml<sup>-1</sup>) foi realizada em um volume final de 100  $\mu$ l de tampão Tris-HCl, pH 7,5 a 37°C por 60 minutos. A reação era interrompida através de aquecimento durante 5 minutos a 100°C e os produtos resultantes da hidrólise eram separados por cromatografia líquida de alta performance (HPLC) usando-se uma coluna de fase reversa do tipo Nucleosil C<sub>18</sub>, 5 $\mu$ m (145 x 4,5 mm). O gradiente era de 20 a 40% de acetonitrila contendo 0,05% de ácido trifluoracético durante um período de 60 minutos, com fluxo de 1 ml min<sup>-1</sup>. Substrato e produtos eram detectados com absorvância UV (220 nm) e fluorescência ( $\lambda_{em}$  = 420 nm,  $\lambda_{ex}$  = 320 nm) com os detectores arranjados em série e coletados para identificar o sítio de hidrólise através de análise de aminoácidos como descrito em materiais e métodos. Na figura 22B é ilustrado o experimento onde a hidrólise do substrato Abz-dRRL-EDDnp com fração membranar de rim é demonstrada através do registro do aumento da fluorescência contínua ( $\lambda_{em}$  = 420 nm,  $\lambda_{ex}$  = 320 nm).



**Figura 22** - Perfil de eluição dos produtos gerados após incubação do Abz-dRRRL-EDDnp com fração membranaar de rim (A). Registro da fluorescência contínua da hidrólise do substrato Abz-dRRRL-EDDnp com fração membranaar de rim (B).

**Figura 23** – Reação do substrato Abz-dRRL-EDDnp com fração membranar de rim de rato na presença de fosforamidon 1 $\mu$ M.

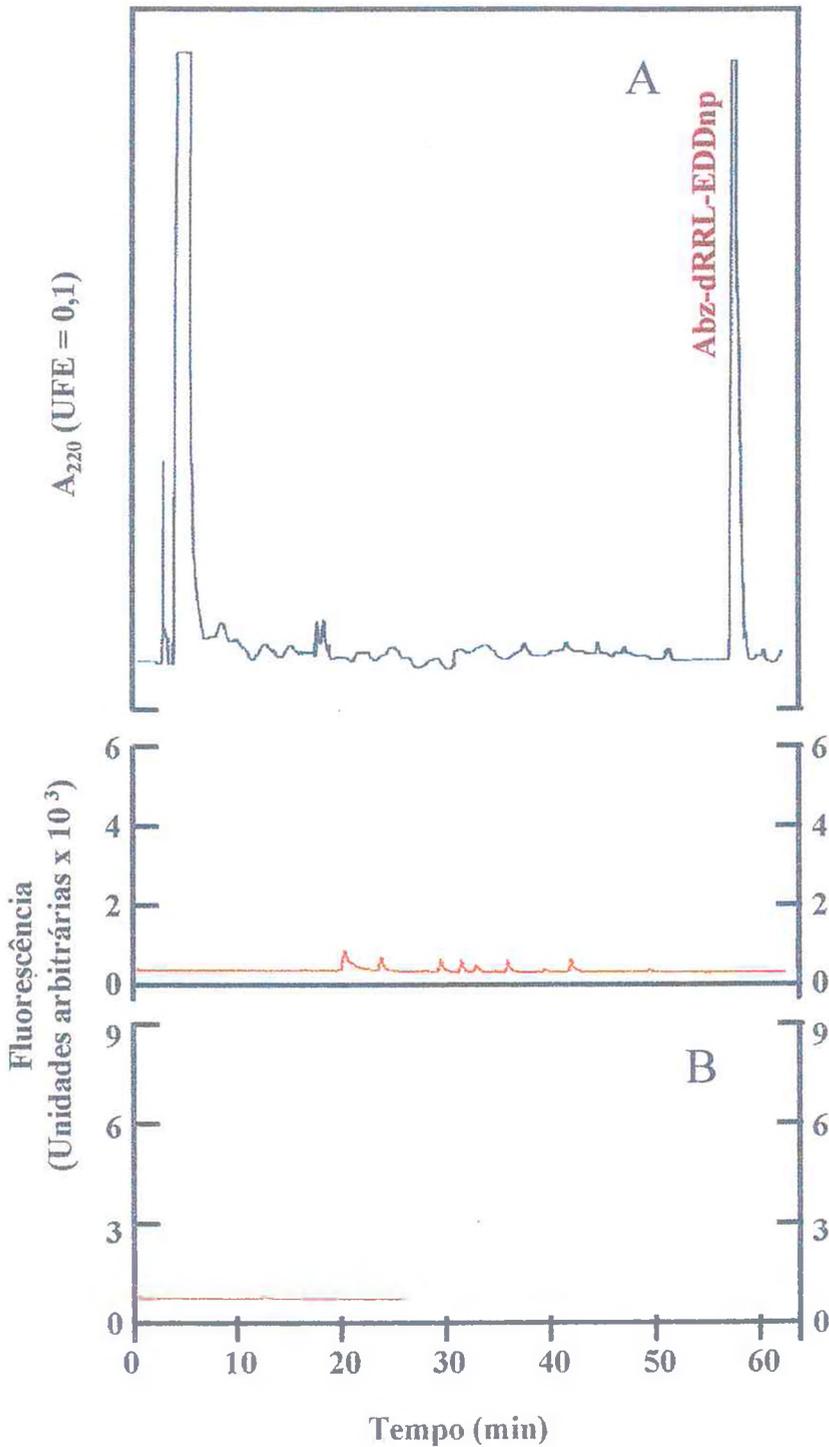
Perfil de eluição do substrato Abz-dRRL-EDDnp e seus produtos de hidrólise após incubação com homogenato de rim de rato na presença de fosforamidon (1  $\mu$ M) (A). A incubação do substrato (10 nmol) com 10  $\mu$ l de homogenato de rim (180  $\mu$ g ml<sup>-1</sup>) na presença de fosforamidon (1 $\mu$ M) foi realizada em um volume final de 100  $\mu$ l de tampão Tris-HCl, pH 7,5 a 37°C por 60 minutos. A reação era interrompida através de aquecimento durante 5 minutos a 100°C e os produtos resultantes da hidrólise eram separados por cromatografia líquida de alta performance (HPLC) usando-se uma coluna de fase reversa do tipo Nucleosil C<sub>18</sub>, 5 $\mu$ m (145 x 4,5 mm). O gradiente era de 20 a 40% de acetonitrila contendo 0,05% de ácido trifluoracético durante um período de 60 minutos, com fluxo de 1 ml.min<sup>-1</sup>. A reação era detectada com absorvância UV (220 nm) e fluorescência ( $\lambda_{em}$  = 420 nm,  $\lambda_{ex}$  = 320 nm) com os detectores arranjados em série e coletados para identificar o sítio de hidrólise através de análise de aminoácidos como descrito em materiais e métodos. Na figura 23B é ilustrada a reação do substrato Abz-dRRL-EDDnp com fração membranar de rim na presença de fosforamidon 1  $\mu$ M através do registro da fluorescência contínua ( $\lambda_{em}$  = 420 nm,  $\lambda_{ex}$  = 320 nm).



**Figura 23** - Perfil de eluição da incubação do Abz-dRRRL-EDDnp com fração membranaar de rim na presença de fosforamidon 1  $\mu$ M (A). Registro da fluorescência contínua da reação do substrato Abz-dRRRL-EDDnp com fração membranaar de rim na presença de 1  $\mu$ M de fosforamidon (B).

**Figura 24** – Reação do substrato Abz-dRRL-EDDnp com enzima conversora de angiotensina.

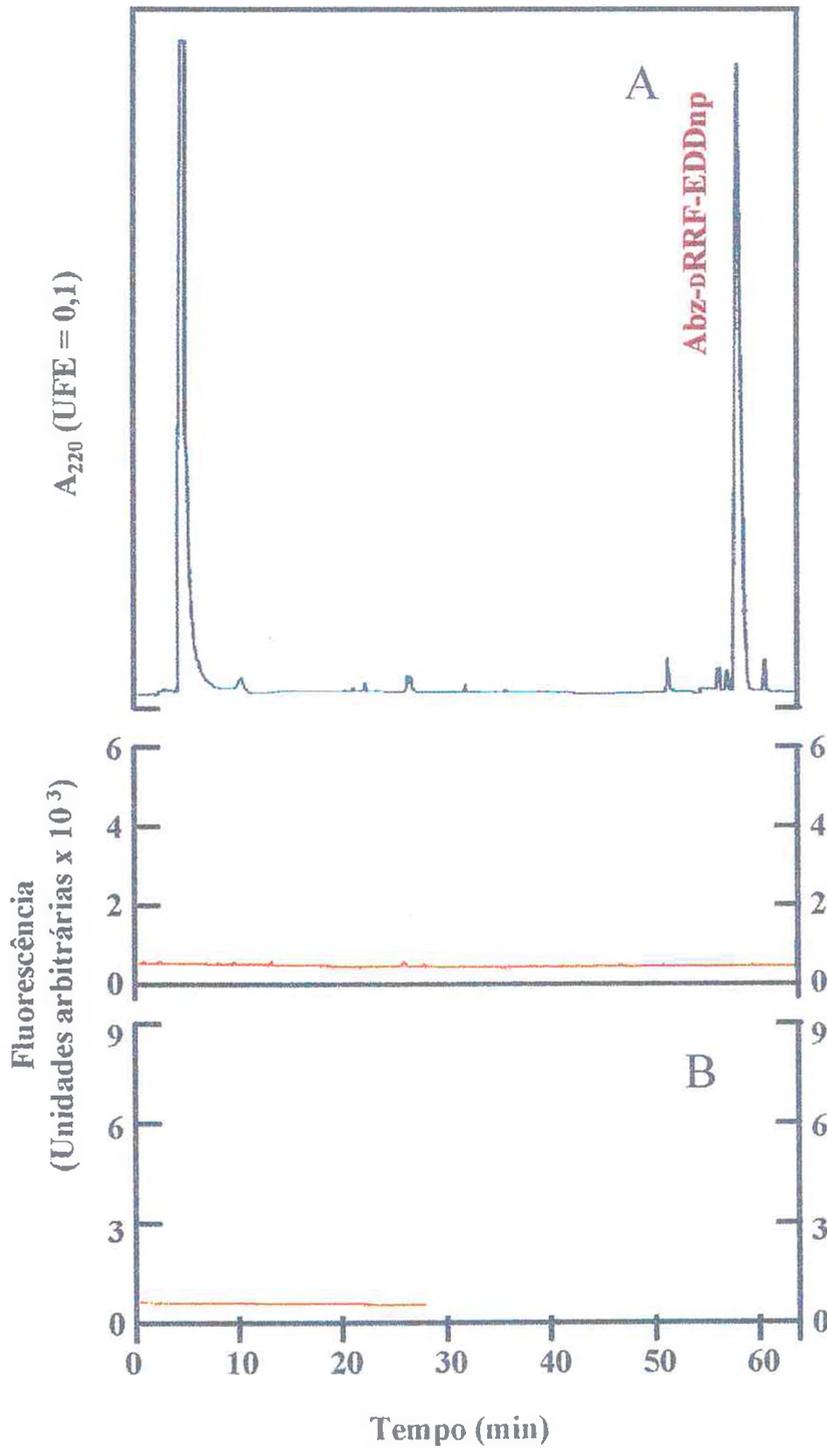
Perfil de eluição do substrato Abz-dRRL-EDDnp após incubação com enzima conversora de angiotensina ( $10 \mu\text{g ml}^{-1}$ ) (24A). A incubação do substrato ( $10 \text{ nmol}$ ) com enzima conversora de angiotensina ( $10 \mu\text{g ml}^{-1}$ ) foi realizada em um volume final de  $100 \mu\text{l}$  de tampão Tris-HCl, pH 7,5 a  $37^\circ\text{C}$  por 60 minutos. A reação era interrompida através de aquecimento durante 5 minutos a  $100^\circ\text{C}$  e submetida a cromatografia líquida de alta performance (HPLC) usando-se uma coluna de fase reversa do tipo Nucleosil  $\text{C}_{18}$ ,  $5 \mu\text{m}$  ( $145 \times 4,5 \text{ mm}$ ). O gradiente era de 20 a 40% de acetonitrila contendo 0,05% de ácido trifluoracético durante um período de 60 minutos, com fluxo de  $1 \text{ ml min}^{-1}$ . Na figura 24B é ilustrada a reação do substrato Abz-dRRL-EDDnp com enzima conversora de angiotensina através do registro da fluorescência contínua ( $\lambda_{\text{em}} = 420 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{ex}} = 320 \text{ nm}$ ).



**Figura 24** - Perfil de eluição da incubação do Abz-dRRL-EDDnp com enzima conversora de angiotensina (A). Registro da fluorescência contínua da reação do substrato Abz-dRRL-EDDnp com enzima conversora de angiotensina (B).

**Figura 25 – Reação do substrato Abz-dRRL-EDDnp com tripsina.**

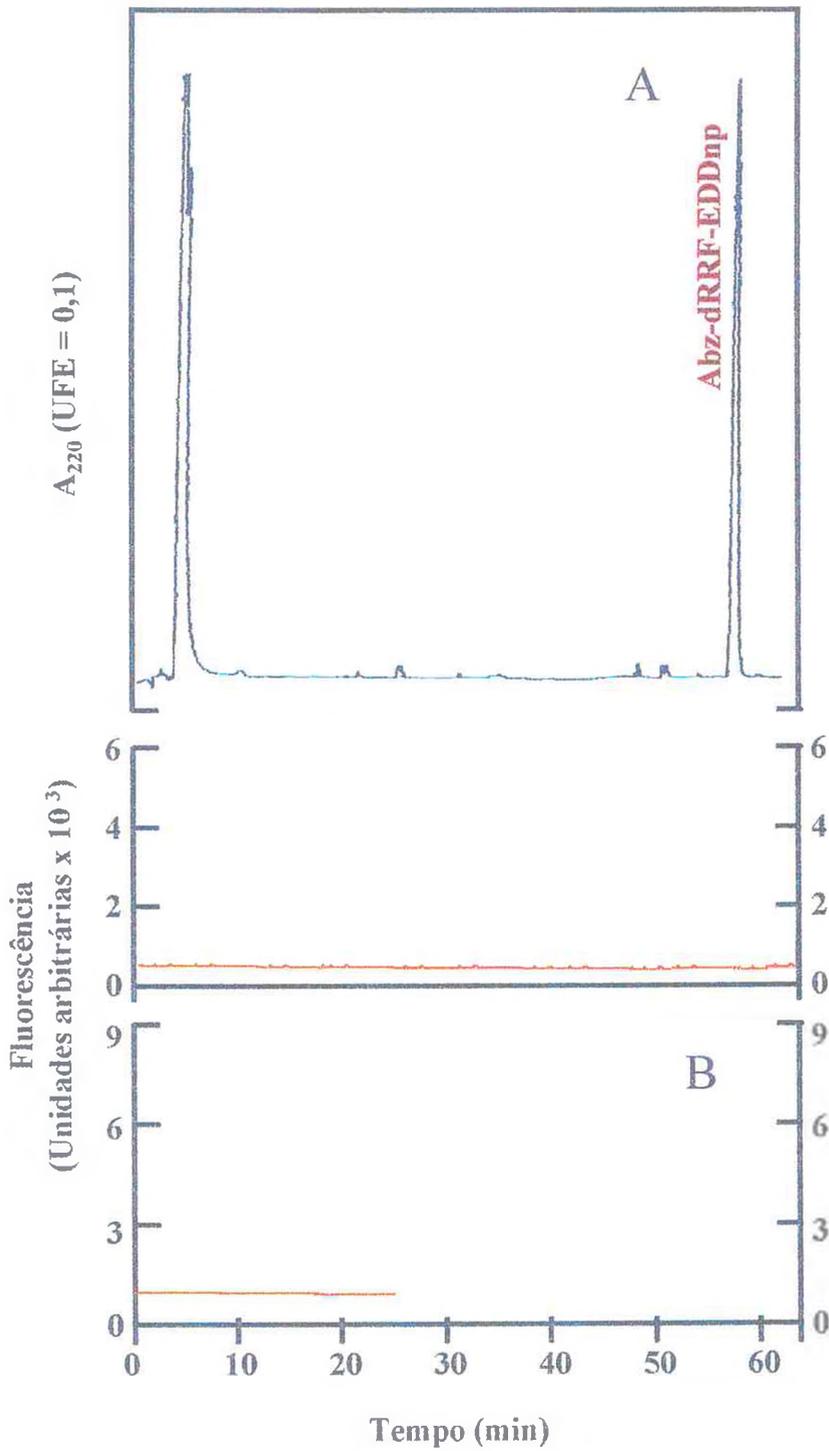
Perfil de eluição do substrato Abz-dRRL-EDDnp após incubação com tripsina ( $15 \mu\text{g ml}^{-1}$ ) (25A). A incubação do substrato (10 nmol) com tripsina ( $15 \mu\text{g ml}^{-1}$ ) foi realizada em um volume final de 100  $\mu\text{l}$  de tampão Tris-HCl, pH 7,5 a  $37^\circ\text{C}$  por 60 minutos. A reação era interrompida através de aquecimento durante 5 minutos a  $100^\circ\text{C}$  e submetida a cromatografia líquida de alta performance (HPLC) usando-se uma coluna de fase reversa do tipo Nucleosil  $\text{C}_{18}$ ,  $5\mu\text{m}$  (145 x 4,5 mm). O gradiente era de 20 a 40% de acetonitrila contendo 0,05% de ácido trifluoracético durante um período de 60 minutos, com fluxo de  $1 \text{ ml min}^{-1}$ . Na figura 25B é ilustrada a reação do substrato Abz-dRRL-EDDnp com tripsina através do registro da fluorescência contínua ( $\lambda_{\text{em}} = 420 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{ex}} = 320 \text{ nm}$ ).



**Figura 25** - Perfil de eluição da incubação do Abz-dRRRL-EDDnp com tripsina (A). Registro da fluorescência contínua da reação do substrato Abz-dRRRL-EDDnp com tripsina (B).

**Figura 26 – Reação do substrato Abz-dRRL-EDDnp com termolisina.**

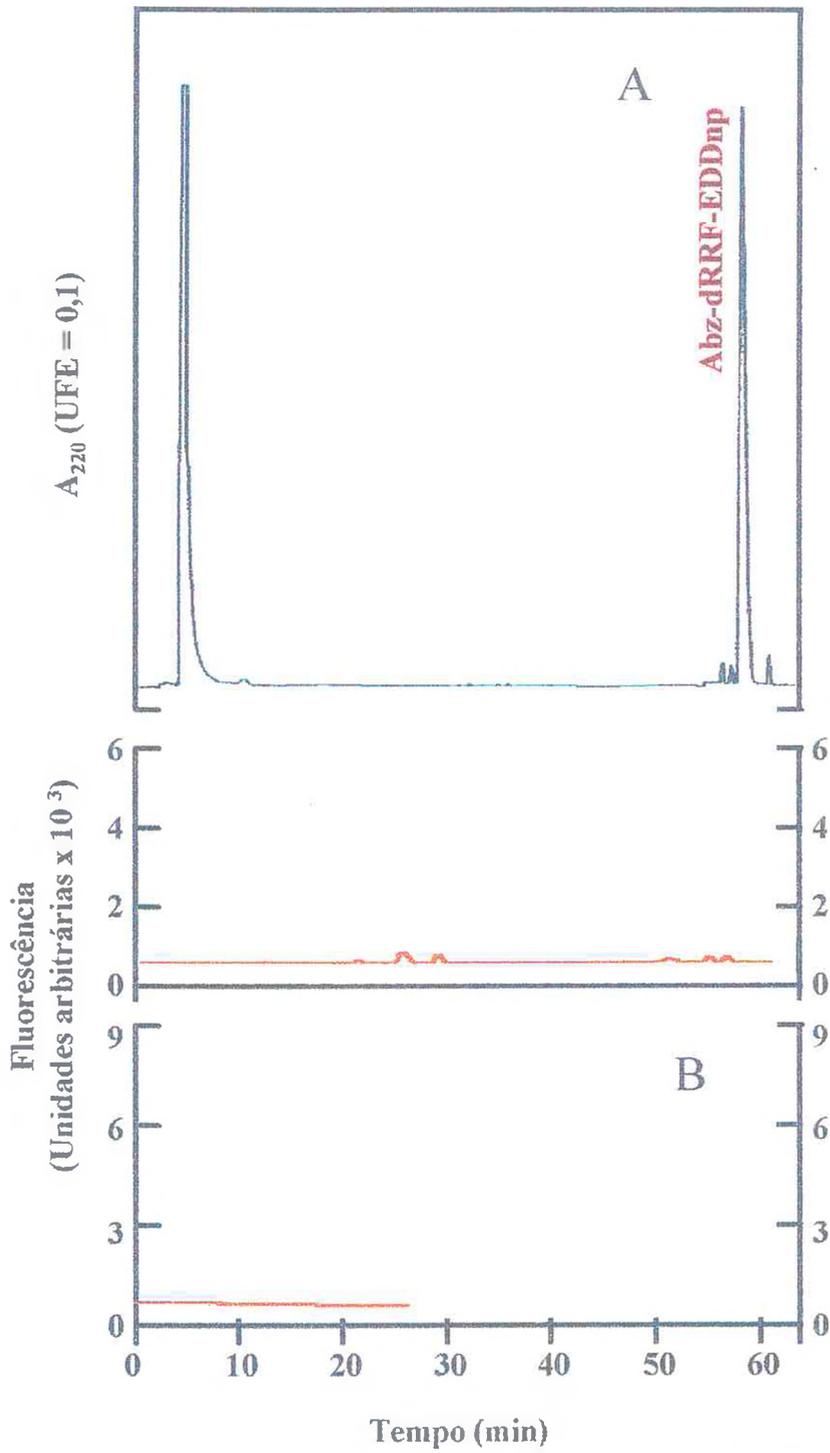
Perfil de eluição do substrato Abz-dRRL-EDDnp após incubação com termolisina ( $0,15 \mu\text{g ml}^{-1}$ ) (26A). A incubação do substrato ( $10 \text{ nmol}$ ) com termolisina ( $0,15 \mu\text{g ml}^{-1}$ ) foi realizada em um volume final de  $100 \mu\text{l}$  de tampão Tris-HCl, pH 7,5 a  $37^\circ\text{C}$  por 60 minutos. A reação foi interrompida através de aquecimento durante 5 minutos a  $100^\circ\text{C}$  e submetida a cromatografia líquida de alta performance (HPLC) usando-se uma coluna de fase reversa do tipo Nucleosil  $\text{C}_{18}$ ,  $5 \mu\text{m}$  ( $145 \times 4,5 \text{ mm}$ ). O gradiente era de 20 a 40% de acetonitrila contendo 0,05% de ácido trifluoracético durante um período de 60 minutos, com fluxo de  $1 \text{ mlmin}^{-1}$ . Na figura 25B é ilustrada a reação do substrato Abz-dRRL-EDDnp com termolisina através do registro da fluorescência contínua ( $\lambda_{\text{em}} = 420 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{ex}} = 320 \text{ nm}$ ).



**Figura 26** - Perfil de eluição da incubação do Abz-dRRRF-EDDnp com termolisina (A). Registro da fluorescência contínua da reação do substrato Abz-dRRRF-EDDnp com termolisina (B).

**Figura 27** – Reação do substrato Abz-dRRL-EDDnp com  $\alpha$ -quimotripsina.

Perfil de eluição do substrato Abz-dRRL-EDDnp após incubação com  $\alpha$ -quimotripsina ( $8 \mu\text{g ml}^{-1}$ ) (27A). A incubação do substrato (10 nmol) com  $\alpha$ -quimotripsina ( $8 \mu\text{g ml}^{-1}$ ) foi realizada em um volume final de 100  $\mu\text{l}$  de tampão Tris-HCl, pH 7,5 a  $37^\circ\text{C}$  por 60 minutos. A reação era interrompida através de aquecimento durante 5 minutos a  $100^\circ\text{C}$  e submetida a cromatografia líquida de alta performance (HPLC) usando-se uma coluna de fase reversa do tipo Nucleosil C<sub>18</sub>,  $5\mu\text{m}$  (145 x 4,5 mm). O gradiente era de 20 a 40% de acetonitrila contendo 0,05% de ácido trifluoracético durante um período de 60 minutos, com fluxo de  $1 \text{ ml min}^{-1}$ . Na figura 25B é ilustrada a reação do substrato Abz-dRRL-EDDnp com termolisina através do registro da fluorescência contínua ( $\lambda_{\text{em}} = 420 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{ex}} = 320 \text{ nm}$ ).



**Figura 27** - Perfil de eluição da incubação do Abz-dRRL-EDDnp com  $\alpha$ -quimotripsina (A). Registro da fluorescência contínua da reação do substrato Abz-dRRL-EDDnp com  $\alpha$ -quimotripsina (B).

Substratos	Endopeptidase Neutra	ACE	Termolisina	Tripsina	Quimotripsina
Abz-dR-R-L-EDDnp	+	-	-	-	-
Abz-dR-R-F-EDDnp	+	-	-	-	-
Abz-dR-R-V-EDDnp	+	-	-	-	-
Abz-R-R-V-DDnp	+	-	-	+	-
Abz-G-G-dF-L-R-R-V-EDDnp	+	-	-	+	-

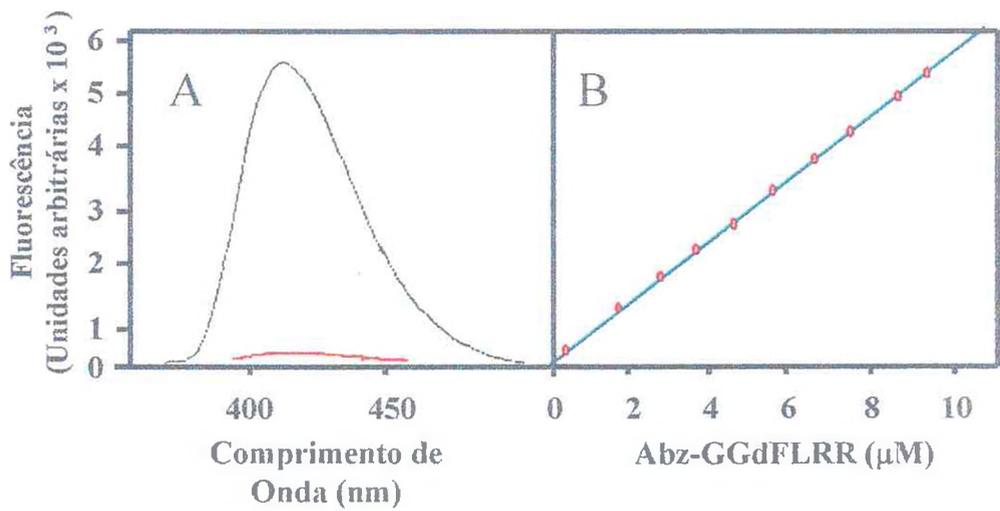
**Tabela 06** - Incubação dos peptídeos Abz-dRRL-EDDnp, Abz-dRRF-EDDnp, Abz-dRRV-EDDnp, Abz-RRV-EDDnp e Abz-GGdFLRRV-EDDnp com NEPr ( $0,5 \mu\text{g ml}^{-1}$ ), ACE ( $10 \mu\text{g ml}^{-1}$ ), termolisina ( $0,15 \mu\text{g ml}^{-1}$ ), tripsina ( $15 \mu\text{g ml}^{-1}$ ) e  $\alpha$ -quimotripsina ( $8 \mu\text{g ml}^{-1}$ ).

#### 5.4. Espectro de emissão ( $\lambda_{ex} = 320$ ) do Abz-GGdFLRRV-EDDnp, Abz-GGdFLRR, Abz-dRRL-EDDnp e Abz-dRR

O espectro de emissão do ( $\lambda_{ex}=320$ ) Abz-GGdFLRRV-EDDnp é mostrado na **figura 28**. A intensidade de fluorescência máxima do produto Abz-GGdFLRR emitida a 420 nm foi cerca de 50 vezes à fluorescência apresentada pelo substrato Abz-GGdFLRRV-EDDnp. O espectro de emissão do ( $\lambda_{ex}=320$ ) substrato Abz-dRRL-EDDnp e do produto Abz-dRR é mostrado na **figura 29**. A intensidade de fluorescência máxima dos produtos Abz-dRR, Abz-dRR e Abz-dRR emitida a 420 nm, gerados após total hidrólise dos substratos Abz-dRRL-EDDnp, Abz-dRRF-EDDnp e Abz-dRRV-EDDnp pela NEPr foi cerca de 80, 84 e 82 vezes à fluorescência dos respectivos substratos (**Tabela 07**).

#### 5.5. Curva de calibração da fluorescência emitida pelo Abz-GGdFLRR e Abz-dRR

Uma curva de calibração de fluorescência ( $\lambda_{ex}=320$ ,  $\lambda_{em}=420$ ) foi construída com várias concentrações do produto Abz-GGdFLRR (**Figura 28B**) e do produto Abz-dRR (**Figura 29B**). Foram também construídas curvas de calibração para os produtos gerados da hidrólise dos substratos Abz-dRRF-EDDnp e Abz-dRRV-EDDnp pela NEPr. Essas curvas foram utilizadas para converter os valores da fluorescência do produto liberado em moles do respectivo substrato, hidrolisado por unidade de tempo.



**Figura 28** - Espectro de emissão ( $\lambda_{ex} = 320$  nm) de uma solução contendo 10  $\mu$ M de Abz-GGdFLRRV-EDDnp, em tampão Tris-HCl 50 mM, pH 7,5 antes (curva inferior) e após (curva superior) sua total hidrólise com NEPr (A). Curva de calibração da fluorescência ( $\lambda_{em} = 420$  nm,  $\lambda_{ex} = 320$  nm) emitida por diferentes concentrações de Abz-GGdFLRR em Tris-HCl 50 mM, pH 7,5 (B).

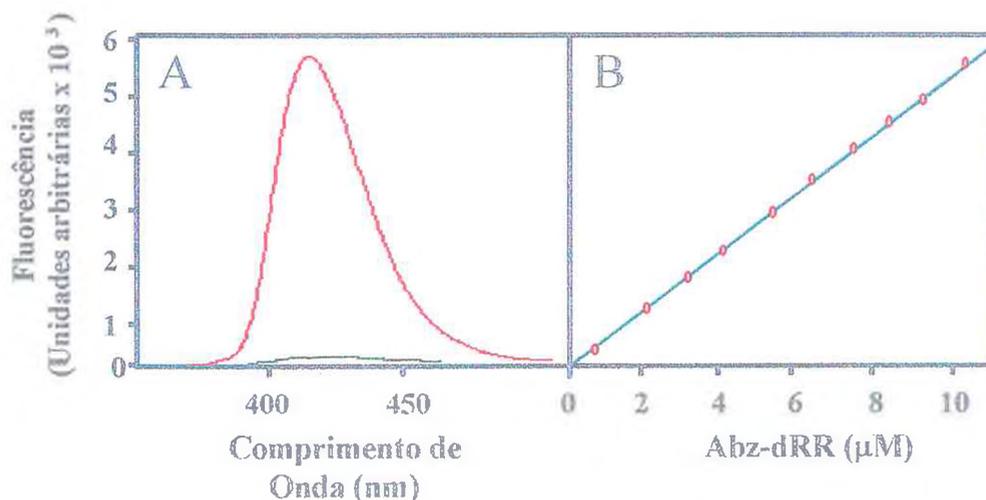


Figura 29 - Espectro de emissão ( $\lambda_{\text{ex}}=320$  nm) de uma solução contendo  $10 \mu\text{M}$  de Abz-dRRL-EDDnp, em tampão Tris-HCl 50 mM, pH 7,5 antes (curva inferior) e após (curva superior) sua total hidrólise com NEPr (A). Curva de calibração da fluorescência ( $\lambda_{\text{em}}=420$  nm,  $\lambda_{\text{ex}}=320$  nm) emitida por diferentes concentrações de Abz-dRR em Tris-HCl 50 mM, pH 7,5 (B).

Tabela 07 - Aumento da fluorescência após total hidrólise dos substratos fluorogênicos pela NEPr.

Peptídeos	$F_t / F_i$
Abz-dR-R-L-EDDnp	80
Abz-dR-R-F-EDDnp	84
Abz-dR-R-V-EDDnp	82
Abz-G-G-dF-L-R-R-V-EDDnp	50

A fluorescência ( $F_i$ ) foi medida em espectrofluorômetro ( $\lambda_{em} = 420$  e  $\lambda_{ex} = 320$ ). NEPr foi adicionada e a fluorescência foi medida até que fosse alcançado um valor constante ( $F_t$ ).

## 5.6. Ensaio fluorimétrico contínuo

O ensaio fluorimétrico foi realizado com o registro contínuo do aumento da fluorescência, quando várias concentrações de NEP recombinante purificada (Figura 30A) ou várias alíquotas de homogenato de rim (Figura 30B) foram incubadas separadamente com o substrato Abz-dRRL-EDDnp durante um período de 5 minutos. Quando a incubação foi realizada na presença de fosforamidon na concentração de 1  $\mu\text{M}$  a hidrólise do substrato pela NEP recombinante foi totalmente inibida.

A atividade da NEP em preparações membranares de rim, pulmão, cérebro de rato, homogenato de placenta, de membrana amniótica e cordão umbilical encontram-se na tabela 08. A atividade da NEP presente em todas essas frações membranares foi totalmente inibida quando se realizou uma pré-incubação com 1  $\mu\text{M}$  de fosforamidon. A presença de captopril na concentração de 1  $\mu\text{M}$  não alterou a hidrólise pela NEP presente nessas preparações. Esses mesmos resultados foram também demonstrados com os experimentos realizados sob as mesmas condições com os substratos Abz-dRRF-EDDnp, Abz-dRRV-EDDnp e Abz-GGdFLRRV-EDDnp.

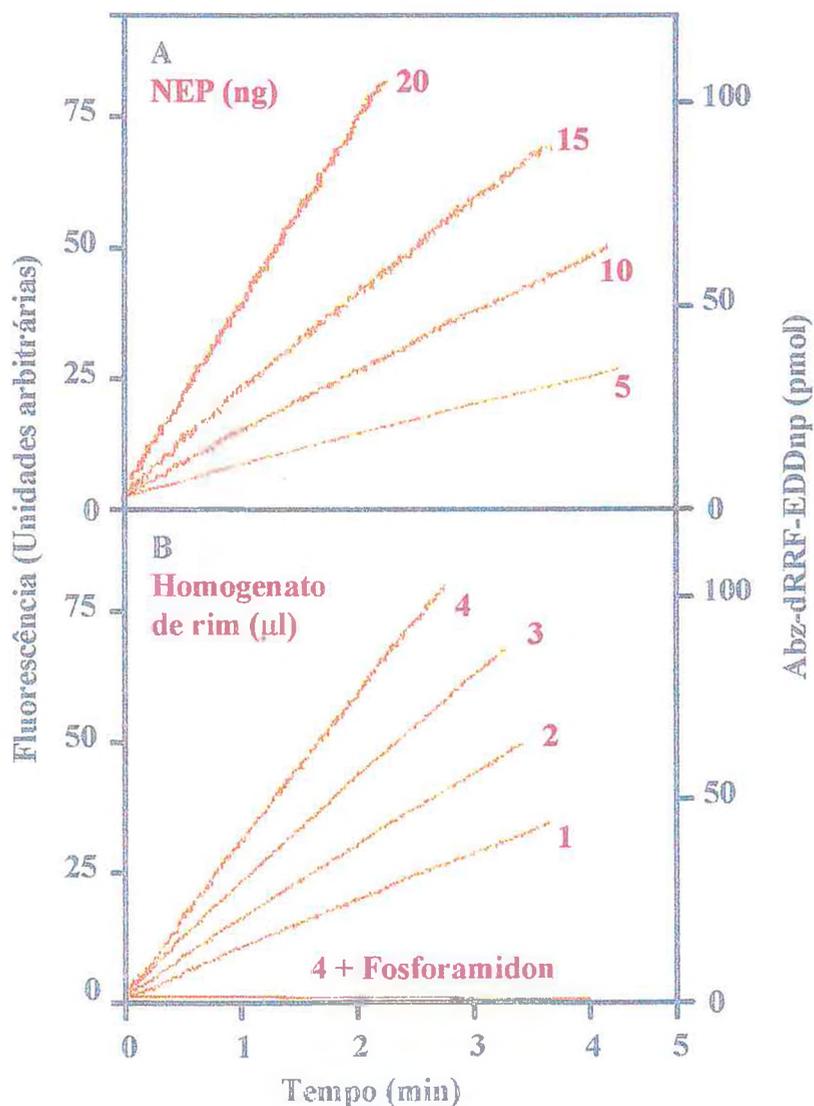


Figura 30 - Registro da fluorescência contínua da hidrólise do substrato Abz-dRRF-EDDnp com NEPr (5-20 ng) (A) ou com homogenato de rim (1-4 µl) (B) em um volume final de 500 µl de tampão Tris-HCl 50 mM, pH 7,5, a 37 °C. A quantidade de Abz-dRRF liberado foi calculado a partir da curva de calibração.

Tabela 08 - Determinação da atividade da NEP

Fonte de Enzima	Atividade* nmol mg <sup>-1</sup> min <sup>-1</sup>
Cordão umbilical	2,76 ± 0,54
Membrana amniótica	4,39 ± 0,89
Placenta	3,38 ± 0,31
Rim	152 ± 12
Pulmão	16,7 ± 1,5
Cérebro	2,7 ± 0,2

\*as atividades expressam as médias ± desvio padrão de 6 diferentes determinações.

### 5.7. Purificação da endopeptidase neutra do plasma seminal humano

Os procedimentos de purificação e dados de recuperação da atividade da endopeptidase neutra do plasma seminal humano, estão demonstrados na tabela 09. O procedimento resultou numa purificação de 200 vezes com recuperação de 13,1 para a atividade da NEP.

Inicialmente o plasma seminal humano foi exaustivamente dialisado e cromatografado em coluna de DEAE-Celulose. A atividade enzimática (NEP) foi monitorizada em espectrofluorômetro, utilizando-se como substrato o peptídeo Abz-dRRL-EDDnp. As frações eluídas com força iônica de 100 mM de NaCl apresentaram maior atividade enzimática e foram agrupadas e concentradas num único "pool", resultando em um volume de 5 ml de enzima semi-purificada. Os resultados obtidos estão reunidos na figura 31

### 5.8. Cromatografia de troca iônica em HPLC

A fração enzimática obtida da cromatografia de troca iônica em coluna de DEAE-Celulose, foi submetida a cromatografia de troca iônica em HPLC. Após desenvolvida a cromatografia, com gradiente de NaCl nas concentrações de 30 - 100%, obteve-se um "pool" de enzima ativa (Figura 32).

<b>Etapa de purificação</b>	<b>Proteína total (mg)</b>	<b>Atividade total (nmol / h)</b>	<b>Atividade específica (nmol / h / mg)</b>	<b>Índice de purificação</b>	<b>Recuperação da atividade (%)</b>
Amostra bruta	625	1032	1,65	1	100
DEAE-Celulose	19,8	554	27,9	16,9	53,6
DEAE-HPLC	0,2	73	365	221	13,1

**Tabela 09** - Etapas de purificação da endopeptidase neutra do plasma seminal

A atividade enzimática foi avaliada com alíquotas de 50 µl de cada passo de purificação. O peptídeo Abz-dRRL-EDDnp foi utilizado como substrato. As atividades foram expressas como nmoles do substrato hidrolisado por hora e a concentração de proteínas foi determinada pelo método de Bradford (Bradford, 1976). A atividade específica esta expressa como nmoles do substrato clivado por hora por mg de proteína.

**Figura 31** – Cromatografia de troca iônica em DEAE-Celulose do plasma seminal humano após diálise.

O plasma seminal humano foi dialisado contra tampão Tris-HCl 50 mM, pH 7,5 e submetido à cromatografia de troca iônica em coluna de DEAE-Celulose (30 x 2,6 cm) equilibrada com o mesmo tampão, na temperatura de 4°C. Após aplicação, o material foi eluído por aumento da força iônica com NaCl nas concentrações de 50 mM, 100 mM, 200 mM e 500 mM no mesmo tampão. A absorbância do efluente da coluna foi monitorizada em 280 nm. As frações colhidas foram de 2 ml e as alíquotas para o ensaio da atividade enzimática de 50 µl. O substrato utilizado foi o Abz-dRRL-EDDnp. A determinação da atividade enzimática está descrita em material e métodos.

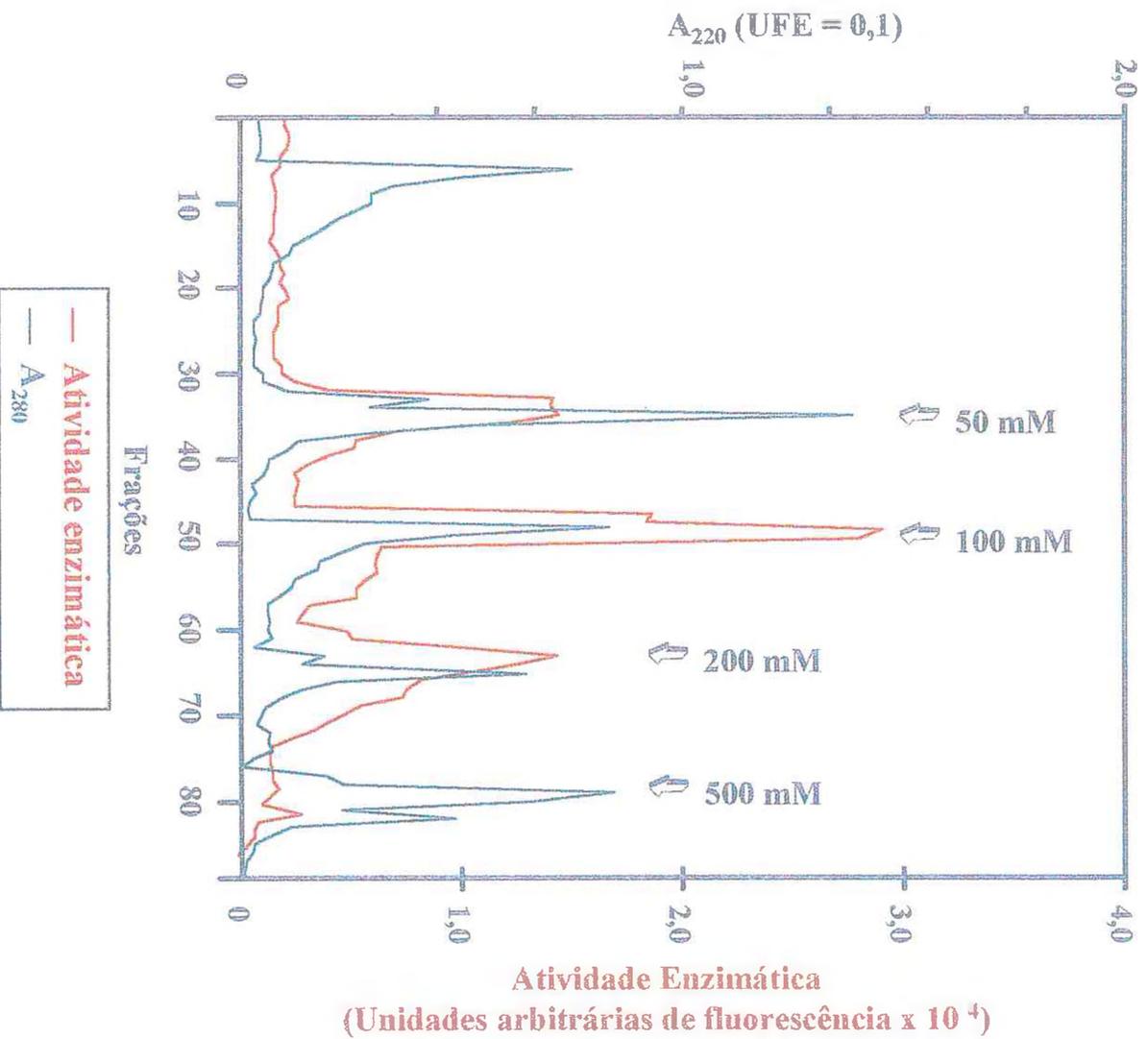


Figura 31 - Cromatografia de troca iônica em coluna de DEAE-Celulose

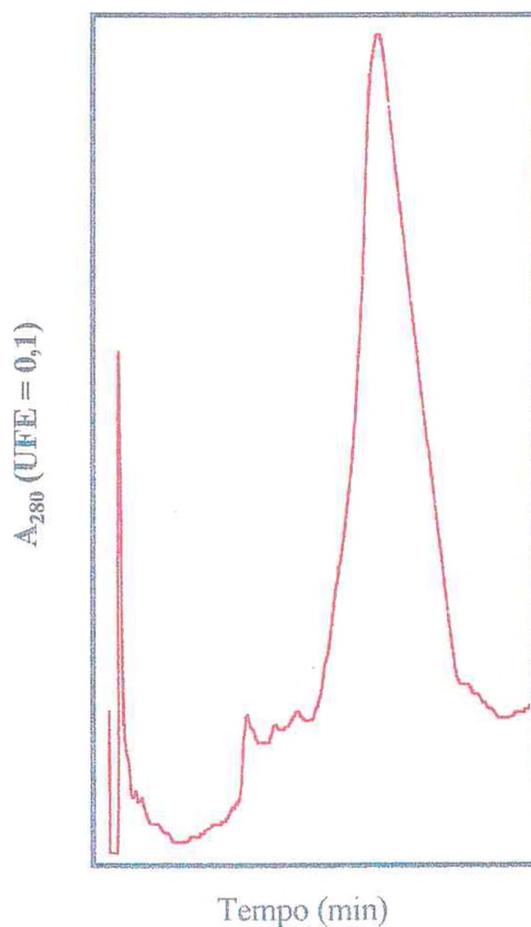


Figura 32 - Cromatografia de troca iônica – HPLC

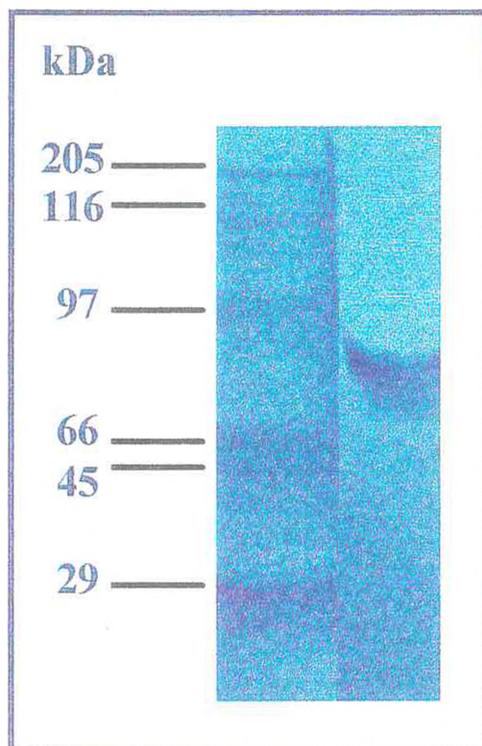
A fração enzimática obtida da cromatografia de troca iônica em coluna de DEAE-Celulose e concentrada foi submetida a cromatografia de troca iônica-HPLC. Após desenvolvida a cromatografia, com Tris NaCl na concentração de 30-100%, obteve-se um “pool” de enzima ativa.

### 5.9. Peso molecular da enzima purificada do plasma seminal

Na eletroforese sem SDS foi identificada uma única banda, que coincidiu com o pico de atividade enzimática. Na eletroforese com SDS apareceu uma única banda com peso molecular em torno de 100 kD, como visualizada através de comparação com padrão de proteínas (Figura 33).

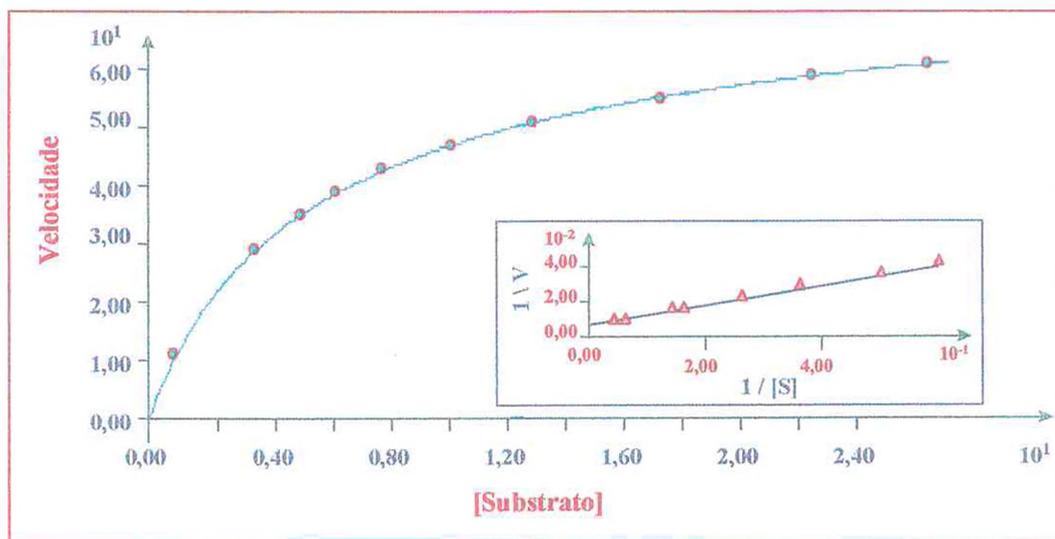
### 5.10. Determinação da constante de *Michaelis-Menten*

O  $K_m$  para a enzima purificada do plasma seminal humano foi de 6,8  $\mu\text{M}$  determinado pelo “plot” de *Lineweaver-Burk*, utilizando o programa ENZFITTER (R. J. Leatherbarrow) (Figura 34).



**Figura 33** - Eletroforese em placa de gel de poliacrilamida da endopeptidase neutra purificada do plasma seminal humano.

As amostras recuperadas da cromatografia de DEAE-HPLC foram submetidas a eletroforese na presença de SDS. As proteínas usadas como marcadores de peso molecular foram: anidrase carbônica (29 kD) ovalbumina (45 kD), albumina bovina (66 kD), fosforilase B (97 kD),  $\beta$ -galactosidase (116 kD) e miosina (205 kD). As proteínas foram visualizadas através coloração pelo *Coomassie Brilliant Blue* (CBB).



**Figura 34** – Gráfico da constante de *Michaelis-Menten* da endopeptidase neutra purificada do plasma seminal humano.

### **5.11. Hidrólise do substrato fluorogênicos com apagamento intramolecular de fluorescência (Abz-dRRL-EDDnp) pela NEP purificada do plasma seminal humano**

A incubação do substrato Abz-dRRL-EDDnp com NEP purificada do plasma seminal humano resultou na formação dos fragmentos complementares Abz-dRR e L-EDDnp (Figura 35). Essa atividade foi totalmente inibida na presença de fosforamidon 1  $\mu$ M como demonstrado pela exclusiva ausência dos produtos Abz-dRR e L-EDDnp (Figura 36). Resultado semelhante foi observado pelo registro da fluorescência na ausência (Figura 35B) e na presença de fosforamidon 1  $\mu$ M (Figura 36B).

A pré-incubação da enzima purificada com captopril 1  $\mu$ M não alterou a hidrólise desse substrato pela NEP purificada do plasma seminal humano (Figura 37A). Resultados semelhantes foram encontrados no ensaio com registro contínuo da fluorescência (Figura 37B).

### **5.12. Determinação do pH ótimo**

O pH ótimo para a enzima purificada do plasma seminal humano situa-se em torno de 7,0.

**Figura 35** – Hidrólise do substrato Abz-dRRL-EDDnp com NEP purificada do plasma seminal humano.

Perfil de eluição do substrato Abz-dRRL-EDDnp após incubação com NEP purificada do plasma seminal (A). A incubação do substrato (10 nmol) com NEP purificada (50  $\mu$ l) foi realizada em um volume final de 100  $\mu$ l de tampão Tris-HCl, pH 7,5 a 37°C por 60 minutos. A reação foi interrompida através de aquecimento durante 5 minutos a 100°C e submetida a cromatografia líquida de alta performance (HPLC) usando-se uma coluna de fase reversa do tipo Nucleosil C<sub>18</sub>, 5 $\mu$ m (145 x 4,5 mm). O gradiente era de 20 a 40% de acetonitrila contendo 0,05% de ácido trifluoracético durante um período de 60 minutos, com fluxo de 1 mlmin<sup>-1</sup>. Os produtos eram detectados com absorvância UV (220 nm) e fluorescência ( $\lambda_{em}$  = 420 nm,  $\lambda_{ex}$  = 320 nm) com os detectores arranjados em série. Na figura 34B é ilustrada a hidrólise do substrato Abz-dRRL-EDDnp com NEP purificada do plasma seminal humano através do registro do aumento da fluorescência contínua ( $\lambda_{em}$  = 420 nm,  $\lambda_{ex}$  = 320 nm).

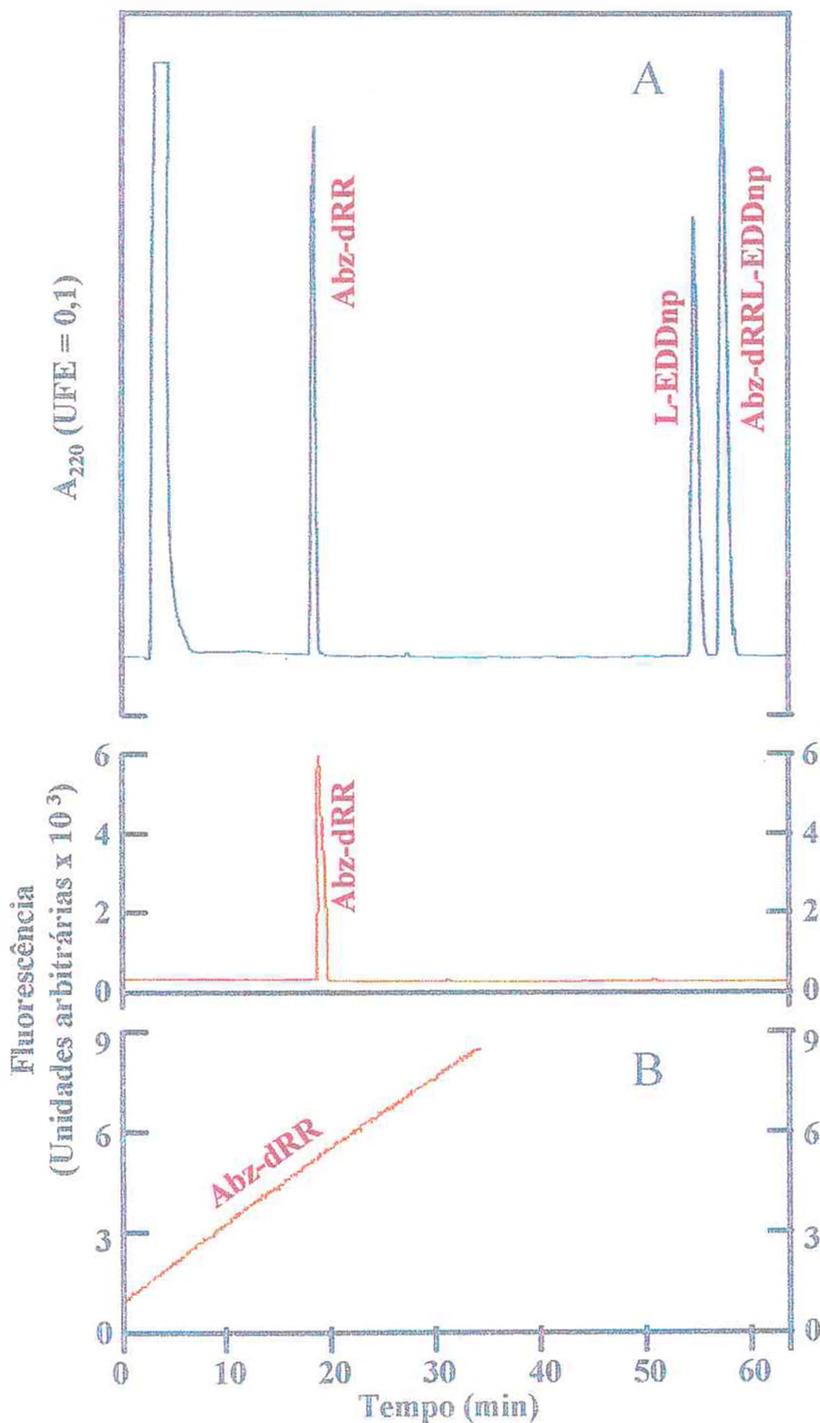


Figura 35 - Perfil de eluição dos produtos gerados após incubação do Abz-dRRR-EDDnp com NEP purificada do plasma seminal humano (A). Registro da fluorescência contínua da hidrólise do substrato Abz-dRRR-EDDnp com NEP purificada do plasma seminal humano(B).

**Figura 36** – Reação do substrato Abz-dRRL-EDDnp com NEP purificada do plasma seminal humano na presença de fosforamidon 1  $\mu$ M.

Perfil de eluição do substrato Abz-dRRL-EDDnp após incubação com NEP purificada do plasma seminal na presença de fosforamidon 1  $\mu$ M. A incubação do substrato (10 nmol) com NEP (50  $\mu$ l) foi realizada em um volume final de 100  $\mu$ l de tampão Tris-HCl, pH 7,5 a 37°C por 60 minutos. A reação foi interrompida através de aquecimento durante 5 minutos a 100°C e submetida a cromatografia líquida de alta performance (HPLC) usando-se uma coluna de fase reversa do tipo Nucleosil C<sub>18</sub>, 5  $\mu$ m (145 x 4,5 mm). O gradiente era de 20 a 40% de acetonitrila contendo 0,05% de ácido trifluoracético durante um período de 60 minutos, com fluxo de 1 mlmin<sup>-1</sup>. A reação era detectada com absorvância UV (220 nm) e fluorescência ( $\lambda_{em}$  = 420 nm,  $\lambda_{ex}$  = 320 nm) com os detectores arranjados em série. Na figura 35B é ilustrada a reação do substrato Abz-dRRL-EDDnp com NEP purificada do plasma seminal humano na presença de fosforamidon 1  $\mu$ M através do registro da fluorescência contínua ( $\lambda_{em}$  = 420 nm,  $\lambda_{ex}$  = 320 nm).

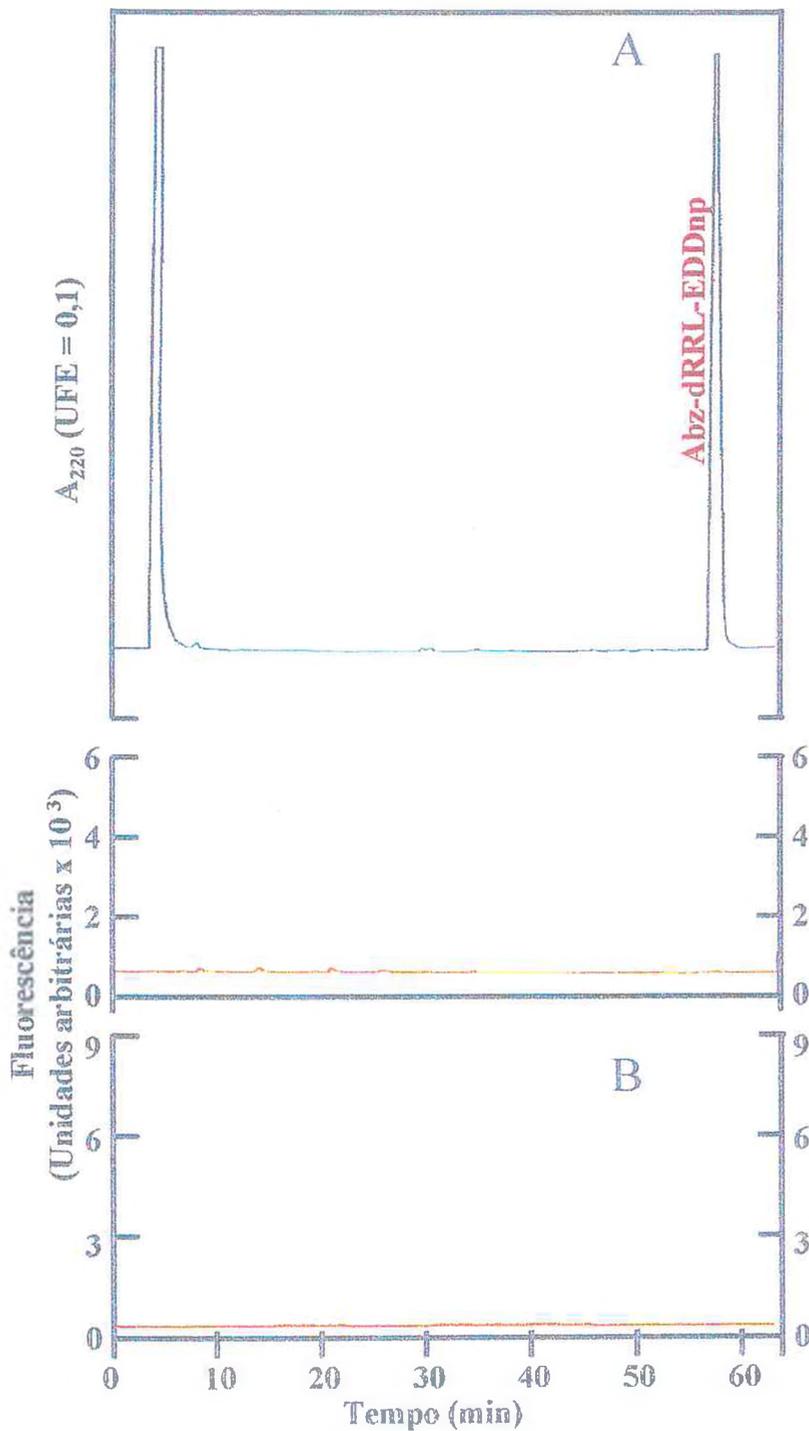


Figura 36 - Perfil de eluição da incubação do Abz-dRRL-EDDnp com NEP purificada do plasma seminal humano na presença de 1  $\mu$ M de fosforamidon (A). Registro da fluorescência contínua da reação do substrato Abz-dRRL-EDDnp com NEP purificada do plasma seminal humano na presença de 1  $\mu$ M de fosforamidon (B).

**Figura 37** – Reação do substrato Abz-dRRL-EDDnp com NEP purificada do plasma seminal humano na presença de captopril 1  $\mu$ M.

Perfil de eluição do substrato Abz-dRRL-EDDnp após incubação com NEP (50  $\mu$ l) purificada do plasma seminal na presença de captopril 1  $\mu$ M. A incubação do substrato (10 nmol) com NEP foi realizada em um volume final de 100  $\mu$ l de tampão Tris-HCl, pH 7,5 a 37°C por 60 minutos. A reação foi interrompida através de aquecimento durante 5 minutos a 100°C e submetida a cromatografia líquida de alta performance (HPLC) usando-se uma coluna de fase reversa do tipo Nucleosil C<sub>18</sub>, 5  $\mu$ m (145 x 4,5 mm). O gradiente era de 20 a 40% de acetonitrila contendo 0,05% de ácido trifluoracético durante um período de 60 minutos, com fluxo de 1 mlmin<sup>-1</sup>. Substrato e produtos eram detectados com absorvância UV (220 nm) e fluorescência ( $\lambda_{em}$  = 420 nm,  $\lambda_{ex}$  = 320 nm) com os detectores arranjados em série. Na figura 36B é ilustrada a reação do substrato Abz-dRRL-EDDnp com NEP purificada do plasma seminal humano na presença de captopril 1  $\mu$ M, através do registro da fluorescência contínua ( $\lambda_{em}$  = 420 nm,  $\lambda_{ex}$  = 320 nm).

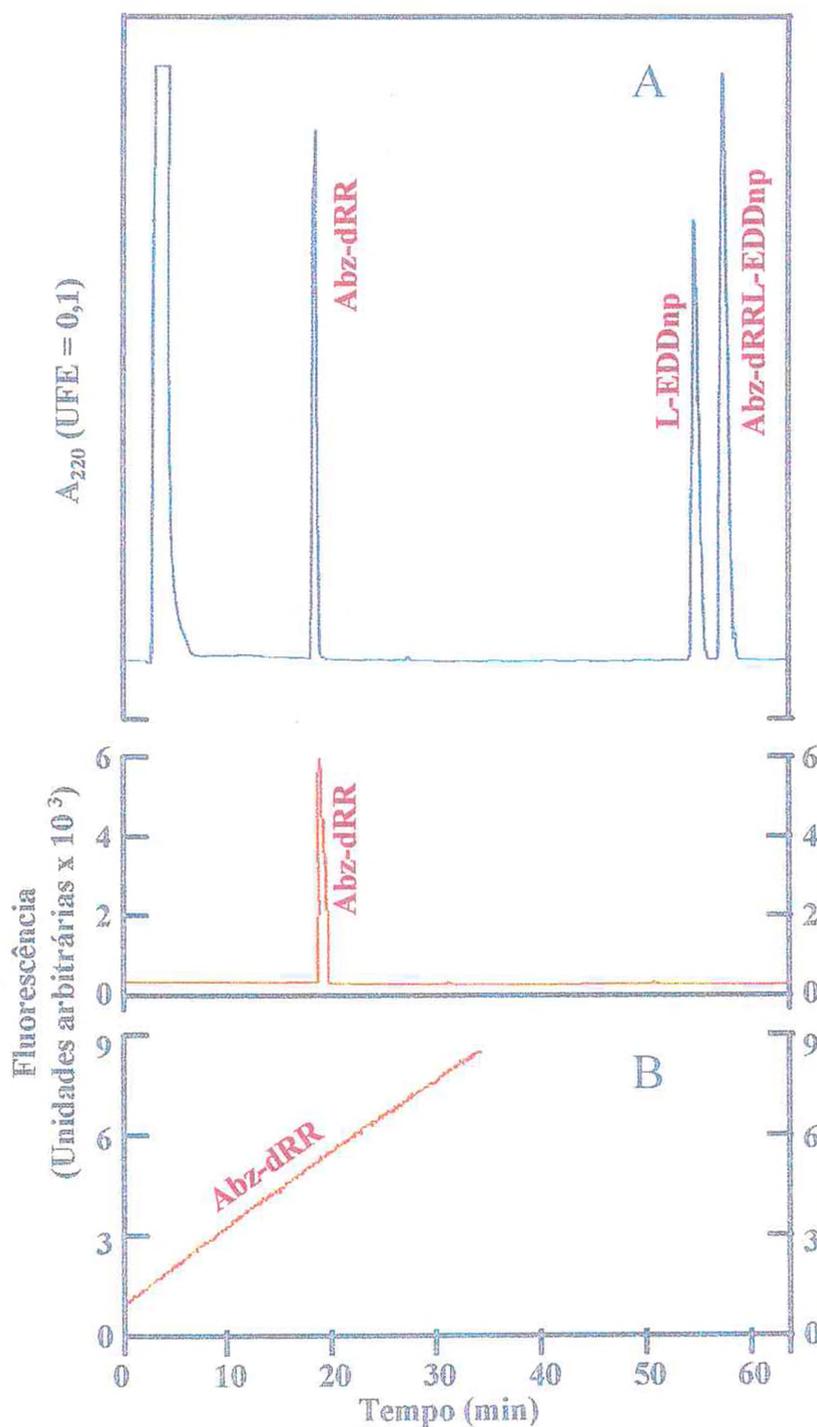


Figura 37 - Perfil de eluição da incubação do Abz-dRRL-EDDnp com NEP purificada do plasma seminal humano na presença de 1  $\mu$ M de captopril (A). Registro da fluorescência contínua da reação do substrato Abz-dRRL-EDDnp com NEP purificada do plasma seminal humano na presença de 1  $\mu$ M de captopril (B).



# Discussão

**ESTUDO DE NOVOS ENSAIOS  
PARA ENDOPEPTIDASE NEUTRA  
(EC 3.4.24.11, NEP, NEPRILISINA)**

**UMA APLICAÇÃO DOS NOVOS ENSAIOS**

A especificidade de substratos para NEP foi estudada utilizando enzimas purificadas do rim de coelho (KERR e KENNY, 1974a e b), de rato (MALFROY e SCHWARTZ et al., 1982), de origem humana (ALMENOFF et al., 1981) e mais recentemente, através da obtenção de uma forma de NEP recombinante (NEPr) solúvel, expressada na superfície de células COS-1 ((LEMAY et al., 1989; FOSSIEZ et al., 1992). Essa forma solúvel de enzima apresenta parâmetros cinéticos semelhantes àqueles obtidos com NEP solubilizada das membranas em borda de escova do rim de coelho (DEVAULT et al., 1987; LEMAY et al., 1989; FOSSIEZ et al., 1992). Portanto, essa forma de NEPr solúvel representa uma importante ferramenta para o estudo estrutural do seu sítio catalítico assim como para fornecer importantes informações a respeito de sua seletividade de substratos. Essa forma de NEPr, foi utilizada no presente estudo.

A atividade da NEP foi inicialmente caracterizada usando o substrato radioativo [<sup>3</sup>H]Leu-encefalina (VOGEL e ALTSTEIN, 1977; LLORENS et al., 1982). Como todas as ligações peptídicas na molécula do substrato eram sensíveis a hidrólise por várias peptidases (SCHWARTZ et al., 1981), e em particular a aminopeptidases, outros substratos mais específicos foram desenvolvidos.

O pentapéptido d-[<sup>3</sup>H]Ala<sup>2</sup>-Leu-encefalina (Y-dA-G-F-L) (**Tabela 10**) foi desenvolvido através da substituição da Gli<sup>2</sup> por uma dAla<sup>2</sup> a qual oferece resistência a ação de aminopeptidases e de dipeptidil aminopeptidases (LLORENS et al., 1982; SCHWARTZ et al., 1982). Embora esse ensaio radioativo tenha vantagens semelhantes àqueles do presente estudo, tais como alta sensibilidade e utilização de peptídeos sintéticos, os quais são bons substratos para a NEP, ele apresenta alguns inconvenientes: a) utilização de material radioativo; b) é um procedimento demorado, pois necessita da separação dos produtos da reação através de colunas cromatográficas; c) tem baixa especificidade e reprodutibilidade

para a NEP, pois os substratos e produtos são susceptíveis à ação de outras enzimas.

A atividade da NEP também tem sido detectada usando uma reação de duas etapas, utilizando ensaios enzimáticos baseados na determinação colorimétrica ou fluorimétrica do composto 2-nitroanilina (2-NA) liberado dos substratos glutaril-A-A-F-2-NA (ALMENOFF et al., 1981) ou benzil-G-R-R-L-2-NA, por ações sucessivas da NEP e da aminopeptidase (ALMENOFF e ORLOWISKY, 1984) (Tabela 10). O primeiro passo da reação é a hidrólise da ligação peptídica interna R-L e R-F respectivamente. O segundo passo é a liberação do grupo 2-NA por ação de aminopeptidase purificada que é adicionada à reação.

Como esses ensaios dependem da atividade de duas enzimas não são obviamente, satisfatórios para o estudo enzimático completo, como por exemplo a interação de subsítios. O ensaio da NEP com esses substratos não permite o registro contínuo da atividade enzimática como ocorre com os experimentos utilizando substratos fluorogênicos. Outras limitações desse método são: a) consome tempo pois é realizado em duas etapas distintas; b) os diferentes graus de pureza da aminopeptidase N, podem alterar a reprodutibilidade do método; e c) em relação ao estudo dos inibidores da NEP, é necessário também controlar a possível inibição da aminopeptidase N.

Os peptídeos fluorogênicos dansil-dA-G-F-(pNO<sub>2</sub>)-G (FLORENTIN et al., 1984) e dansil-G-F-(pNO<sub>2</sub>)-βA (GOUDREAU et al., 1994) têm sido utilizados em ensaios fluorimétricos da NEP, os quais embora sejam semelhantes aos métodos do presente estudo, mostram algumas desvantagens: a intensidade da fluorescência dos produtos enzimáticos são somente 5 a 10 vezes à fluorescência basal dos respectivos substratos, enquanto os resultados do presente estudo, demonstraram

que a intensidade de fluorescência do Abz-GGdFLRRV é cerca de 50 vezes maior que aquela do substrato Abz-GGdFLRRV-EDDnp; os valores da intensidade de fluorescência do fragmento Abz-dRR, Abz-dRR e do Abz-dRR gerados por ação da NEPr sobre os substratos Abz-dRRL-EDDnp, Abz-dRRF-EDDnp e Abz-dRRV-EDDnp foi aproximadamente de 80, 84 e 82 respectivamente. Esse significativo aumento da fluorescência indica o eficiente efeito apagador do grupo N-(2,4-dinitrofenil)-etileno diamino (EDDnp) sobre o grupo fluorescente Abz.

Os valores da constante de especificidade  $k_{cat} / K_m$  dos substratos Dansyl-dA-G-F-(pNO<sub>2</sub>)-G e dansil-G-F-(pNO<sub>2</sub>)-βA (Tabela 10) são aproximadamente 25 vezes menores que o valor daquele do Abz-GGdFLRRV-EDDnp, sugerindo uma eficiente hidrólise do Abz-GGdFLRRV-EDDnp pela NEP. Os substratos Abz-GGdFLRRV-EDDnp, Abz-dRRL-EDDnp, Abz-dRRF-EDDnp e Abz-dRRV-EDDnp apresentaram um baixo  $K_m$ , sugerindo portanto, uma eficiente ligação.

Apesar dos substratos Abz-dRRL-EDDnp, Abz-dRRF-EDDnp e Abz-dRRV-EDDnp apresentarem valor de  $k_{cat} / K_m$  menor que o apresentado pelo Abz-GGdFLRRV-EDDnp, ele é maior que o valor de todos os outros pequenos peptídeos mostrados na tabela 10.

Todos os substratos mostrados na tabela 10, contêm um resíduo hidrofóbico (Leu, Fen ou Val) na posição P'<sub>1</sub>, uma condição essencial para atividade da NEP (ROQUES et al., 1993, SPUNGI-BIALIK et al., 1996). Portanto, os excelentes parâmetros cinéticos dos substratos Abz-dRRL-EDDnp, Abz-dRRF-EDDnp Abz-dRRV-EDDnp e Abz-GGdFLRRV-EDDnp, podem ser explicados pelas interações de seus grupos com os sub-sítios da NEP. Nesses substratos, a presença do grupamento EDDnp na posição P'<sub>2</sub>, pode sugerir uma forte interação com o subsítio S'<sub>2</sub> da NEP.

Substratos	$K_m$ ( $\mu\text{M}$ )	$k_{cat}$ ( $\text{min}^{-1}$ )	$K_{cat} / K_m$ ( $\text{min}^{-1}\mu\text{M}^{-1}$ )	Referências
Abz-dR-R ↓ L-EDDnp	$2,8 \pm 1,5^a$	5,3	2	-
Abz-dR-R ↓ F-EDDnp	$5 \pm 1,5^a$	7	1,4	-
Abz-dR-R ↓ V-EDDnp	$3,7 \pm 1,5^a$	5,1	1,3	-
Abz-R-R ↓ V-EDDnp	$1,8 \pm 1,5^a$	5,6	3,1	-
Abz-G-G-F-L-R-R ↓ V-EDDnp	$17 \pm 1,5^a$	736	43	CARVALHO et al., 1995, 1996
Abz-G-G-dF-L-R-R ↓ V-EDDnp	$3 \pm 2^a$	127	42	CARVALHO et al., 1995, 1996
Y-dA-G ↓ F-L	22	508	23	FOSSIEZ et al, 1992
	19	-	-	MALFROY e SCHWARTZ, 1982
	49	-	-	LLORENS et al., 1982
Glutaryl-A-A ↓ F-2NA	590	592	1	ALMENOFF et al., 1981
Benzyl-G-R-R ↓ L-2NA	180	240	1.3	ALMENOFF e ORLOWISKY, 1984
Dansyl-dA-G ↓ F-(pNO <sub>2</sub> )-G	45	59	1.3	FLORENTIN et al., 1984
Dansyl-G ↓ F-(pNO <sub>2</sub> )-βA	37	68	1.8	GOUDREAU et al., 1994
Suc-A-A ↓ F-NH-Np	76	2.19	0.029	SPUNGIN-BIALIK et al., 1996
Suc-A-A ↓ L-NH-Np	5,1	290	0.017	SPUNGIN-BIALIK et al., 1996
Suc-P-A ↓ F-NH-Np	0.905	50	0.018	SPUNGIN-BIALIK et al., 1996

**Tabela 10** - Comparação entre os parâmetros cinéticos dos ensaios do presente estudo e outros métodos utilizados atualmente para quantificar a atividade da NEP. As setas indicam o ponto de hidrólise.

A **tabela 11** mostra os resultados obtidos da reação quando foram utilizadas NEPr, outras metalo-endopeptidases (ACE e termolisina) e serinoproteases (tripsina e  $\alpha$ -quimotripsina) com Abz-dRRL-EDDnp, Abz-dRRF-EDDnp, Abz-dRRV-EDDnp, Abz-GGdFLRRV-EDDnp, Abz-RRV-EDDnp e outros substratos peptídeos sintéticos usados atualmente nos ensaios para a NEP. Ao contrário de todos os outros substratos presentes na **tabela 11**, somente Abz-dRRL-EDDnp, Abz-dRRF-EDDnp e Abz-dRRV-EDDnp foram totalmente resistentes a ACE, termolisina, tripsina e  $\alpha$ -quimotripsina. A incubação dos substratos Abz-dRRL-EDDnp, Abz-dRRF-EDDnp, Abz-dRRV-EDDnp e Abz-GGdFLRRV-EDDnp com todas as preparações membranares foi totalmente inibida pelo fosforamidon na concentração de 1  $\mu$ M mas não na presença de 1  $\mu$ M de captopril, um potente inibidor da ACE. Esses resultados demonstram a alta resistência desses substratos a outras proteases tissulares.

O peptídeo fluorogênico Abz-GGFLRRV-EDDnp tem sido usado em um ensaio seletivo para a endo-oligopeptidase A (Endo-A, EC 3.4.25.15) uma enzima que inativa vários hormônios-peptídeos (CAMARGO et al., 1985; CAMARGO et al., 1987, JULIANO et al., 1990). A Endo-A hidrolisa esse substrato na ligação L-R. No presente estudo, a incubação desse substrato com fração membranares de rim, foram observados três tipos de clivagem nas seguintes ligações: R-V, L-R e F-L. A presença de 1  $\mu$ M de fosforamidon, um inibidor específico da NEP, inibiu totalmente a hidrólise da ligação R-V. Esses experimentos demonstraram que a ligação R-V foi hidrolisada pela NEP, a ligação L-R foi provavelmente devido a ação da Endo A (JULIANO et al., 1990; CARVALHO et al., 1992; CARVALHO et al., 1996) e a hidrólise da ligação F-L foi por uma atividade ainda desconhecida (CARVALHO et al., 1996). Esses resultados demonstraram que o Abz-GGFLRRV-EDDnp não é um substrato específico para a NEP, não podendo portanto ser utilizado para um ensaio seletivo para essa enzima.

Substratos	Endopeptidase neutra	ACE	Termolisina	Tripsina	Quimotripsina
(1) Abz-dR-R-L-EDDnp	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)
(2) Abz-dR-R-F-EDDnp	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)
(3) Abz-G-G-dF-L-R-R-V-EDDnp	(+)	(-)	(-)	(+)	(-)
(4) Suc-A-A-F-NH-Np	(+)	nd	(+)	nd	nd
(5) Suc-A-A-L-NH-Np	(+)	nd	(+)	nd	nd
(6) Suc-P-A-F-NH-Np	(+)	nd	(+)	nd	nd

**Tabela 11** - Comparação entre os ensaios do presente estudo e outros métodos utilizados atualmente para quantificar a atividade da NEP. [nd = não demonstrado; (+) = substrato hidrolisado; (-)(+) = substrato não hidrolisado]

Estudos já demonstraram que os grupamentos Abz e EDDnp na extremidade amino e carboxiterminal respectivamente, protegem os peptídeos da ação de aminopeptidases, carboxipeptidases assim como da ACE (CARVALHO et al., 1995; CARVALHO et al., 1996). No entanto, esses grupos não protegem os peptídeos contra a ação da termolisina e da tripsina. Os substratos Abz-RRV-EDDnp contendo um resíduo de R na posição P'<sub>2</sub>, foi hidrolisado pela tripsina (Tabela 11). Portanto, a presença de uma dR na posição P'<sub>2</sub> assegurou total proteção aos substratos Abz-dRRL-EDDnp, Abz-dRRF-EDDnp e Abz-dRRV-EDDnp contra a ação da termolisina e tripsina. Finalmente, pode ser sugerido também que o EDDnp assegura total proteção da ligações L-EDDnp, F-EDDnp e V-EDDnp da ação da  $\alpha$ -quimotripsina, desde que não há envolvimento de um aminoácido.

Os peptídeos Suc-p-A-A-F-NH-Np, Suc-p-A-A-L-NH-Np e Suc-p-A-F-NH-Np (SPUNGIN-BIALIK et al., 1996) apresentam especificidade menor ( $k_{cat} / K_m$ ) que todos os outros substratos presentes na tabela 10 e como também observado nessa mesma tabela, esses substratos não são específicos para NEP, desde que foram hidrolisados pela termolisina, ao contrário dos substratos Abz-dRRL-EDDnp, Abz-dRRF-EDDnp e Abz-dRRV-EDDnp.

A atividade da NEP foi determinada em várias frações membranares com o substrato Abz-dRRL-EDDnp: no rim a atividade foi de  $152 \pm 12$  nmol / mg / min (valores da média  $\pm$  desvio padrão de 6 experimentos independentes); no pulmão foi de  $16,7 \pm 1,5$  nmol / mg / min e no cérebro foi de  $2,7 \pm 0,2$  nmol / mg / min. Resultados semelhantes foram obtidos com os substratos Abz-dRRF-EDDnp e Abz-dRRV-EDDnp. As atividades relativas da NEP nesses tecidos foram semelhantes àquelas determinadas por outros métodos já publicados (LLORENS et

al., 1982; SCHWARTZ et al., 1981; FLORENTIN et al., 1984; GOUDREAU et al., 1994).

Apesar do peptídeo fluorogênico com apagamento intramolecular de fluorescência Abz-GGdFLRRV-EDDnp poder ser utilizado para o ensaio rápido, parcialmente seletivo, altamente sensível para NEP (CARVALHO et al., 1995; CARVALHO et al., 1996) e apresentar constantes catalíticas melhores que aquelas dos substratos Abz-dRRL-EDDnp, Abz-dRRF-EDDnp, Abz-dRRV-EDDnp e outros peptídeos sintéticos mostrados na tabela 10 ele foi hidrolisado na ligação R-R pela tripsina, sugerindo que esse substrato pode ser também susceptível a hidrólise por enzimas tripsina-símile presentes em preparações membranares.

Os resultados do presente estudo demonstraram que os peptídeos com apagamento intramolecular de fluorescência, Abz-dRRL-EDDnp, Abz-dRRF-EDDnp, Abz-dRRV-EDDnp são substratos mais **específicos** para a NEP que o substrato Abz-GGdFLRRV-EDDnp (CARVALHO et al., 1995; CARVALHO et al., 1996).

Durante os estudos de novos ensaios para endopeptidase neutra (NEP, EC 3.4.24.11) observou-se a presença de uma atividade no plasma seminal que, semelhante a NEP, hidrolisou o substrato Abz-dRRL-EDDnp na ligação R-L e essa atividade foi totalmente inibida na presença de 1  $\mu$ M de fosforamidon, mas não na presença de 1  $\mu$ M de captopril.

A possibilidade de utilização de ensaios fluorimétrico altamente específico, sensível e rápido permitiu a purificação dessa atividade a aparente homogeneidade.

Após os seqüência de procedimentos cromatográficos convencionais, obteve-se uma purificação de 200 vezes com recuperação de 13,1 para a atividade da NEP purificada do plasma seminal.

Dentro dos critérios clássicos de homogeneidade, foi demonstrado que a enzima migrou com uma única banda em gel de poliacrilamida e quando submetida à eletroforese em condições desnaturantes na presença de SDS, apresentou uma única banda na região entre 66 e 97 kDa. A enzima purificada do plasma seminal apresentou as seguintes propriedades :a) peso molecular em torno de 80.000 D; b) pH ótimo em torno de 7,0; c)  $K_m$  em torno de 6,8  $\mu\text{M}$ ; e d) a enzima foi inibida pelo fosforamidon na concentração de 1  $\mu\text{M}$ .

O presente trabalho demonstrou a presença de uma atividade NEP-símile solúvel no plasma seminal. Essa atividade, após purificada, hidrolisou os substratos fluorogênicos Abz-dRRL-EDDnp na ligação R-L; o substrato Abz-dRRF-EDDnp na ligação R-F e o substrato Abz-dRRV-EDDnp na ligação R-V. A hidrólise desses substratos foi totalmente inibida na presença de 1 $\mu\text{M}$  de fosforamidon e não foi inibida pelo captopril (1  $\mu\text{M}$ ).

Como demonstrado nesse estudo, a única atividade capaz de hidrolisar esses peptídeos foi a NEP, indicando portanto a presença de uma provável forma solúvel de NEP no plasma seminal ou uma forma intimamente relacionada.

Uma forma solúvel de NEP foi **detectada** em vários fluidos biológicos tais como plasma, fluido cérebro espinhal, fluido amniótico (SPILLANTINI et al., 1990) e plasma seminal (ERDOS et al., 1985).

A NEP foi detectada no testículo em baixas concentrações, na próstata e no epidídimo em altas concentrações (ERDOS et al., 1985). A presença dessa enzima no trato genital masculino pode sugerir seu envolvimento em alguma função reprodutiva. Estudos prévios têm sugerido que, enzimas tipo termolisina converte a pró-acrosina em acrosina no espermatozóide e no testículo (MCRORIE et al., 1976), e a NEP pertence a esse grupo de enzimas.

A capacidade de fertilizar do espermatozóide aumenta durante seu trânsito através do epidídimo. Durante esse percurso, o espermatozóide adquire motilidade, modificação estrutural da cromatina nuclear e de organelas da cauda e finalmente perda do remanescente citoplasmático. A elevada concentração de NEP nesses tecidos assim como, na próstata e fluido seminal pode promover todos esses processos (ERDOS et al., 1985).

## CONCLUSÕES

- a) Os resultados do presente trabalho sugerem que substrato Abz-GGdFLRRV-EDDnp, que apresenta parâmetros cinéticos melhores que os substratos Abz-dRRL-EDDnp, Abz-dRRF-EDDnp e Abz-dRRV-EDDnp é mais indicado para os ensaios com NEP, quando se utiliza preparações enzimáticas purificadas.
- b ) Esses resultados demonstram que os substratos Abz-dRRL-EDDnp, Abz-dRRF-EDDnp e Abz-dRRV-EDDnp, os quais apresentam melhor especificidade que o substrato Abz-GGdFLRRV-EDDnp, são mais indicados para os ensaios da atividade da NEP quando se utiliza preparações membranares.
- c ) Através de ensaios com substratos altamente específicos para atividade da NEP, foi detectada uma forma solúvel de NEP ou uma forma intimamente relacionada, no plasma seminal. Essa atividade pode está relacionada com importantes eventos durante o processo de maturação espermática.

O significado funcional de uma forma de NEP solúvel e ligada a membrana é ainda assunto de especulação e requer pesquisas para elucidar o possível papel da NEP em vários fluidos biológicos.

**INFLUÊNCIA DO PAR DE ARGININA  
EM P'<sub>2</sub> E P'<sub>3</sub> NA  
DEGRADAÇÃO FISIOLÓGICA  
DOS PEPTÍDEOS OPIÓIDES**

Baseado nos estudos de seletividade da NEP, a seqüência dos substratos fluorogênicos foi planejada. A endopeptidase neutra hidrolisa preferencialmente ligações peptídicas em resíduos aromáticos na posição P'<sub>1</sub>, sendo os resíduos L ou F os preferidos (ROQUES et al., 1993; SPUNGIN-BIALIK et al., 1996). A enzima mostra uma acentuada preferência por pequenos peptídeos, atuando tanto como uma endopeptidase ou como uma dipeptidil carboxipeptidase, liberando o dipeptídeo carboxi terminal (MALFROY e SCHWARTZ, 1982). Recentemente, através de estudos de sítio de mutagênese dirigida, foi sugerido a presença de dois resíduos de Arg no sítio catalítico da NEP. A Arg<sup>747</sup> provavelmente interagindo com o grupo carbonila do resíduo P'<sub>1</sub> e Arg<sup>102</sup> interagindo com o grupo carboxila do resíduo P'<sub>2</sub> de alguns substratos. A localização dessas duas argininas, proposta por esse estudo, provavelmente explique porque a NEP pode atuar como dipeptidil carboxipeptidase e como uma endopeptidase (BEAUMONT et al., 1991).

Assim atuando como uma dipeptidil carboxipeptidase a NEP quebra a ligação G<sup>3</sup>-F<sup>4</sup> da [Met<sup>5</sup>]-encefalina e da [Leu<sup>5</sup>]-encefalina as quais apresentam o grupo carboxi terminal livre que pode interagir com Arg<sup>102</sup> presente no sítio catalítico da enzima (ERDOS e SKIDGEL., 1989). A NEP também apresenta atividade endopeptidásica hidrolisando a mesma ligação G<sup>3</sup>-F<sup>4</sup> presente na [Met<sup>5</sup>]-encefalina-Arg<sup>6</sup>-Fen<sup>7</sup> e encefalinas (ROQUES et al., 1993).

Como resultado dessa atividade endopeptidásica era de se esperar que a NEPr atuasse na ligação G-F dos seguintes peptídeos sintéticos: Abz-GGFLR-EDDnp, derivado da dinorfina A<sub>1-6</sub> (**Tabela 03**); Abz-GGFLRR-EDDnp e Abz-GGFLRQ-EDDnp derivados da dinorfina A<sub>1-7</sub> (**Tabela 04**) e do peptídeo derivado da dinorfina A, Abz-GGFLRRQ-EDDnp (**Tabela 05**). Como demonstrado por Carvalho e colaboradores (CARVALHO et al., 1996) e no presente estudo, os

Baseado nos estudos de seletividade da NEP, a seqüência dos substratos fluorogênicos foi planejada. A endopeptidase neutra hidrolisa preferencialmente ligações peptídicas em resíduos aromáticos na posição P'<sub>1</sub>, sendo os resíduos L ou F os preferidos (ROQUES et al., 1993; SPUNGIN-BIALIK et al., 1996). A enzima mostra uma acentuada preferência por pequenos peptídeos, atuando tanto como uma endopeptidase ou como uma dipeptidil carboxipeptidase, liberando o dipeptídeo carboxi terminal (MALFROY e SCHWARTZ, 1982). Recentemente, através de estudos de sítio de mutagênese dirigida, foi sugerido a presença de dois resíduos de Arg no sítio catalítico da NEP. A Arg<sup>747</sup> provavelmente interagindo com o grupo carbonila do resíduo P'<sub>1</sub> e Arg<sup>102</sup> interagindo com o grupo carboxila do resíduo P'<sub>2</sub> de alguns substratos. A localização dessas duas argininas, proposta por esse estudo, provavelmente explique porque a NEP pode atuar como dipeptidil carboxipeptidase e como uma endopeptidase (BEAUMONT et al., 1991).

Assim atuando como uma dipeptidil carboxipeptidase a NEP quebra a ligação G<sup>3</sup>-F<sup>4</sup> da [Met<sup>5</sup>]-encefalina e da [Leu<sup>5</sup>]-encefalina as quais apresentam o grupo carboxi terminal livre que pode interagir com Arg<sup>102</sup> presente no sítio catalítico da enzima (ERDOS e SKIDGEL., 1989). A NEP também apresenta atividade endopeptidásica hidrolisando a mesma ligação G<sup>3</sup>-F<sup>4</sup> presente na [Met<sup>5</sup>]-encefalina-Arg<sup>6</sup>-Fen<sup>7</sup> e encefalinas (ROQUES et al., 1993).

Como resultado dessa atividade endopeptidásica era de se esperar que a NEPr atuasse na ligação G-F dos seguintes peptídeos sintéticos: Abz-GGFLR-EDDnp, derivado da dinorfina A<sub>1-6</sub> (**Tabela 03**); Abz-GGFLRR-EDDnp e Abz-GGFLRQ-EDDnp derivados da dinorfina A<sub>1-7</sub> (**Tabela 04**) e do peptídeo derivado da dinorfina A, Abz-GGFLRRQ-EDDnp (**Tabela 05**). Como demonstrado por Carvalho e colaboradores (CARVALHO et al., 1996) e no presente estudo, os

peptídeos sintéticos Abz-GGFLR-EDDnp e Abz-GGFLRR-EDDnp também não foram hidrolisados pela NEPr. Dos peptídeos opióides, apenas a [Met<sup>5</sup>]-encefalina-Arg<sup>6</sup>-Fen<sup>7</sup> e as encefalinas são considerados bons substratos para a NEP, enquanto outros incluindo, dinorfina<sub>1-9</sub>, dinorfina<sub>1-13</sub>, β-endorfina, α-neo-endorfina e β-neo-endorfina são considerados pobres substratos para essa enzima (HERSH, 1984). Apesar desses peptídeos apresentarem em sua estrutura a seqüência da [Met<sup>5</sup>]-encefalina ou da [Leu<sup>5</sup>]-encefalina, (considerados bons substratos para NEP) o motivo da má eficiência catalítica da NEP em clivar a ligação G-F, ainda é desconhecida (HERSH, 1984; ROQUES et al., 1993). Acredita-se que a conformação desses substratos de cadeia longa de alguma forma, possa impedir a eficiência da NEP em reconhecer a ligação G-F (HERSH 1984; ROQUES et al., 1993). Provavelmente alguma alteração conformacional bloqueia a interação da ligação G-F com o sítio catalítico da enzima. (CARVALHO et al., 1996).

Os substratos fluorogênicos contendo a seqüência natural de diversos peptídeos opióides, foram utilizados na tentativa de elucidar porque essas substancias não são bons substratos para a NEP. Os resultados na tabela 2 e 3 demonstram que:

- a) A presença de um aminoácido básico R em P'<sub>2</sub> nos derivados da dinorfina<sub>1-6</sub> impede a hidrólise pela NEPr, enquanto a presença de aminoácido Q em P'<sub>2</sub> origina um ótimo substrato para a NEP.
- b) A presença do par de aminoácidos básicos R-R em P'<sub>2</sub> e P'<sub>3</sub> impede a hidrólise, mas não quando é substituído pelos pares G-Q, S-Q e T-Q.

Esses resultados demonstram que a presença de uma R em P'<sub>2</sub> ou R-R em P'<sub>2</sub> e P'<sub>3</sub>, respectivamente, impedem a hidrólise dos peptídeos opióides fluorogênicos derivados da dinorfina<sub>1-6</sub> e dinorfina<sub>1-7</sub>. Esses resultados são semelhantes àqueles obtidos com os derivados naturais da dinorfina<sub>1-6</sub> e dinorfina<sub>1-7</sub> que também são maus substratos para a NEP (HERSH 1984; ROQUES et al., 1993). Entretanto a substituição das argininas por aminoácidos neutros ou ácidos em P'<sub>2</sub> e P'<sub>3</sub> resultaram em peptídeos que são substratos para a NEP. Os peptídeos contendo aminoácidos ácidos S e T foram mais eficientemente degradados que aquele contendo G, um aminoácido neutro.

A tabela 5 apresentando os peptídeos derivados da dinorfina A demonstram que:

- a) O composto com o par R-R, derivado do peptídeo natural dinorfina A, não foi hidrolisado.
- b) A substituição do par R-R por T-S originou um composto que foi o substrato hidrolisado com maior eficiência catalítica pela NEP dentre os demais da tabela.

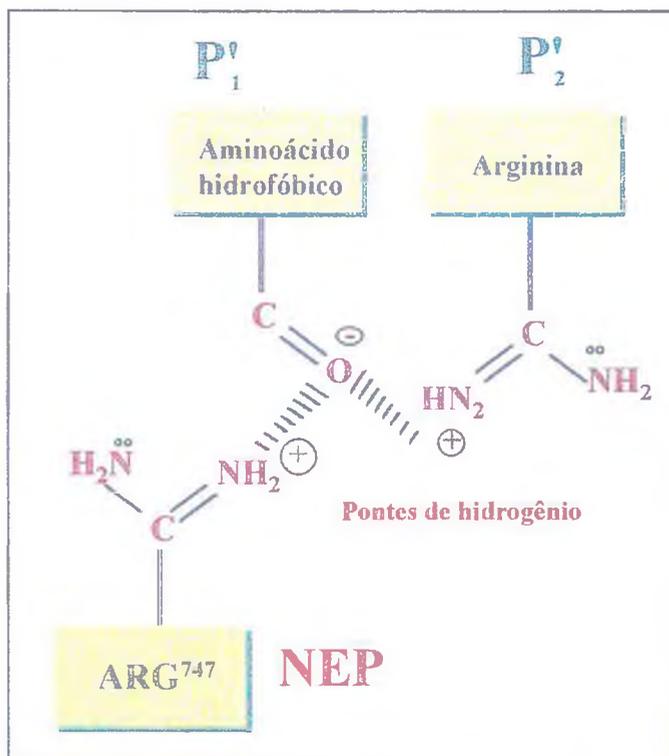
Em resumo, nesses compostos, a presença de dupla R-R em P'<sub>2</sub> e P'<sub>3</sub> impede a hidrólise do peptídeo pela NEP e a presença de uma R em P'<sub>2</sub> ou P'<sub>3</sub> não impede a hidrólise desses compostos, ao contrário dos derivados da dinorfina A<sub>1-6</sub> e dinorfina A<sub>1-7</sub>. Entretanto, observa-se que a presença da dupla de aminoácidos ácidos T-S em P'<sub>2</sub> e P'<sub>3</sub> origina um excelente substrato para a NEP. Assim pode-se concluir que a presença de uma arginina em P'<sub>2</sub> ou P'<sub>3</sub> dificulta a hidrólise desses substratos pela NEP.

---

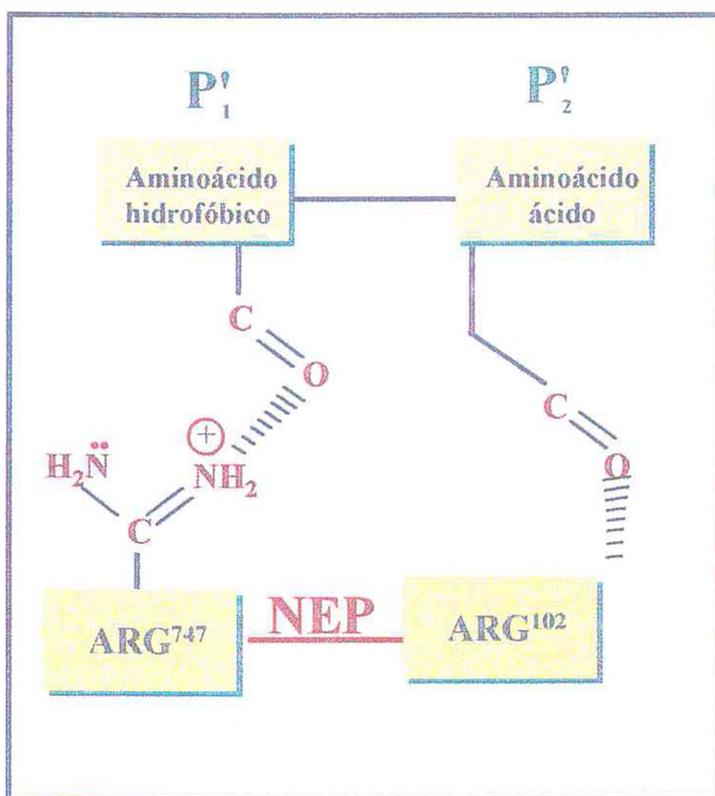
É descrito que Arg<sup>747</sup> presente no sítio catalítico da NEP interage com o grupo carbonilamida do resíduo P<sub>1</sub> (ROQUES et al., 1993). Apresentamos a seguir duas hipóteses que podem explicar esses resultados:

## CONCLUSÕES

- a) Poderia ocorrer uma interação intramolecular entre as argininas em  $P'_1$  e/ou  $P'_2$  com a carbonila do aminoácido em  $P'_1$ , neutralizando a sua carga negativa e impedindo a interação com Arg<sup>747</sup> da NEP; conseqüentemente isso prejudicaria a atividade catalítica da enzima. Um modelo dessa hipótese é ilustrado abaixo:



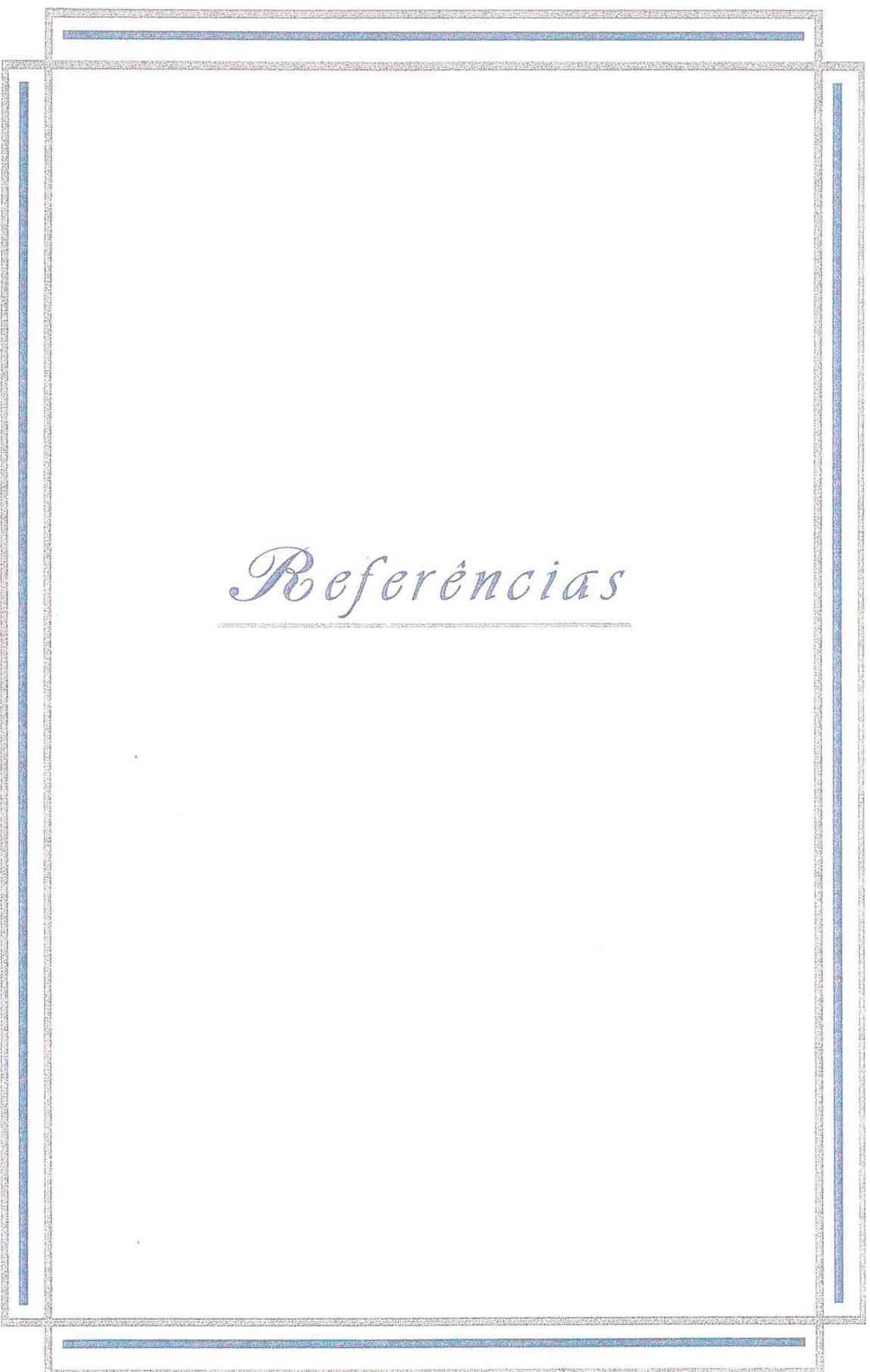
a) A presença do aminoácido ácido em P<sub>1</sub> e/ou P<sub>2</sub> além de não impedir a interação entre a carbonila do aminoácido em P<sub>1</sub> com a Arg<sup>747</sup>, resultaria em uma interação complementar com a Arg<sup>102</sup>, que normalmente liga-se ao grupamento carboxila livre em P<sub>2</sub>, facilitando a ação da NEP. Um modelo dessa segunda hipótese é ilustrado abaixo:



A grande maioria dos peptídeos que contém encefalinas apresentam uma dupla de aminoácidos básicos (**Figura 05**). Esses peptídeos estariam naturalmente protegidos da ação catalítica da NEP por provavelmente, dois motivos possíveis:

- a) Os peptídeos contendo encefalinas não seriam apenas precursores das encefalinas, mas apresentariam também ações fisiológicas próprias. A NEP não seria então, a enzima de degradação fisiológica desses peptídeos contendo encefalinas;
- b) Os precursores desses peptídeos contendo encefalinas deveriam estar protegidos da ação da NEP até a formação das encefalinas. Esse fenômeno aumentaria o rendimento da biossíntese desses peptídeos.

Uma comprovação final dessas observações, seria o estudo através do sítio de mutagenese dirigida com a substituição da Arg<sup>747</sup> e Arg<sup>102</sup>, por outros aminoácidos básicos, como His ou Lis e comparar a interação dessa forma de NEP mutante com uma forma ativa.



# *Referências*

---

- ALMENOFF, J.; ORLOWISKY, M. Biochemical and immunological properties of a membrane-bound brain metalloendopeptidase: comparison with thermolysin-like kidney neutral metalloendopeptidase. *J. Neurochem.* 42: 151-157, 1984.
- ALMENOFF, J.; WILK, S.; ORLOWISKY, M. Membrane bound pituitary metalloendopeptidase: apparent identity to enkephalinase. *Biochem. Biophys. Res. Comum.* 102: 206-214, 1981.
- ANAND-SRIVASTAVA, M. B.; TRACHITE, G. J. Atrial natriuretic factor receptors and signal transduction mechanisms. *Pharmacol. Rev.* 45: 455- 97, 1993.
- ANDERSON R. A.; FEATHERGILL, K. A.; DRISDEL, R. C.; RAWLINS, R. G.; MAACK, S. R.; ZANEVELD, L. J. Atrial natriuretic peptide (ANP) as a stimulus of the human acrosome reaction and a component of ovarian follicular fluid: correlation of follicular ANP content with in vitro fertilization outcome. *J. Androl.* 15: 61-70, 1994.
- ANDERSON, R. A.; FEATHERGILL, K. A.; RAWLINS, R. G.; MACK, S. R.; ZANEVELD, L. J. Atrial natriuretic peptide: a chemoattractant of human spermatozoa by a guanylate cyclase-dependent pathway. *Mol. Reprod. Dev.* 40: 371-78, 1995.
- BARNETT, R.; ORTIZ, P. A.; BLAUFOX, S.; NORD, E. P.; RAMSAMMY, L. Atrial natriuretic factor alters phospholipid metabolism in mesangial cells. *Am. J. Physiol.* 258: C37-C45, 1990.

- BATEMAN, R. C. JR.; HERSH, L. B. Evidence for an essential histidine in neutral endopeptidase 24.11. *Biochemistry* 26: 4237-42, 1987.
- BATEMAN, R. C.; YOUNG, A. E.; SLAUGHTER, C.; HERSH, L. B. N-bromo-acetyl-D-leucylglycine: an affinity label for neutral endopeptidase 24:11. *J. Biol. Chem.* 265:8365-8368, 1990.
- BATEMAN, R. C. JR.; JACKSON, D.; SLAUGHTER, C. A.; UNNITHAN, S.; CHAI, Y. G.; MOOMAW, C.; HERSH, L. B. Identification of the active site origin in neutral endopeptidase 24.11 (enkephalinase) as Arg 102 and analysis of a glutamine 102 mutant. *J. Biol. Chem.* 264:6151-57, 1989.
- BEAUMONT, A., LE-MOUAL, H., BOILEAU, G., CRINE, P.; ROQUES, B. P. Evidence that both arginine<sup>102</sup> and arginine<sup>747</sup> are involved in substrate binding to neutral endopeptidase (EC 3.4.24.11). *J. Biol. Chem.* 266: 214-20, 1991.
- BEAUMONT, A.; ROQUES, B. P. Presence of a histidine at the active site of the neutral endopeptidase-24.11. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 139: 733-739, 1986.
- BENCHETRIT, T.; BISSERY, V.; MORNON, J. P.; DEVAULT, A.; CRINE, P.; ROQUES, B. P. Primary structure homologies between two Zn-metallopeptidases, the neutral endopeptidase 24.11 enkephalinase and the thermolysin through clustering. *Biochemistry* 27:592-597, 1988.

- BHoola, K. D.; Figueroa, C. D.; Worthy, K.** Bioregulation of kinins: kallikreins, kininogens, and kininases. *Pharmacol. Rev.* 44: 1-80, 1992.
- Bloom, F. E.; Battenberg, E.; Rossier, L.; Ling, N.; Guillemin, R.** Neurons containing  $\beta$ -endorphin in rat brain exist separately from those containing enkephalin: immunocytochemical studies. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*. 75: 1591-95, 1978.
- Boitani, C.; Farini, D.; Canipari, R.; Bardin, C. W.** Estradiol and plasminogen activator secretion by cultured rat Sertoli cells in response to melanocyte-stimulating hormones. *J. Androl.* 10: 202-09, 1989.
- Bolch, K. D.; Scott, J. A.; Zisfein, J. B.; Fallon, J. T.; Margolies, M. N.; Seidman, C. E.; Matsueda, G. R.; Homcy, C. J.; Graham, R. M.; Seidman, J. C.** Biosynthesis and secretion of proatrial natriuretic factor by culture rat cardiocytes. *Science* 230: 1168- 1171, 1985.
- Bradford, M. M.** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-54, 1976.

- BRALET, J.; MARIE, C.; MOSSIAT, C.; LECOMTE, J. M.; GROS, C.; SCHWARTZ, J. C. Effects of alatriopril, a mixed inhibitor of atriopeptidase and angiotensin I-converting enzyme, on cardiac hypertrophy and hormonal responses in rats with myocardial infarction. Comparison with captopril. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 270: 8-14, 1994.
- BUMPUS, F. M.; CATT, K. J.; CHIU, A. T.; DEGASPARO, M.; GOODFRIEND, T.; HUSAIN, A.; PEACH, M. J.; TAYLOR, D. G.; TIMMERMANS, P. B. Nomenclature for angiotensin receptors. A report of the nomenclature committee of the council for high blood pressure research. *Hypertension* 17: 720-21, 1991.
- BURCH, R. M.; KYLE, D. J. Recent developments in the understanding of bradykinin receptors. *Life Sci.* 50: 829-38, 1992.
- BUSSE, R.; LAMONTAGNE, D. Endothelium-derived bradykinin is responsible for the increase in calcium produced by angiotensin-converting enzyme inhibitors in human endothelial cells. *Naunyn. Schmiedebergs. Arch. Pharmacol.* 344: 1991.
- CAMARÃO, G. C. Purificação e caracterização de um complexo protéico multicatalítico do exsudato da pele do *Xenopus laevis*. *Tese de Doutorado*, Escola Paulista de Medicina, Universidade Federal do Ceará, 1995.

- CAMARGO, A. C.; RIBEIRO, M. J.; SCHWARTZ, W. N. Conversion and inactivation of opioid peptides by rabbit brain endo-oligopeptidase A. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 130(2): 932-8, 1985.
- CAMARGO, A. C.; OLIVEIRA, E. B.; TOFFOLETTO, O.; METTERS, K. M. ROSSIER, J. Brain endo-oligopeptidase A, a putative enkephalin converting enzyme. *J. Neurochem.* 48: 1258-63, 1987.
- CAMARGO, A. C.; SHAPANKA, R.; GREENE, L. J. Preparation, assay, and partial characterization of a neutral endopeptidase from rabbit brain. *Biochemistry* 12: 1838-44, 1973.
- CAMPBELL, D. J.; KLADIS, A.; AND DUNCAN, A. M. Bradykinin peptides in kidney, blood, and other tissues of the rat. *Hypertension* 21: 155-165, 1993.
- CANTI, M.; GENEST, J. The heart and the atrial natriuretic factor. *Endocr. Rev.* 6: 107-126, 1985.
- CARRETERO, O. A.; CARBINI, L.; SCICLI, A. G. The molecular biology of the kallikrein-kinin system: I. General description, nomenclature and the mouse gene family. *J. Hypertens.* 11: 693-97, 1993.

- CARVALHO, K. M.; DE-LAURENZI, V.; MELINO, G.; COHEN, P. Human neuroblastoma cells express a novel metallo-endopeptidase activity able to inactivate atrial natriuretic factor: inhibition during retinoic acid-induced differentiation. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 26: 1181-86, 1993.
- CARVALHO, K. M.; JOUDIQU, C.; BOUSSETA, H.; LESENEY, A. M.; COHEN, P. A peptide-hormone-inactivating endopeptidase in *Xenopus laevis* skin secretion. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 89: 84-88 1992.
- CARVALHO, K. M.; BOILEAU, G.; CAMARGO, A. C. M.; JULIANO, L. A highly selective assay for neutral endopeptidase based on the cleavage of a fluorogenic substrate related to leu-enkephalin. *Anal. Biochem.* 237: 167-73, 1996.
- CARVALHO, K. M.; BOILEAU, G.; FRANÇA, M. S. F.; MEDEIROS, M. A. S.; CAMARGO, A. C. M.; JULIANO, L. A new fluorimetric assay for neutral endopeptidase (EC 3.4.24.11). *Braz. J. Med. Biol. Res.* 28: 1055-59, 1995.
- CASALE, L.; CARDOZO, C.; KALB, T.; LESSER, M. Quantitation of endopeptidase 24.11 and endopeptidase 24.15 in human blood leukocytes. *Enzyme Protein.* 48: 143-8, 1994.
- CIVELLI, O.; DOUGLAS, J.; HERBERT, E. Pro-opiomelanocortin: a polyprotein at the interface of the endocrine and nervous systems. In: GROSS, & MEIENHOFER, J. (Eds.) *The Peptides*. New York Academic Press, V. 6, p. 69-94, 1984.

- COCHET, M.; CHANG, A. C. Y.; COHEN, S. N. Characterization of the structural gene and putative 5'-regulatory sequences for human proopiomelanocortin. *Nature* (London) 297: 335-39 1982.
- COMB, M.; HERBERT, E.; CREA, R. Partial characterization of the mRNA that codes for enkephalins in bovine adrenal medulla and human pheochromocytoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*. 79: 360-64, 1982a.
- COMB, M.; SEEBURG, P. H.; ADELMAN, J.; EIDEN, L.; HERBERT, E. Primary structure of the human Met- and Leu-enkephalin precursor and its mRNA. *Nature* 295: 663-66, 1982b.
- CONNELLY, J. C.; SKIDGEL, R. A.; SCHULZ, W. W.; JOHNSON, A. R.; ERDOS, E. G. Neutral endopeptidase 24-11 in human neutrophil: cleavage of chemotactic peptide. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 82: 8737-41, 1985.
- COX, B. M.; OPHEIM, K. E.; TESCHEMACHER, H.; GOLDSTEIN, A. A peptide-like substance from pituitary that acts like morphine: 2 Purification and properties. *Life Sci.* 16: 1777-82, 1975.
- CHAGAS, J. R.; JULIANO, L.; PRADO, E. S. Intramolecularly quenched fluorogenic tetrapeptide substrates for tissue and plasma kallikreins. *Anal. Biochem.* 192: 419-25, 1990.

- CHAN, J. S.; CHIU, T. T.; WONG, Y. H. Activation of type II adenylyl cyclase by the cloned mu-opioid receptor: coupling to multiple G proteins. *J. Neurochem.* 65: 2682-89, 1995.
- CHANG, M. S.; LOWE, D. G.; LEWIS, M.; HELLMISS, R.; CHEN, E.; GOEDEL, D. V. Differential activation by atrial and brain natriuretic peptides of two different receptor guanylate cyclases. *Nature* 341: 68-72, 1989.
- CHECLER, F.; VINCENT, J. P.; KITABGI, P. Degradation of neurotensin b rat brain synaptic membranes: involvement of thermolysin like metalloendopeptidase (enkephalinase), angiotensin converting enzyme, and other unidentified peptidases. *J. Neurochem.* 41: 375-384, 1983.
- CHINKERS, M.; GARBERS, D. L. Signal transduction by guanylyl cyclases. *Annu. Rev. Biochem.* 60: 553-575, 1991.
- CHIU, P. J.; TETZLOFF, G.; ROMANO, M. T.; FOSTER, C. J.; SYBERTZ, E. J. Influence of C-ANF receptor and neutral endopeptidase on pharmacokinetics of ANF in rats. *Am. J. Physiol.* 260: R208-16, 1991.
- CRAVES, F. B.; LAW, P. Y.; HUNT, C. A.; LOH, H. H. The metabolic disposition of radiolabeled enkephalins in vitro and in situ. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 206: 492-506, 1978.

- CUSHMAN, D. W.; CHEUNG, H. S.; SABO, E. F.; ONDETTI, M. A.  
Design of potent competitive inhibitors of angiotensin converting enzyme Carboxyalkanoyl and mecaptoalkanoyl amino acids. *Biochemistry* 16: 5484-5491, 1977.
- DANIELSEN, E. M.; VYAS, J. P.; KENNY, A. J. A neutral endopeptidase in the microvillar membrane of pig intestine. Partial purification and properties. *Biochem. J.* 191: 645-8, 1980
- DAY, M. L.; SCHWARTZ, D.; WIEGAND, R. C.; STOCKMAN, P. T.; BRUNNERT, S. R.; TOLUNAY, H. E.; CURRIE, M. G.; STANDAERT, D. G.; NEEDLEMAN, P. Ventricular atriopeptin. Unmasking of messenger RNA and peptide synthesis by hypertrophy or dexamethasone. *Hypertension* 9: 485-91, 1987.
- DE-BOLD, A. J.; BORENSTEIN, H. B.; VERESS, A. T.; SONNENBERG, H. A rapid and potent natriuretic response to intravenous injection of atrial myocardial extract in rats. *Life Sci.* 281: 89-94, 1981.
- DELPORTE, C.; CARVALHO, K. M.; LESENEY, A. M.; WINAND, J.; CHRISTOPHE, J.; COHEN, P. A new metallo-endopeptidase from human neuroblastoma NB-OK-1 cells which inactivates atrial natriuretic peptide by selective cleavage at the Ser123-Phe124 bond. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 182: 158-64, 1992.

- DEVAULT, A.; LAZURE, C.; NAULT, C.; LE MOUAL, H.; SEIDAH, N. G.; CHRETIEN, M.; KAHN, P.; POWELL, J.; MALLET, J.; BEAUMONT, A.; ROQUES, B. P.; CRINE, P.; BOILEAU, C. Amino acid sequence of rabbit kidney neutral endopeptidase 24.11 (enkephalinase) deduced from a complementary DNA. *EMBO J.* 6:1317-22, 1987.
- DEVAULT, A.; NAULT, C.; ZOLLINGER, M.; FOURNIÉ-ZALUSKI, M. C.; ROQUES, B. P.; CRINE, P.; BOILEAU, G. Expression of neutral endopeptidase (enkephalinase) in heterologous cos-1 cells: characterization of the recombinant enzyme and the evidence for the glutamic acid residue at the active site. *L. Biol. Chem.* 263:4033-4040, 1988b.
- DEVAULT, A.; SALES, A.; NAULT, C.; BEAUMONT, A.; ROQUES, B. P.; CRINE, P.; BOILEAU, G. Exploration of the catalytic site of endopeptidase 24-11 by site-directed mutagenesis. Histidine residues 583 and 587 are essential for catalysis. *FEBS Lett.* 231:54-58, 1988a.
- DHAWAN, B. N.; CESSÉLIN, F.; RAGHUBIR, R.; REISINE, T.; BRADLEY, P. B.; PORTOGHESE, P. S.; HAMON, M. International Union of Pharmacology. XII. Classification of opioid receptors. *Pharmacol. Rev.* 48: 567-92, 1996.
- DORER, F. E.; SKEGGS, L. T.; KAHN, J. R.; LENTZ, K. E.; LEVINE, M. Angiotensin converting enzyme: method of assay and partial purification. *Anal. Biochem.* 33: 102-3, 1970.

- DURIEUX, C.; CHARPENTIER, B.; PELAPRAT, D.; ROQUES, B. P. Investigation on the metabolism of CCK<sub>8</sub> analogues by brain slices. *Neuropeptides* 7: 1-9, 1986.
- ERDOS, E. G.; SCHULZ, W. W.; GAFFORD, J. T. Defendini-R Neutral metalloendopeptidase in human male genital tract. Comparison to angiotensin I-converting enzyme. *Lab. Invest.* 52: 437-47, 1985.
- ERDOS, E. G. Some old and some new ideas on kinin metabolism. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 15: 520-24, 1990.
- ERDOS, E. G.; SKIDGEL, R. A. Neutral endopeptidase 24.11 (enkephalinase) and related regulators of peptide hormones. *FASEB J.* 3: 145-151, 1989.
- ERSPAMER, V.; MELCHIORRI, P.; ERSPAMER, G.; NEGRI, L.; CORSI, R.; SEVERINI, C.; BARRA, D.; SIMMACO, M.; KREIL, G. Deltorphins: a family of naturally occurring peptides with high affinity and selectivity for  $\xi$  opioid binding sites. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 5188-192, 1989.
- EVANS, E. T.; KEITH, D. E. JR.; MORRISON, H.; MAGENDZO, K.; EDWARDS, R. H. Cloning and a delta opioid receptor by functional expression. *Science* (Wash. DC), 258: 1952-55, 1992.
- FAGNY, C.; MICHEL, A.; LEONARD, I.; BERKENBOOM, G.; FONTAINE, J.; DESCHOD, T.; LANCKMAN, M. In vitro degradation of endothelin-1 by endopeptidase 24.11 (enkephalinase). *Peptides* 12: 773-778, 1991.

- FLORENTIN, D.; SASSI, A.; ROQUES, B. P. A highly sensitive fluorogenic assay for "enkephalinase", a neutral metalloendopeptidase that releases tyrosin-glycine-glycine from enkephalins. *Anal. Biochem.* 141: 62-69, 1984.
- FONTELES, M. C.; VILLAR-PALASI, C.; FANG, G.; LARNER, J.; GUERRANT, R. L. Partial characterization of an ANF/urodilatin-like substance released from perfused rabbit kidney under hypoxia. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 26: 75-9, 1993.
- FOSSIEZ, F.; LEMAY, G.; LABONTÉ, N.; PARMENTIER-LESAGE, F.; BOILEAU, G.; CRINE, P. Secretion of a functional form of neutral endopeptidase-24.11 from a baculovirus-infected insected cell line. *Biochem. J.* 284: 53-59, 1992.
- FULCHER, I. S.; CHAPLIN, M. F.; KENNY, A. J. Endopeptidase-24.11 purified from pig intestine is differently glycosylated from that in kidney. *Biochem. J.* 215: 317-23, 1983.
- GENEST, J.; CANTI, M. The atrial natriuretic factor, its physiology and biochemistry. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* 110: 141-45, 1985.
- GOLDSTEIN, A.; TACHIBANA, S.; LONEY, L.; HUNKAPILLER, M.; HOOD, L. Dynorphine-(1-13), an extraordinarily potent opioid peptide. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*. 76: 6666-6670, 1979.

- GOLDSTEIN, A.** Biology and Chemistry of the dynorphin peptides. In: UNDERFRIENDS, S., MEIENHOFER, J. (Eds.). *The Peptides: analysis, synthesis, biology*. New York Academic Press, 1984. Cap 3, v. 6, p. 106.
- GOLDSTEIN, A.; FISCHL, W.; LONEY, L. I.; HUNKAPILLER, M.; HOOD, L.** Porcine pituitary dynorphine: complete amino acid sequence of the biologically active heptadecapeptide. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*. 78: 7219-223, 1981.
- GOUDREAU, N.; GUI, C.; SOLEILHAC, J. M.; ROQUES, B. P.** Dns-Gly-(p-NO<sub>2</sub>)Phe-beta Ala, a specific fluorogenic substrate for neutral endopeptidase 24.11. *Anal. Biochem.* 219: 87-95, 1994.
- GREVEL, J.; YU, V.; SADEE, W.** Characterization of a labile naloxone binding site ( $\lambda$  site) in rat brain. *J. Neurochem.* 44: 1647-56, 1985.
- GROS, C.; SOUQUE, A.; SCHWARTZ, J. C.; DUCHIER, J.; COURNOT, A.; BAUMER, P.; LECOMET, J. M.** Protection of atrial natriuretic factor against degradation, diuretic and natriuretic responses after in vivo inhibition of enkephalinase (EC 3.4.24.11) by acetorphan. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86, 7580-7584, 1989.
- GROS, C.; SOUQUE, A.; SCHWARTZ, J. C.** Degradation of atrial natriuretic factor in mouse blood in vitro and in vivo: role of enkephalinase (EC 3.4.24.11). *Neuropeptides* 17: 1-5, 1990.

- GROS, C.; NOEL, N.; SOUQUE, A.; SCHWARTZ, J. C.; DANVY, D.; PLAQUEVENT, J. C.; DUHAMEL, L.; DUHAMEL, P.; LECOMTE, J. M.; BRALET, J. Mixed inhibitors of angiotensin-converting enzyme (EC 3.4.15.1) and enkephalinase (EC 3.4.24.11): rational design, properties, and potential cardiovascular applications of glycopril and alatriopril. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 4210-4, 1991.
- GUBLER U.; SEEBURG P.; HOFFMAN B. J.; GAGE L. P.; UDENFRIEND S. Molecular cloning establishes proenkephalin as precursor of enkephalin-containing peptides. *Nature* 295: 206-08, 1982.
- HANGAUER, D. G.; MONZINGO, A. F.; MATHEWS, B. W. Na interactive computer graphics study of thermolysin-catalyzed peptide cleavage and inhibition by N-carboxymethyl dipeptides. *Biochemistry* 23: 5730-5741, 1984.
- HERSH, L. B. Reaction of opioides with neutral endopeptidase ("Enkephalinase"). *J. Neurochem.* 43: 487-493, 1984.
- HUGHES, J.; SMITH, T. W.; KOSTERLITZ, H. W.; FORTHERGILL, L. A.; MORGAN, B. A.; MORRIS, H. R. Identification of two related pentapeptides from the brain with potent agonistic activity. *Nature* 258, 577-79, 1975.

- HUPE-SODMANN, K.; MCGREGOR, G. P.; BRIDENBAUGH, R.; GOKE, R.; GOKE, B.; THOLE, H.; ZIMMERMANN, B.; VOIGT, K. Characterisation of the processing by human neutral endopeptidase 24.11 of GLP-1(7-36) amide and comparison of the substrate specificity of the enzyme for other glucagon-like peptides. *Regul. Pept.* 58: 149-56, 1995.
- ISHIMARU, F.; MARI, B.; SHIPP, M. A. The type 2 CD10/neutral endopeptidase 24.11 promoter: functional characterization and tissue-specific regulation by CBF/NF-Y isoforms. *Blood* 89: 4136-45, 1997.
- JOHNSON, A. R.; SKIDGEL, R. A.; GAFFORD, J. T.; ERDOS, E. G. Enzymes in placental microvilli: angiotensin I converting enzyme, angiotensinase A, carboxipeptidase and neutral endopeptidase (enkephalinase ?). *Peptides* 5: 789-96, 1984.
- JOHNSON, A. R.; ASHTON, J.; SCHULTZ, W. W.; ERDOS, E. G. Neutral metallopeptidase in human lung tissue and cultured cells. *Am. Rev. Respir. Dis.* 132: 564-568, 1985.
- JONES, B. N.; STERN, A. S.; LEWIS, R. V.; KIMURA, S.; STEIN, S.; UDENFRIEND, S.; SHIVELY, J. E. Structure of two adrenal polypeptides containing multiple enkephalin sequences. *Arch. Biochem. Biophys.* 204: 392-95, 1980.

- JULIANO, L.; CHAGAS, J. R.; HIRATA, I. Y.; CARMONA, E.; SUCUPIRA, M.; OLIVEIRA, E. S.; CAMARGO, A. C. M. A selective assay for endopeptidase A based on the cleavage of fluorogenic substrate structurally related to enkephalin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 173: 647-52, 1990.
- KAKIDANI, H.; FURUTANI, Y.; TAKAHASHI, H.; NODA, M.; MORIMOTO, Y.; HIROSE, T.; ASASI, M.; INAYAMA, S.; NAKANISHI, S.; NUMA, S. Cloning and sequence analysis of cDNA for porcine beta-neoendorphin / dynorphin precursor. *Nature* 298: 245-49, 1982.
- KANGAWA, K.; TAWARAGI, Y.; OIKAWA, S.; MIZUNO, A.; SAKURAGAWA, Y.; NAKAZOTO, H.; FUKUDA, A.; MINAMINO, N.; MATSUO, H. Identification of rat gamma Atrial natriuretic polypeptide and characterization of the cDNA encoding its precursor. *Nature* 312: 152 -94, 1984c.
- KENNY, A. J.; FULCHER, I. S. Microvillar endopeptidase, an enzyme with special topological features and a wide distribution. *Ciba. Found. Symp.* 95: 12-33, 1983.
- KERR, M. A.; KENNY, A. J. The molecular weight and properties of a neutral metallo-endopeptidase from rabbit kidney brush border. *Biochem. J.* 137: 489-95, 1974a.

- KERR, M. A.; KENNY, A. J. The purification and specificity of a neutral endopeptidase from rabbit kidney brush border. *Biochem J.* 137: 477-88, 1974b.
- KIEFFER, B.; BEFORT, K.; GAVERIAUX-RUFF, C.; HIRT, C. G. The delta opioid receptor: isolation of a cDNA by expression cloning and pharmacological characterization. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 89: 12048 -12052, 1995.
- KILPATRICK D. L.; TANIGUCHI T.; JONES B. N.; STERN A. S.; SHIVELY J. E.; HULLIHAN J.; KIMURA S.; STEIN S.; UDENFRIEND S. A highly potent 3200-dalton adrenal opioid peptide that contains both a [Met]- and [Leu]enkephalin sequence. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 78: 3265-68, 1981a.
- KILPATRICK, D. L.; JONES, B. N.; KOJIMA, K.; UDENFRIEND, S. Identification of the octapeptide [Met]enkephalin -Arg6-Gly7-Leu8 in extracts of bovine adrenal medulla. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 103: 698-705, 1981b.
- KIM, S. H.; CHO, K. W.; LIM, S. H.; HWANG, Y. H.; RYU, H.; OH, S. H.; SEUL, K. H.; JEONG, G. B.; YOON, S. Presence and release of immunoreactive atrial natriuretic peptide in granulosa cells of the pig ovarian follicle. *Regul. Pept.* 42: 153-162, 1992.
- KIM, S. H.; CHO, K. W.; OH, S. H.; HWANG, Y. H.; LIM, S. H.; RYU, H.; SEUL, K. H.; JEONG, G. B.; YOON, S. Immunoreactive atrial natriuretic peptides in the oocyte. *Comp. Biochem. Physiol.* 104: 219-23, 1993.

- KIM, Y. A.; SHRIVER, B.; HERSH, L. B.** Mutational analysis reveals only one catalytic histidine in neutral endopeptidase ("enkephalinase"). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 184: 883-887, 1992a.
- KIMURA, S.; LEWIS, R. V.; STERN A. S.; ROSSIER, J.; STEIN, S.; UDENFRIEND, S.** Probable precursor of (leu)-enkephalin and (met)-enkephalin in adrenal medulla: peptides of 3-5 kilodaltons. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*. 77: 1681-85, 1980.
- KOLLER, K. J.; LOWE, D. G.; BENNETT, G. L.; MINAMINO, N.; KANGAWA, K.; MATSUO, H.; GOEDEL, D. V.** Selective activation of the B natriuretic peptide receptor by C-type natriuretic peptide (CNP). *Science* 5002: 120-123, 1991.
- KUKKONEN, P.; VUOLTEENAHO, O.; RUSKOAHO, H.** Basal and volume expansion-stimulated plasma atrial natriuretic peptide concentrations and hemodynamics in conscious rats: effects of SCH 39.370, an endopeptidase inhibitor, and C-ANF-(4-23), a clearance receptor ligand. *Endocrinology* 130: 755-65, 1992.
- LANG, R. E.; THOLKEN, H.; GANTEN, D.; LUFT, F. C.; RUSKOAHO, H.; UNGER, T.** Atrial natriuretic factor - a circulating hormone stimulated by volume loading. *Nature* 314: 264-66, 1985.
- LAZARUS, L. H.; BRYANT, S. D.; ATTILA, M.; SALVADORI, S.** Frog skin opioid peptides: a case for environmental mimicry. *Environ. Health Perspect.* 102: 648-54, 1994.

- LEE, M. A.; BOHM, M.; KIM, S.; BACHMANN, S.; BACHMANN, J.; BADER, M.; GANTEN, D. Differential gene expression of renin and angiotensinogen in the TGR(mREN-2)<sup>27</sup> transgenic rat. *Hypertension*. 25: 570-80, 1995.
- LEMAY, G.; WAKSMAN, G.; ROQUES, B. P.; CRINE, P.; BOILEAU, G. Fusion of a cleavable signal peptide to the ectodomain of neutral endopeptidase (EC 3.4.24.11) results in the secretion of an active enzyme in COS-1 cells. *J. Biol. Chem.* 264: 15620-623, 1989.
- LE MOUAL, H.; DEVAULT, A.; ROQUES, B. P.; CRINE, P.; BOILEAU, G. Identification of glutamate acid 646 as a zinc-coordinating residue in endopeptidase-24.11. *J. Biol. Chem.* 266: 15670-15674, 1991.
- LETARTE, M.; VERA, S.; TRAN, R.; ADDIS, J. B.; ONIZUKA, R. J.; QUACKENBUSH, E. J.; JONGENEEL, C. V.; MCINNES, R. R. Common acute lymphocytic leukemia antigen is identical to neutral endopeptidase. *J. Exp. Med.* 168:1247-1253, 1988.
- LEWIS, R. V.; STERN, A. S.; KIMURA, S.; ROSSIER, J.; STEIN, S.; UDENFRIEND, S. An about 50000-dalton protein in adrenal medulla: a common precursor of (met)- and (leu)-enkephalin. *Science* 208: 1459-61, 1980.
- LEWIS, R. V.; STERN, A. S.; ROSSIER, J.; STEIN, S.; UDENFRIEND, S. Putative enkephalin precursors in bovine adrenal medulla. *Biochem. Biophys. Commun.* 89: 822-29, 1979.

- LI, C. H.; CHUNG, D. Isolation and structure of an untriakontapeptide with opiate activity from camel pituitary glands. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 73: 1145-1148, 1976.
- LINZ, W.; WIEMER, G.; GOHLKE, P.; UNGER, T.; SCHOLKENS, B. A. Contribution of kinins to the cardiovascular actions of angiotensin-converting enzyme inhibitors. *Pharmacol. Rev.* 47: 25-49, 1995.
- LORD, L. A. H.; WATERFIELD, A. A.; HUGHES, J.; KOSTERLITZ, H. W. Endogenous opioids peptides: multiple agonist and receptors. *Nature (London.)* 267: 495-99, 1977.
- LLORENS, C.; MALFROY, B.; SCHWARTZ, J. C.; GACEL, G.; ROQUES, B. P.; ROY, J.; MORGAT, J. L.; JAVOY, F.; AGID, Y. Enkephalin dipeptidyl carboxypeptidase (enkephalinase) activity: selective radioassay, properties, and regional distribution in human brain. *J. Neurochem.* 39: 1081-1089, 1982.
- MAACK, T.; SUZUKI, M.; ALMEIDA, F. A.; NUSSENZVEIG, D.; SCARBOROUGH, R. M.; MCENROE, G. A.; LEWICKI, J. A. Physiological role of silent receptors of atrial natriuretic factor. *Science* 238: 675-78, 1987.
- MALFROY, B.; KUANG, W. J.; SEEBURG, P. H.; MASON, A. J.; HENZEL, W. J. Molecular cloning and aminoacid sequence of human enkephalinase (neutral endopeptidase). *FEBS Lett.* 229: 206-210, 1988.

- MALFROY, B.; SCHOFIELD, P. R.; KUANG, W. J.; SEEBURG, P. H.; MASON, A. J.; HENZEL, W. J. Molecular cloning and amino acid sequence of rat enkephalinase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 144: 59-66, 1987.
- MALFROY, B.; SCHWARTZ, J. C. Properties of "enkephalinase" from rat kidney: comparison of dipeptidyl-carboxypeptidase and endopeptidase activities. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 106: 276-285, 1982.
- MALFROY, B.; SWERTS, J. P.; GUYON, A.; ROQUES, B. P.; SCHWARTZ, J. C. High-affinity enkephalin-degrading peptidase in mouse brain and its enhanced activity following morphine. *Nature (Lond.)* 276: 523-526, 1978b.
- MARTIN, W. R.; EADES, C. G.; THOMPSON, J. A.; HUPPLER, R. E.; GILBERT, P. E. The effects of morphine- and nalorphine-like drugs in nondependent and morphine dependent chronic spinal dog. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 197: 517-32, 1976.
- MATSAS, R.; FULCHER, I. S.; KENNY, A. J.; TURNER, A. J. Substance P and Leu-enkephalin are hydrolyzed by enzyme in pig caudate synaptic membrane that is identical with the endopeptidase of kidney microvilli. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80: 3111-3114, 1983.

- MATSAS, R.; TURNER, A. J.; KENNY, A. J. Endopeptidase 24.11 and aminopeptidase activity in brain synaptic membranes are jointly responsible for the hydrolysis of cholecystokinin octapeptide CCK<sub>8</sub>. *FEBS Lett.* 175: 124-128, 1984a.
- MATTHEWS, B. W. Structural basis of the action of thermolysin and related zinc peptidases. *Acc. Chem. Res.* 21: 333-340, 1988.
- MCRORIE, R.A.; TURNER, R. B.; BRADFORD, M. M.; WILLIAMS, W. L. Acrolysin, the aminoproteinase catalyzing the initial conversion of proacrosin to acrosin in mammalian fertilization. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 71: 492-498, 1976.
- MEIYERS, J. C.; MCMULLEN, B. A.; BOUMA, B. N. The contact activation proteins: a structure/function overview. *Agents Actions Suppl.* 38 : 219- 30, 1992.
- MERCURE, C.; THIBAUT, G.; LUSSIER-CACAN, S.; DAVIGNON, J.; SCHIFFRIN, E. L.; REUDELHUBER, T. L. Molecular analysis of human prorenin prosegment variants in vitro and in vivo. *J. Biol. Chem.* 270: 16355-9, 1995.
- MICHENER, M. L.; GIERSE, L. K.; SEETHARAM, R.; FOK, K. F.; OLINS, P. O.; MAI, M. S.; NEEDLEMAN, P. Proteolytic processing of atriopeptin prohormone. *Mol. Pharmacol.* 30: 552-57, 1986.

- MIZUNO, K.; MINAMINO, N.; KANGAWA, K.; MATSUO, H. A new endogenous opioid peptide from bovine adrenal medulla: isolation and amino acid sequence of a dodecapeptide (BAM-12). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 95:1482-488, 1980a.
- MIZUNO, K.; MINAMINO, N.; KANGAWA, K.; MATSUO, H. A new family of "big" met-enkephalins from bovine adrenal medulla: purification and structure of docosa-(BAM 22P) and eicosapeptide (BAM-20P) with very potent opioid activity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 97: 1283-90, 1980b.
- MORCH, H.; PEDERSEN, B. K. Beta-endorphin and immune system-possible role in autoimmune diseases. *Autoimmunity* 21: 161-71, 1995.
- MUKOYAMA, M.; NAKAJIMA, M.; HORIUCHI, M.; SASAMURA, H.; PRATT, R. E.; DZAU, V. J. Expression cloning of type 2 angiotensin II receptors reveals a unique class of seven-transmembrane receptors. *J. Biol. Chem.* 268: 24539-24542, 1993.
- NAKANISHI, S.; INOUE, A.; KITA, T.; NAKAMURA, M.; CHANG, A. C. Y.; COHEN, S. N.; NUMA, S. Nucleotide sequence of cloned cDNA for bovine corticotropine -  $\beta$  - lipotropin precursor. *Nature* 278: 423-27, 1979.

- NAKAO, K.; SUGAWARA, A.; MORII, N.; SAKAMOTO, M.; SUDA, M.; SONEDA, J.; BAN, T.; KIHARA, M.; YAMORI, Y.; SHIMOKURA, M. Radioimmunoassay for alpha-human and rat atrial natriuretic polypeptide. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 124: 815-21, 1984.
- NAKAYAMA, K.; OHKUBO, H.; HIROSE, T.; INYAMA, S.; NAKANISHI, S. mRNA sequence for human cardiodilatin-atrial natriuretic factor precursor and regulation of precursor mRNA in rat atria. *Nature* 310: 699-701, 1984.
- NODA M.; FURUTANI Y.; TAKAHASHI H.; TOYOSATO M.; HIROSE T.; INAYAMA S.; NAKANISHI S.; NUMA S. Cloning and sequence analysis of cDNA for bovine adrenal preproenkephalin. *Nature* 21: 202-206, 1982a..
- NODA, M.; TERANISHI, Y.; TAKAHASHI, H.; TOYOSATO, M.; NOTAKE, M.; NAKANISHI, S.; NUMA, S. Isolation and structural organization of the human preproenkephalin gene. *Nature* 297: 431-34, 1982b.
- OIKAWA, S.; IMAI, M.; UENO, A.; TANAKA, S.; NOGUCHI, T.; NAKAZATO, H.; KANGAWA, K.; FUKUDA, A.; MATSUO, H. Cloning and sequence analysis of cDNA encoding a precursor of human atrial natriuretic polypeptide. *Nature* 309: 724-26, 1984.

- OLINS, G. M.; KRIETER, P. A.; TRAPANI, A. J.; SPEAR, K. L.; BOVY, P. R. Specific inhibitors of endopeptidase 24.11 inhibit the metabolism of atrial natriuretic peptides in vitro and in vivo. *Mol. Cell. Endocrinol.* 61: 201-208, 1989.
- OLINS, G. M.; SPEAR, K. L.; SIEGEL, N. R.; REINHARD, E. J.; ZURCHER NEELY, H. A. Atrial peptide inactivation by rabbit-kidney brush-border membranes. *Eur. J. Biochem.* 170: 431-434, 1987a.
- OLIVEIRA, E. B.; MARTINS, A. R.; CAMARGO, A. C. M. Isolation of brain endopeptidase: influence of size and sequence of substrates structurally related to bradykinin. *Biochemistry* 15: 1967-1974, 1976.
- OLIVEIRA, M. C. F.; HIRATA, I. Y.; CHAGAS, J. R.; BOSCHOV, P.; GOMES, R. A. S.; FIGUEREDO, A. F. S.; JULIANO, L. Intramolecularly quenched fluorogenic peptide substrates for human renin. *Anal. Biochem.* 203: 39-46, 1992.
- OPGENORTH, T. J.; WU-WONG, J. R.; SHIOSAKI, K. Endothelin-converting enzymes. *FASEB. J.* 6: 2653-9, 1992.
- ORAWSKI, A. T.; SIMONS, J. P. Degradation of bradykinin and its metabolites by rat brain synaptic membranes. *Peptides* 10: 1063-1073, 1989.

- ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE.** Manual de Laboratório para o exame do sêmen humano e interação esperma-muco cervical. Livraria Editora Santos, 1992. 111 páginas.
- OWENS, G. K.** Differential effects of antihypertensive drug therapy on vascular smooth muscle cell hypertrophy, hyperplasia and hyperplasia in the spontaneously hypertensive rat. *Circ. Res.* 56: 525-536, 1985.
- PAINTER, R.G.; DUKES, R.; SULLIVAN, J.; CARTER, R.; ERDOS, E. G.; JOHNSON, A. R.** Function of neutral endopeptidase on the cell membrane of human neutrophils. *J. Biol. Chem.* 263: 9456-61, 1988.
- PATEY, G.; ROSSIER, J.** Découverte, anatomie et biosynthèse des différentes familles de peptides opioïdes endogènes. *Ann. Endocrinol.* 47: 71-87, 1986.
- PEACH, M. J.** Molecular actions of angiotensin. *Biochem. Pharmacol.* 30: 2745, 1981.
- PERT, C. B.; SNYDER, S. H.** Opiate receptor: its demonstration in nervous tissue. *Science* 179: 1011-1014, 1973.
- PIERART, M. E.; NAJIDOVSKI, T.; APPELBOOM, T. E.; DESCHODT-LANCKMAN, M. M.** Effect of human endopeptidase 24.11 ("enkephalinase") on IL-1 induced thymocyte proliferation activity. *J. Immunol.* 140: 3808-2811, 1988.

- PLOTNIKOFF, N. P. J.; WYBRAN, N. F. N.; MILLER, G. C. Methionine enkephalin: Enhancement of T-cells in patients with Kaposi's sarcoma (AIDS). *Psychopharmacol. Bull.* 22: 695-97, 1986.
- RATHINAVELU, A.; ISOM, G. E. Differential internalization and processing of atrial-natriuretic-factor B and C receptor in PC12 cells. *Biochem. J.* 276: 493-497, 1991.
- REGOLI, D.; BARABE, J. Pharmacology of bradykinin and related kinins. *Pharmacol. Rev.* 32: 1-46, 1980.
- RELTON, J. M.; GEE, N. S.; MATSAS, R.; TURNER, A. J.; KENNY, A. J. Purification of endopeptidase-24.11 ('enkephalinase') from pig brain by immunoabsorbent chromatography. *Biochem. J.* 215: 519-23, 1983.
- RESINK, T.; PANCHENKO, M. P.; TKACHUK, V. A.; AND BUHLER, F. R. Involvement of  $N_1$  protein in the functional coupling of the atrial natriuretic factor (ANF) receptor to adenylyl cyclase in rat lung plasma membranes. *Eur. J. Biochem.* 174: 531-35, 1988.
- RICHTER, K.; KEGGER, R.; NEARI, L.; CORSI, R.; SEVERINI, C.; KREIL, G. cDNA encoding [D-ala<sup>2</sup>] deltorphin precursors from skin of *Phyllomedusa bicolor* also contain genetic information for three dermorphin-related opioid peptides. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 87: 4836-39, 1990.

- RIORDAN, J. F.** Angiotensin II: biosynthesis, molecular recognition, and signal transduction. *Cell Mol. Neurobiol.* 15: 637-51, 1995.
- ROBERTS, J. L.; HERBERT, E.** Characterization of a common precursor to corticotropin and beta-lipotropin: cell free synthesis of the precursor and identification of corticotropin in the molecule. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 74: 4826-30, 1977.
- ROCHA E SILVA, M.; BERALDO, W. T.; ROSENFELD, G.** Bradykinin hypotensive and smooth muscle stimulation factor release from plasma globulins by snake venoms and trypsin. *Am. J. Physiol.* 156: 261-73, 1949.
- ROQUES, B. P.; FOURNIÉ-ZALUSKI, M. C.; SOROCA, E.; LECOMET, J. M.; MALFROY, B.; LLORENS, C.; SCHWARTZ, J. C.** The enkephalinase inhibitor thiorphan shows antinociceptive activity in mice. *Nature (Lond.)* 288: 286-288, 1980.
- ROQUES, B. P.; FOURNIÉ-ZALUSKI, M. C.** Enkephalin degrading enzyme inhibitors: a physiological way to new analgesics and psychoactive agents. *Natl. Inst. Drug Abuse Res. Monogr. Ser.* 70: 128-154, 1986.
- ROQUES, B. P.; BEAUMONT, A.** Neutral endopeptidase 24.11 inhibitors: from analgesics to antihypertensive? *Trends Pharmacol. Sci.* 11: 245-249, 1990.

- ROQUES, B. P.; NOBLE, F.; DAUGÉ, V.; FOURNIÉ-ZALUSKI, M. C.; BEAUMONT, A. Neutral endopeptidase 24.11: structure, inhibition, and experimental and clinical pharmacology. *Pharmacol. Rev.* 45: 87-146, 1993.
- RUSKOAHO, H. Atrial natriuretic peptide: synthesis, release, and metabolism. *Pharmacol. Rev.* 44: 479-602, 1992.
- RUZICKA, B. B.; THOMPSON, R. C.; WATSON, S. J.; AKIL, H. Interleukin-1 beta-mediated regulation of um-receptor mRNA in primary astrocyte-enriched cultures. *J. Neurochem.* 66: 425-28, 1996.
- SASAKI, K.; YAMAMO, Y.; BARDHAN, S.; IWAI, N.; MURRAY, J.; HASEGAWA, M.; MATSUDA, Y.; INAGAMI, T. Cloning and expression of a complementary DNA encoding a bovine adrenal angiotensin II type-1 receptor. *Nature* 351: 1230-233, 1991.
- SATOH, M.; MINAMI, M. Molecular pharmacology and the opioid receptors. *Pharmacol. Ther.* 68: 343-64, 1995.
- SAVOIE, P.; DE-CHAMPLAIN, J.; ANAND-SRIVASTAVA, M. B. C-type natriuretic peptide and brain natriuretic peptide inhibit adenylyl cyclase activity: interaction with ANF-R2/ANP-C receptors. *FEBS Lett.* 370: 6- 10, 1995.

- SCHACHTER, M.; THAIN, E. M. Chemical and pharmacological properties of potent, slow contracting substance (kinin) in wasp venom. *Br. J. Pharmacol.* 9: 352, 1954.
- SCHECHTER, I.; BERGER, A. On the size of the active site in proteases. I. Papain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 27: 157-62, 1967.
- SCHULTZBERG, M.; LUNDBERG, J. M.; HOKFELT, T.; TERENIUS, L.; BRANDT, J.; ELDE, R. P.; GOLDSTEIN, M. Enkephalin-like immunoreactivity in gland cell and nerve terminals of the adrenal medulla. *Neuroscience* 3: 1169- 186, 1987.
- SCHULZ, W. W.; HAGLER, H. K.; BUJA, L. M.; ERDOS, E. G. Ultrastructural localization of angiotensin I-converting enzyme (EC 3.4.15.1) and neutral metalloendopeptidase (EC 3.4.24.11) in the proximal tubule of the human kidney. *Lab. Invest.* 59: 789-97, 1988.
- SCHWARTZ, J. C.; DE-LA-BAUME, S.; LLORENS, C.; MALFROY, B.; SOROCA, E.; FOURNIE-ZALUSKI, M. C.; ROQUES, B. P.; MORGAT, J. L.; ROY, J.; JAVOY-AGID, F.; AGID, Y. Enkephalin dipeptidyl carboxypeptidase ("enkephalinase"): assay, properties, and distribution in human brain and exploration of the active site. *Adv. Biochem. Psychopharmacol.* 33: 225-34, 1982.

- SCHWARTZ, J. C.; GELLER, D. M.; MANNING, P. T.; SIEGEL, N. R.; FOK, K. F.; SMITH, C. E.; NEEDLEMAN, P. Ser-Leu-Arg-Arg-atrioepetin III: the major circulating form of atrial peptide. *Science* 229: 397-400, 1985.
- SCHWARTZ, J. C.; MALFROY, B.; DE LA BAUME, S. Biological inactivation of enkephalins and the role of enkephalin-dipeptidyl-carboxypeptidase ("enkephalinase") as neuropeptidase. *Life Sci.* 29: 1715-1740, 1981.
- SHEPPARD, D.; THOMPSON, J. E.; SCYPINSKI, L.; DUSSE, D.; NADEL, J. A.; BORSON, D. B. Toluene diisocyanate increases airway responsiveness to substance P and decreases airway neutral endopeptidase. *J. Clin. Invest.* 81: 1111-1115, 1988
- SHOUP, D.; MONTZ, F. J.; LOBO, R. A. The effects of estrogen and progesterin on endogenous opioid activity in oophorectomized women. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 60: 178, 1985.
- SIMON, E. J.; HILLER, J. M.; EDELMAN, I. Stereospecific binding of the potent narcotic analgesic (3 H)-etorphine in rat brain homogenates. *Pro. Natl. Acad. Sci. (USA)* 69, 1835-37, 1973.
- SONT, J. K.; VAN-KRIEKEN, J. H.; VAN-KLINK, H. C.; ROLDAAN, A. C.; APAP, C. R.; WILLEMS, L. N.; STERK, P. J. Enhanced expression of neutral endopeptidase (NEP) in airway epithelium in biopsies from steroid- versus nonsteroid-treated patients with atopic asthma. *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.* 16: 549-56, 1997.

- SOUSA, M. S. N. Estudos bioquímicos e farmacológicos de uma substância ANP símile (FNS) produzida pelo rim de coelho: Um estudo comparativo. *Dissertação de mestrado*. Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 1995.
- SPILLANTINI, M. G.; SICUTERI, F.; SALMON, S.; MALFROY, B. Characterization of endopeptidase 3. 4. 24. 11 activity in human plasma and cerebrospinal fluid. *Biochem. Pharmacol.* 39: 1353-1356, 1990.
- SPUNGIN-BIALIK, A.; BEN-MEIR, D.; FUDIM, E.; CARMELI, S.; BLUMBERG, S. Sensitive substrates for neprilysin (neutral endopeptidase) and thermolysin that are highly resistant to serine proteases. *FEBS Lett.* 380: 79-82, 1996.
- STEPHENSON, S. L.; KENNY, A. J. Metabolism of neuropeptides: hydrolysis of the angiotensins, bradykinin, substance P and oxytocin by kidney microvillar membranes. *Biochem. J.* 241: 237-247, 1987b.
- STEPHENSON, S. L.; KENNY, A. J. The hydrolysis of  $\alpha$  human atrial natriuretic peptide by pig kidney microvillar membranes is initiated by endopeptidase 24.11. *Biochem. J.* 243: 183-187, 1987a.
- STERN, A. S.; JONES, B. N.; SHIVELY, J. E.; STEIN, S.; UNDEFRIED, S. Two adrenal opioid polypeptides: proposed intermediates in the processing of proenkephalin. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*. 78: 1962-66, 1981.

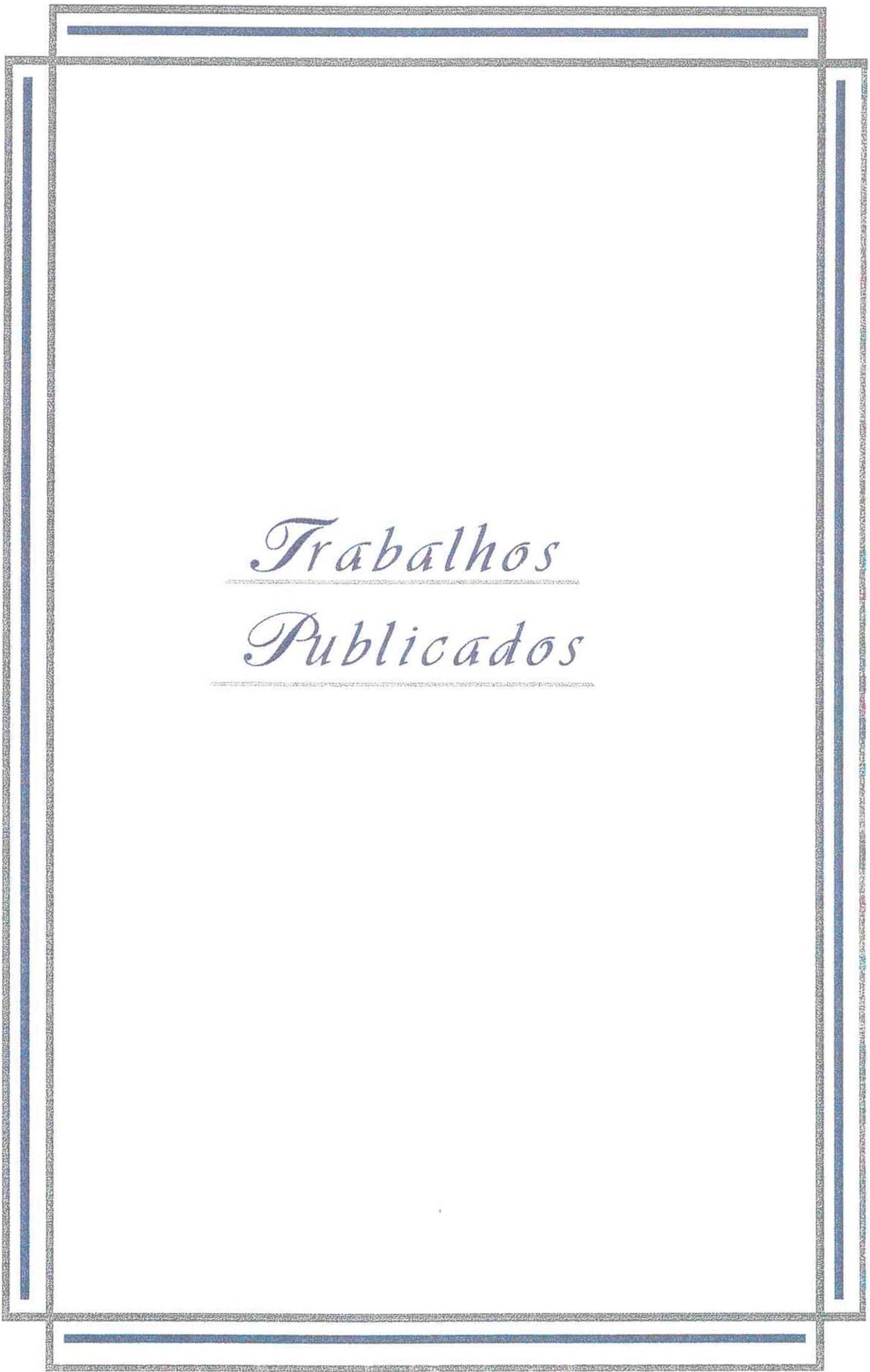
- STERN, A. S.; LEWIS, R. V.; KIMURA, S.; ROSSIER, J.; GERBER, L. D.; BRINK, L.; STEIN, S.; UDENFRIEND, S. Isolation of the opioid heptapeptide Met-enkephalin [Arg<sup>6</sup>, Phe<sup>7</sup>] from bivariate adrenal medullary granules and striatum. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*. 76: 6680-683, 1979.
- STERN, A. S.; LEWIS, R. V.; KIMURA, S.; ROSSIER, J.; STEIN, S.; UDENFRIEND, S. Opioid hexapeptides and heptapeptides in adrenal medulla and brain: possible implications on the biosynthesis of enkephalins. *Arch. Biochem. Biophys.* 205: 606-13, 1980.
- STOCKMANN, P. T.; WILL, D. H.; SIDES, S. D.; BRUNNERT, S. R.; WILNER, G. D.; LEAHY, K. M.; WIEGANG, R. C.; NEEDLEMAN, P. Reversible induction of right ventricular atriopeptin synthesis in hypertrophy due to hypoxia. *Cir. Res.* 63: 207-13, 1988.
- SUDOH, T.; KANGAWA, K.; MINAMINO, N.; MATSUO, H. A new natriuretic peptide in porcine brain. *Nature* 332: 78-81, 1988a.
- SUDOH, T.; MINAMINO, N.; KANGAWA, K.; MATSUO, H. C-type natriuretic peptide (CNP): a new member of natriuretic peptide family identified in porcine brain. *Biophys. Res. Commun.* 168: 863-70, 1990.

- SUGA, S.; NAKAO, K.; HOSODA, K.; MUKOYAMA, M.; OGAWA, Y.; SHIRAKAMI, G.; ARAI, H.; SAITO, Y.; KAMBAYASHI, Y.; INOUE, K. Receptor selectivity of natriuretic peptide family, atrial natriuretic peptide, brain natriuretic peptide, and C-type natriuretic peptide. *Endocrinology* 130: 229-39, 1992.
- SUMMY-LONG, J. Y.; ROSELLA-DAMPMAN, L. M.; MC-LEMORE, G. L.; KOEHLER, E. Kappa opiate receptors inhibit release of oxytocin from the magnocellular system during dehydration. *Neuroendocrinology* 51: 376, 1990.
- TAKAHASHI, H.; TERANHISI, Y.; NAKANISHI, S.; NUMA, S. Isolation and structural organization of the human corticotropin-beta-lipotropin precursor gene. *FESB Lett.* 135: 97-102, 1981.
- TAMBURINI, P. P.; KOEHN, J. A.; GILLIGAN, J. P.; CHARLES, D.; PALMESINO, R. A.; SHARIF, R.; MCMARTIN, C.; ERION, M. D.; MILLER, M. J. Rat vascular tissue contains a neutral endopeptidase capable of degrading atrial natriuretic peptide. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 251: 956-61, 1989.
- TANAKA, I.; MISONO, K. S.; INAGAMI, T. Atrial natriuretic factor in rat hypothalamus, atria and plasma: determination by specific radioimmunoassay. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 124: 663-68, 1984.
- TERENIUS, L. Characteristic of the "receptor" for narcotic analgesics in synaptic plasma membrane fraction from rat brain. *Acta Pharmacol. Toxicol.* 33: 377-84, 1973.

- TIKKANEN, I.; SALMELA, K.; HOHENTHAL, U.; TEPPONEN, A. M.; PAKKALA, S.; AHONEN, J.; FYHRQUIST, F. Increased serum neutral endopeptidase activity in acute renal allograft rejection. *Am. J. Nephrol.* 16: 273-9, 1996.
- TURNER, A. J.; TANZAWA, K. Mammalian membrane metalloproteinases: NEP, ECE, KELL, and PEX. *FASEB J.* 11: 355-64, 1997.
- UMEZAWA, S. A new microbial metabolite phosphoramidon (isolation and structure). *Tetrahedron Lett.* 1: 97-100, 1972.
- UNDERFRIEND, S.; KILPATRICK, D. L. Biochemistry of the enkephalins and enkephalin-containing peptides. *Arch. Biochem. Biophys.* 221: 309-23, 1983.
- URATA, H.; NISHIMURA, H.; GANTEN, D. Mechanisms of angiotensin II formation in humans. *Eur. Heart J.* 16: 79-85, 1995.
- VAGHY, P. L.; RUSSELL, J. S.; LANTRY, L. E.; STEPHENS, R. E.; WARD, P. E. Angiotensin and bradykinin metabolism by peptidases identified in cultured human skeletal muscle myocytes and fibroblasts. *Peptides* 16: 1367-73, 1995.
- VANHOUTTE, P. M.; HUMPHREY, P. P. A.; SPEDDING, M. International Union of Pharmacology recommendations for nomenclature of new receptor subtypes. *Pharmacol. Rev.* 48: 1-2, 1996.

- VOGEL, Z.; ALTSTEIN, M. The adsorption of enkephalin to porous polystyrene beads: a simple assay for enkephalin hydrolysis. *FEBS Lett.* 80: 332-335, 1977.
- WERLE, E.; BEREK, U. Zur Kenntnis des Kallikreins. *Angew. Chem.* 60A: 53, 1948.
- WHITFIELD, P. L.; SEEBURG, P. H.; SHINE, J. The human pro-opiomelanocortin gene: organization, sequence, and interspersion with repetitive DNA. *DNA* 1: 133-143, 1982.
- WUSTER, M.; SCHULZ, R.; HERZ, A. Specificity of opioid towards the  $\mu$ - $\delta$ -, and  $\epsilon$ -opiate receptors. *Neurosci. Lett.* 15: 193-98, 1979.
- XU, D.; EMOTO, N.; GIAID, A.; SLAUGHTER, C.; KAW, S.; DEWIT, D.; YANAGISAWA, M. ECE-1: a membrane-bound metalloprotease that catalyzes the proteolytic activation of big endothelin-1. *Cell* 78: 473-85, 1994.
- ZAGON, I. S.; GIBO, D. M.; MCLAUGHLIN, P. J. Zeta, a growth related opioid receptor in developing rat cerebellum: identification and characterization. *Brain Res.* 551: 28-35, 1991.
- ZAMIR, N.; ZAMIR, D.; EIDEN, L. E.; PALKOVITS, M.; BROWN-STEIN, M. J.; ESKAVA, R. L.; WEBER, E.; FADEN, A. I.; FEUERSTEIN, G. Methionine and leucine enkephalin in rat neurohypophyse: Different responses to osmotic stimuli and T2 toxin. *Science* 228: 606, 1985.

- ZIVIN, R. A.; CONDRA, J. H.; DIXON, R. A.; SEIDAH, N. G.; CHRETIEN, M.; NEMER, M.; CHAMBERLAND, M.; DROUIN, J. Molecular cloning and characterization of DNA sequences encoding rat and human atrial natriuretic factors. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 81: 6325-29, 1984.
- ZUZEL, K. A.; ROSE, C.; SCHWARTZ, J. C. Assessment of the role of enkephalinase in cholecystokinin inactivation. *Neuroscience* 15: 149-159, 1985.



*Trabalhos*  
*Publicados*

# Specific fluorogenic substrates for neprilysin (neutral endopeptidase, EC 3.4.24.11) which are highly resistant to serine- and metalloproteases

M.A.S. Medeiros<sup>1</sup>,  
M.S.F. França<sup>1</sup>,  
G. Boileau<sup>2</sup>,  
L. Juliano<sup>3</sup> and  
K.M. Carvalho<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratório de Neurobiologia Molecular Humana,  
Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Centro de Ciências da Saúde,  
Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, CE, Brasil

<sup>2</sup>Département de Biochimie, Faculté de Médecine, Université de Montréal,  
Montréal, Canada

<sup>3</sup>Departamento de Biofísica, Escola Paulista de Medicina,  
Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, SP, Brasil

## Abstract

Two intramolecularly quenched fluorogenic peptides containing *o*-aminobenzoyl (Abz) and ethylenediamine 2,4-dinitrophenyl (EDDnp) groups at amino- and carboxyl-terminal amino acid residues, Abz-DArg-Arg-Leu-EDDnp (Abz-DRRL-EDDnp) and Abz-DArg-Arg-Phe-EDDnp (Abz-DRRF-EDDnp), were selectively hydrolyzed by neutral endopeptidase (NEP, enkephalinase, neprilysin, EC 3.4.24.11) at the Arg-Leu and Arg-Phe bonds, respectively. The kinetic parameters for the NEP-catalyzed hydrolysis of Abz-DRRL-EDDnp and Abz-DRRF-EDDnp were  $K_m = 2.8 \mu\text{M}$ ,  $k_{cat} = 5.3 \text{ min}^{-1}$ ,  $k_{cat}/K_m = 2 \text{ min}^{-1} \mu\text{M}^{-1}$  and  $K_m = 5.0 \mu\text{M}$ ,  $k_{cat} = 7.0 \text{ min}^{-1}$ ,  $k_{cat}/K_m = 1.4 \text{ min}^{-1} \mu\text{M}^{-1}$ , respectively. The high specificity of these substrates was demonstrated by their resistance to hydrolysis by metalloproteases [thermolysin (EC 3.4.24.2), angiotensin-converting enzyme (ACE; EC 3.4.24.15)], serineproteases [trypsin (EC 3.4.21.4),  $\alpha$ -chymotrypsin (EC 3.4.21.1)] and proteases present in tissue homogenates from kidney, lung, brain and testis. The blocked amino- and carboxyl-terminal amino acids protected these substrates against the action of aminopeptidases, carboxypeptidases and ACE. Furthermore, DArg amino acids ensured total protection of Abz-DRRL-EDDnp and Abz-DRRF-EDDnp against the action of thermolysin and trypsin. Leu-EDDnp and Phe-EDDnp were resistant to hydrolysis by  $\alpha$ -chymotrypsin. The high specificity of these substrates suggests their use for specific NEP assays in crude enzyme preparations.

## Key words

- Neutral endopeptidase
- Enkephalinase
- Neprilysin
- Fluorogenic substrates
- Phosphoramidon

Neutral endopeptidase (NEP, enkephalinase, neprilysin, EC 3.4.24.11) is a broadly specific zinc metalloendopeptidase which hydrolyzes internal peptide bonds on the amino side of hydrophobic amino acid residues in P<sub>1</sub> position, with Leu or Phe being

the preferred amino acids. Shown to be widely distributed in various tissues, NEP is involved in the regulation and metabolism of a variety of biologically active peptides such as substance P, enkephalins, atrial natriuretic factor, bradykinin, gastrin, neurotensin.

and the chemotactic peptide (1.2).

Several synthetic substrates have been developed to measure NEP activity, such as radiolabeled peptides ( $[^3\text{H}]$ Leu-enkephalin,  $\text{D-}[^3\text{H}]\text{Ala}^2$ -Leu-enkephalin) (3,4), chromogenic peptides (glutaryl-Ala-Ala-Phe-2NA, benzyl-Gly-Arg-Arg-Leu-2NA) (5,6) and fluorogenic peptides (dansyl-D-Ala-Gly-Phe( $\text{pNO}_2$ )-Gly, dansyl-Gly-Phe( $\text{pNO}_2$ )- $\beta$ Ala) (7,8).

Although the specificity of all these substrates for NEP is partial, and frequently the use of other protease inhibitors is required during incubation with NEP, they are used to monitor NEP purification, to determine its activity in different tissues under physiological and pathological conditions, as well as to compare the kinetic parameters of different forms of recombinant NEP produced by site-directed mutagenesis, to develop synthetic inhibitors which have been employed to study the physiological functions of NEP, and for clinical use through the increased level of endogenous peptides that are substrates for the enzyme (1,2,9).

Recently, we described a new intramolecularly quenched fluorogenic substrate for NEP related to Leu-enkephalin, containing *o*-aminobenzoyl (Abz) and ethylenediamine 2,4-dinitrophenyl (EDDnp) groups at amino- and carboxyl-terminal amino acid residues, Abz-GG $\beta$ FLRRV-EDDnp (10,11). This substrate presents at least one important advantage in relation to other previously described fluorogenic substrates for NEP: its  $k_{\text{cat}}/K_m = 40 \text{ min}^{-1} \mu\text{M}^{-1}$  is 20 times higher than that of dansyl-D-Ala-Gly-Phe( $\text{pNO}_2$ )-Gly (7) and dansyl-Gly-Phe( $\text{pNO}_2$ )- $\beta$ Ala (8). Although Abz-GG $\beta$ FLRRV-EDDnp also presents good specificity for NEP, since it is resistant to other metalloendopeptidases such as angiotensin-converting enzyme (ACE; EC 3.4.24.15) and thermolysin (EC 3.4.24.2), it is partially susceptible to degradation by trypsin-like enzymes which may cleave the R-R bond.

In the present study, we document two

new intramolecularly quenched fluorogenic substrates for NEP, Abz-D $\beta$ RRL-EDDnp and Abz-D $\beta$ RRF-EDDnp, which were totally resistant to the action of other metalloproteases (ACE, thermolysin), serineproteases (trypsin, EC 3.4.21.4 and chymotrypsin, EC 3.4.21.1) and proteases present in homogenates of several tissues.

The internally quenched fluorogenic peptides Abz-D $\beta$ RRL-EDDnp and Abz-D $\beta$ RRF-EDDnp were synthesized by the solution method (12,13). A recombinant soluble form of NEP (rNEP) was expressed using a baculovirus/insect-cell system and purified by immunoaffinity as previously described (14,15).

A crude membrane preparation was obtained from rat tissues as described earlier (10). Briefly, rat tissues were homogenized in 8 volumes (w/v) of 50 mM Tris-HCl buffer, pH 7.5, using a Potter homogenizer, the homogenate was centrifuged for 10 min at 1,000 g and the pellet was discarded, the supernatant was centrifuged at 80,000 g for 60 min, the pellet was washed four times by resuspension in the same buffer used for homogenization and centrifuged under the conditions described above, and the resulting pellet, resuspended in 50 mM Tris-HCl buffer, pH 7.5 (1/8; w/v), was used as the enzyme source. Protein was measured by the method of Bradford (16). Angiotensin-converting enzyme was purified from guinea pig serum (17).

The synthetic substrates (Abz-D $\beta$ RRL-EDDnp and Abz-D $\beta$ RRF-EDDnp) and their enzymatic products were characterized by high-performance liquid chromatography (HPLC) as follows: the substrate (20 nmol) was incubated with purified rNEP (600 ng) or crude enzyme fractions (1-10  $\mu$ l) in a final volume of 100  $\mu$ l 50 mM Tris-HCl buffer, pH 7.5, at 37°C for 60 min. In inhibition assays, the enzyme was preincubated with 1  $\mu$ M phosphoramidon for 20 min before incubation with substrates. The reaction was stopped by heating for 5 min at 100°C. After

ntrifugation at 10,000 *g* for 10 min, the supernatant fraction was injected into an HPLC column (Nucleosil 5  $\mu$ m C<sub>18</sub>, 145 x 5 mm) and eluted with a 20-40% gradient of acetonitrile containing 0.05% trifluoroacetic acid for a period of 50 min, at a flow rate of 1 ml/min. The intact substrate and products, detected by both UV absorbance (220 nm) and fluorescence ( $\lambda_{em}$  = 420 nm,  $\lambda_{ex}$  = 320 nm) with the detectors arranged in series, were collected to identify the cleavage site by amino acid analysis (18).

The enzyme assays were monitored by measuring the fluorescence at  $\lambda_{em}$  = 420 nm and  $\lambda_{ex}$  = 320 nm with a Shimadzu model F 100 spectrofluorimeter. The 0.5 x 1 cm path-length cuvette containing 500  $\mu$ l of the mixture of 50 mM Tris-HCl buffer, pH 7.5, and Abz-DRRRL-EDDnp (10  $\mu$ M) was placed in the thermostat cell compartment at 37°C for 5 min until temperature equilibrium of the solution was attained. When kidney homogenate (10  $\mu$ l) was used, the fluorescence increase was recorded continuously for 40 min. For the inhibition assay, the enzyme was preincubated with the inhibitor for 20 min at 37°C before incubation with substrates. The same conditions were used for thermolysin, chymotrypsin, trypsin and ACE at concentrations of 0.15  $\mu$ g/ml, 8  $\mu$ g/ml, 15  $\mu$ g/ml and 10  $\mu$ g/ml, respectively.

The kinetic parameters for the hydrolysis of Abz-DRRRL-EDDnp and Abz-DRRF-EDDnp by rNEP were determined from a double-reciprocal Lineweaver-Burk plot. rNEP has an apparent MW of 87,000 (14) and this value was used for the calculation of  $k_{cat}$ . The substrate Abz-DRRRL-EDDnp presented the lowest  $K_m$  value (2.8  $\mu$ M) similar to 3  $\mu$ M obtained for the longer substrate derived from Leu-enkephalin, Abz-GG-FLRRV-EDDnp (10.11) (Table 1A). Furthermore, although Abz-DRRRL-EDDnp presented a lower  $k_{cat}/K_m$  value (2 min<sup>-1</sup>  $\mu$ M<sup>-1</sup>) than Abz-GG-FLRRV-EDDnp (42 min<sup>-1</sup>  $\mu$ M<sup>-1</sup>) (11), this value was higher than those of the short synthetic peptides presented in

Table 1A.

All the substrates presented in Table 1A contain a hydrophobic residue at the P<sub>1</sub>' position (Leu, Phe or Val), an essential condition for NEP activity (1,19). Thus, the excellent kinetic parameters of Abz-DRRRL-EDDnp and Abz-GG-FLRRV-EDDnp may be also explained by interactions of their groups with subsites on the surface of NEP. In these substrates, the presence of EDDnp, a hydrophobic group at position P<sub>2</sub>', may suggest a strong interaction with an S<sub>2</sub>' subsite of NEP.

Table 1B shows the activity of NEP, other metalloendopeptidases (ACE and thermolysin) and serineproteases (trypsin and  $\alpha$ -chymotrypsin) toward Abz-DRRRL-EDDnp, Abz-DRRF-EDDnp and several other synthetic peptides. In contrast to all the other substrates, only Abz-DRRRL-EDDnp and Abz-DRRF-EDDnp were totally resistant to the action of ACE, thermolysin, trypsin and  $\alpha$ -chymotrypsin. Furthermore, the activity toward Abz-DRRRL-EDDnp and Abz-DRRF-EDDnp present in kidney homogenate (Figure 1) and in tissue homogenates of lung, brain and testis (data not shown) was totally inhibited by 1  $\mu$ M phosphoramidon (a highly specific NEP inhibitor), showing also the high resistance of these substrates to other tissue proteases.

It has been previously demonstrated that the Abz and EDDnp groups at amino- and carboxy-terminal amino acid residues protect peptides against the action of aminopeptidases, carboxypeptidases and ACE (10,11). However, these groups do not protect peptides against the action of thermolysin or trypsin, since the substrate Abz-RRRL-EDDnp, containing R at position P<sub>2</sub>', was hydrolyzed by these enzymes (data not shown). Thus, the presence of DR at position P<sub>2</sub>' ensured a total protection of Abz-DRRRL-EDDnp and Abz-DRRF-EDDnp against thermolysin and trypsin. Finally, it may be suggested that EDDnp ensures a total protection of the L-EDDnp and F-EDDnp bonds against

Table 1 - A. Comparison of the kinetic parameters for hydrolysis of Abz-DRRR-EDDnp and Abz-DRRF-EDDnp by NEP with those of Leu-enkephalin and other synthetic substrates used in current NEP assays. <sup>a</sup>Mean values  $\pm$  SEM of four independent determinations. The arrows indicate the peptide bonds cleaved by NEP

B. Incubation of Abz-DRRR-EDDnp, Abz-DRRF-EDDnp, Abz-GGDFLRRV-EDDnp and other synthetic substrates with NEP (0.5  $\mu$ g/ml), ACE (10  $\mu$ g/ml), thermolysin (0.15  $\mu$ g/ml), trypsin (15  $\mu$ g/ml), and chymotrypsin (8  $\mu$ g/ml). Reactions were carried out at pH 7.5 and 37°C. Concentration was 10  $\mu$ M for substrates 1,2 and 3. nd, Not determined.

A						
Substrates	$K_m$ ( $\mu$ M)	$k_{cat}$ ( $\text{min}^{-1}$ )	$k_{cat}/K_m$ ( $\text{min}^{-1} \mu\text{M}^{-1}$ )	References		
(1) Abz-DR-R ↓ L-EDDnp	$2.8 \pm 1.5^a$	5.3	2	-		
(2) Abz-DR-R ↓ F-EDDnp	$5 \pm 1.5^a$	7	1.4	-		
(3) Abz-G-G-F-L-R-R ↓ V-EDDnp	$17 \pm 1.5^a$	736	43	10,11		
(4) Abz-G-G-D-F-L-R-R ↓ V-EDDnp	$3 \pm 2^a$	127	42	10,11		
(5) Y-D-A-G ↓ F-L	22	508	23	14		
	19	-	-	20		
	49	-	-	4		
(6) Glutaryl-A-A ↓ F-2NA	590	592	1	5,6		
(7) Benzyl-G-R-R ↓ L-2NA	180	240	1.3	5		
(8) Dansyl-D-A-G ↓ F-(pNO <sub>2</sub> )-G	45	59	1.3	7		
(9) Dansyl-G ↓ F-(pNO <sub>2</sub> )-βA	37	68	1.8	8		
(10) Suc-A-A ↓ F-NH-Np	76	2.19	0.029	19		
(11) Suc-A-A ↓ L-NH-Np	5.1	290	0.017	19		
(12) Suc-P-A ↓ F-NH-Np	0.905	50	0.018	19		

B						
Substrates	Neutral endopeptidase	ACE	Thermolysin	Trypsin	Chymotrypsin	References
(1) Abz-DR-R-L-EDDnp	+	-	-	-	-	-
(2) Abz-DR-R-F-EDDnp	+	-	-	-	-	-
(3) Abz-G-G-D-F-L-R-R-V-EDDnp	+	-	-	+	-	10,11
(4) Suc-A-A-F-NH-Np	+	nd	+	nd	+	19
(5) Suc-A-A-L-NH-Np	+	nd	+	nd	+	19
(6) Suc-P-A-F-NH-Np	+	nd	+	nd	+	19

the action of  $\alpha$ -chymotrypsin, since no amino acid is involved.

We have previously shown that the intramolecularly quenched fluorogenic peptide Abz-GGDFLRRV-EDDnp can be used for a rapid, highly selective and sensitive NEP assay (10,11). Indeed, since the catalytic constants obtained with Abz-GGDFLRRV-EDDnp are better than those obtained with Abz-DRRR-EDDnp, Abz-DRRF-EDDnp and other synthetic peptides shown here, it is the best substrate for use in NEP

assays. As shown in Table 1B, although resistant to hydrolysis by ACE, thermolysin and  $\alpha$ -chymotrypsin, Abz-GGDFLRRV-EDDnp was hydrolyzed at the R-R bond by trypsin, suggesting that it may also be susceptible to hydrolysis by trypsin-like enzymes present in some crude enzyme preparations. Taken together, these results show that Abz-DRRR-EDDnp and Abz-DRRF-EDDnp are substrates more specific for NEP than Abz-GGDFLRRV-EDDnp.

Finally, the results presented in this study

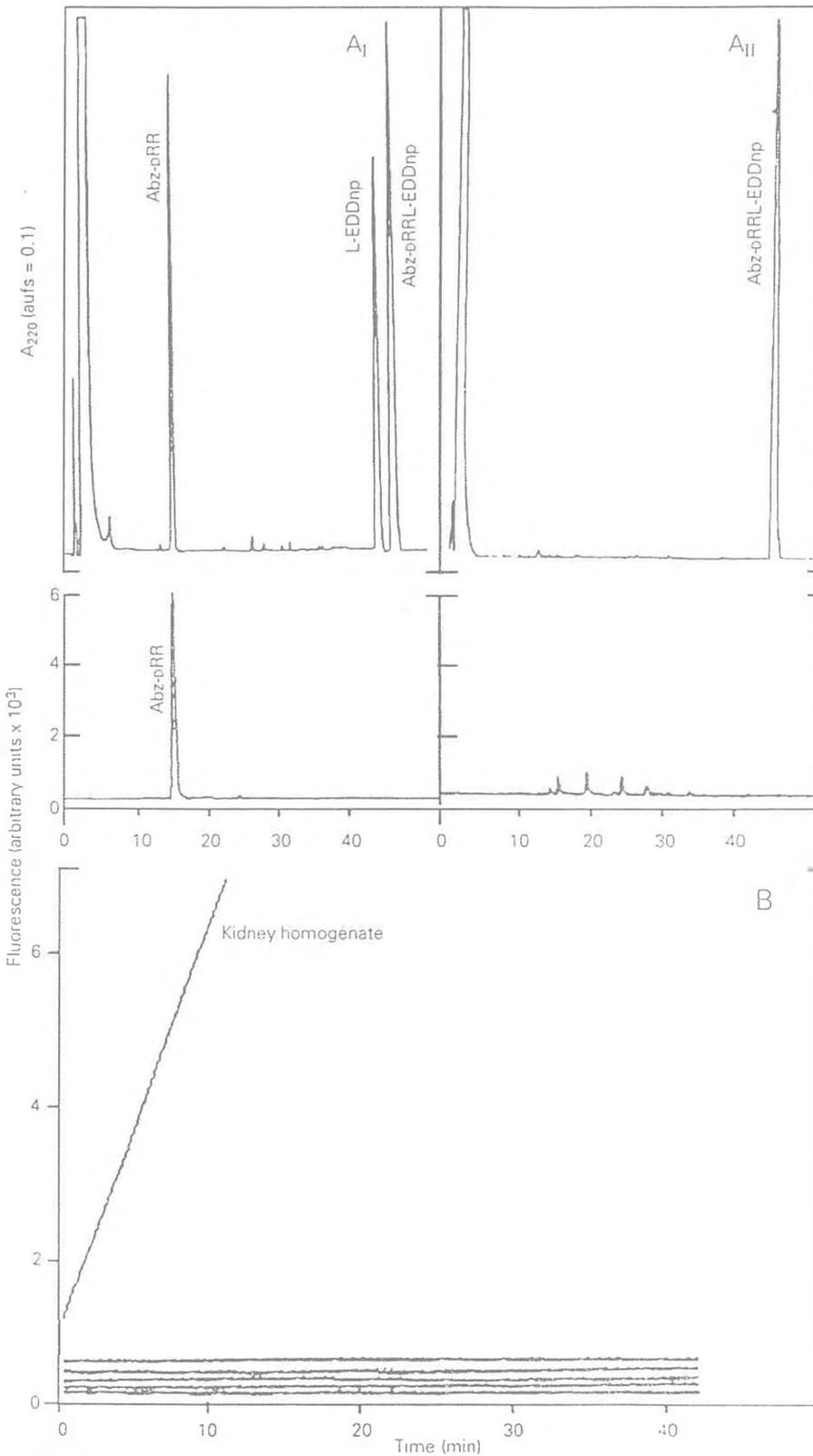


Figure 1 - A, HPLC elution profile of Abz-pRRR-EDDnp after hydrolysis by rat kidney homogenate ( $A_I$ ) and inhibition of the reaction by phosphoramidon ( $A_{II}$ ). The substrate (20 nmol) was incubated with 10  $\mu$ l kidney homogenate (180  $\mu$ g/ml) for 60 min in 100  $\mu$ l 50 mM Tris-HCl buffer, pH 7.5, at 37°C, in the presence or absence of 1  $\mu$ M phosphoramidon. The reaction was stopped by heating the mixture at 100°C for 5 min followed by centrifugation at 10,000 g for 10 min. An aliquot of the supernatant (100  $\mu$ l) corresponding to 90% of the reaction mixture was submitted to HPLC as described in the text. B, Continuous fluorescence recording ( $\lambda_{em} = 420$  nm,  $\lambda_{ex} = 320$  nm) of the hydrolysis of Abz-pRRR-EDDnp (10  $\mu$ M) by the enzymes presented from top to bottom: kidney homogenate (10  $\mu$ l) in the absence or presence of 1  $\mu$ M phosphoramidon, ACE (10  $\mu$ g/ml), thermolysin (0.15  $\mu$ g/ml), trypsin (15  $\mu$ g/ml) and  $\alpha$ -chymotrypsin (8  $\mu$ g/ml). All incubations were performed in a final volume of 500  $\mu$ l 50 mM Tris-HCl buffer pH 7.5, at 37°C.

lead us to the following conclusions: i) the previously described substrate Abz-GG<sub>D</sub>FLRRV-EDDnp (10,11), which presents the best kinetic parameters, is more suitable than Abz- $\alpha$ RRL-EDDnp and Abz- $\alpha$ RRF-EDDnp for NEP assays in purified enzyme

preparations; ii) the new substrates Abz- $\alpha$ RRRL-EDDnp and Abz- $\alpha$ RRRF-EDDnp, which present the best specificities, are more suitable than Abz-GG<sub>D</sub>FLRRV-EDDnp for NEP assays in crude enzyme preparations.

References

Roques BP, Noble F, Daugé V, Fournié MC & Beaumont A (1993) Neutral endopeptidase 24.11: structure, inhibition and experimental and clinical pharmacology. *Pharmacological Reviews*, 45: 1-27.

Boileau G & Skidgel RA (1989) Neutral endopeptidase 24.11 (enkephalinase) and its regulators of peptide hormones. *Journal of Neurochemistry*, 53: 145-151.

Boileau G & Altstein M (1977) The adsorption of enkephalin to porous polystyrene: a simple assay for enkephalin hydrolysis. *FEBS Letters*, 80: 332-335.

Boileau G, Malfroy B, Schwartz JC, Gacel C, Roques BP, Roy J, Morgat JL, Javoy-Agid Y (1982) Enkephalin dipeptidyl-carboxypeptidase (enkephalinase): selective radioassay, properties, regional distribution in human brain. *Journal of Neurochemistry*, 39: 1081-1087.

Boileau G, Wilk S & Orłowski M (1981) The membrane-bound pituitary metalloendopeptidase: apparent identity to enkephalinase. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 102: 206-214.

Boileau G, Wilk S & Orłowski M (1984) Kinetic and immunological properties of the membrane-bound brain metalloendopeptidase: comparison with thermolysin and kidney neutral metalloendopeptidase. *Journal of Neurochemistry*, 42: 1067-1071.

Boileau G, Sassi A & Roques BP (1984) A highly sensitive fluorogenic assay for neutral endopeptidase, a neutral metalloendopeptidase that releases tyrosin-glycine from enkephalins. *Analytical Biochemistry*, 141: 62-69.

Boileau G, Goudreau N, Guis C, Soleilhac JM & Roques BP (1994) Dns-Gly-(p-NO<sub>2</sub>)Phe- $\beta$ -Ala, a specific fluorogenic substrate for neutral endopeptidase 24.11. *Analytical Biochemistry*, 219: 87-95.

Boileau G, Gros C, Souque A, Schwartz JC, Duchier J, Cournot A, Baumer P & Lecomte JM (1989) Protection of atrial natriuretic factor against degradation, diuretic and natriuretic responses after *in vivo* inhibition of enkephalinase (EC 3.4.24.11) by acetorphans. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, 86: 7580-7584.

Carvalho KM, Boileau G, França MSF, Medeiros MAS, Camargo ACM & Juliano L (1995) A new fluorimetric assay for neutral endopeptidase (EC 3.4.24.11). *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 28: 1055-1059.

Carvalho KM, Boileau G, Camargo ACM & Juliano L (1996) A highly selective assay for neutral endopeptidase based on the cleavage of a fluorogenic substrate related to leu-enkephalin. *Analytical Biochemistry*, 237: 167-173.

Chagas JR, Juliano L & Prado ES (1990) Intramolecularly quenched fluorogenic tetrapeptide substrates for tissue and plasma kallikreins. *Analytical Biochemistry*, 192: 419-425.

Oliveira MCF, Hirata IY, Chagas JR, Boschov P, Gomes RAS, Figueredo AFS & Juliano L (1992) Intramolecularly quenched fluorogenic peptide substrates for human renin. *Analytical Biochemistry*, 203: 39-46.

Fossiez F, Lemay G, Labonté N, Parmentier-Lesage F, Boileau G & Crine P (1992) Secretion of a functional form of neutral endopeptidase-24.11 from a baculovirus-infected insect cell line. *Biochemical Journal*, 284: 53-59.

Lemay G, Waksman G, Roques BP, Crine P & Boileau G (1989) Fusion of a cleavable signal peptide to the ectodomain of neutral endopeptidase (EC 3.4.24.11) results in the secretion of an active enzyme in COS-1 cells. *Journal of Biological Chemistry*, 264: 15620-15623.

Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72: 248-254.

Dorer FE, Skeggs LT, Kahn JR, Lentz KE & Levine M (1970) Angiotensin converting enzyme: method of assay and partial purification. *Analytical Biochemistry*, 33: 102-103.

Carvalho KM, Joudiou C, Bousseta H, Leseney AM & Cohen P (1992) A peptide-hormone-inactivating endopeptidase in *Xenopus laevis* skin secretion. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, 89: 84-88.

Spungin-Bialik A, Ben-Meir D, Fudim E, Carmeli S & Blumberg S (1996) Sensitive substrates for neprilysin (neutral endopeptidase) and thermolysin that are highly resistant to serine proteases. *FEBS Letters*, 380: 79-82.

Malfroy B & Schwartz JC (1982) Properties of "enkephalinase" from rat kidney: comparison of dipeptidyl-carboxypeptidase and endopeptidase activities. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 106: 276-285.

# A new fluorometric assay for neutral endopeptidase (EC 3.4.24.11)

K.M. Carvalho<sup>1</sup>,  
G. Boileau<sup>2</sup>,  
M.S.F. França<sup>1</sup>,  
M.A.S. Medeiros<sup>1</sup>,  
A.C.M. Camargo<sup>3</sup>  
and L. Juliano<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Laboratório de Neurobiologia Molecular Humana,  
Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Centro de Ciências da Saúde,  
Universidade Federal do Ceará, 60430-270 Fortaleza, CE, Brasil

<sup>2</sup>Département de Biochimie, Faculté de Médecine, Université de Montréal,  
H3C 3J7 Montréal, Canada

<sup>3</sup>Instituto Butantã, 05503-900 São Paulo, SP, Brasil

<sup>4</sup>Departamento de Biofísica, Escola Paulista de Medicina,  
04044-020 São Paulo, SP, Brasil

## Abstract

An intramolecularly quenched fluorogenic peptide structurally related to Leu-enkephalin, Abz-GGDFLRRV-EDDnp, was selectively hydrolyzed at the R-V bond by neutral endopeptidase (NEP, enkephalinase, neprilysin, EC 3.4.24.11) with kinetic parameters ( $K_m = 3 \mu\text{M}$ ,  $k_{cat} = 127/\text{min}$  and  $k_{cat}/K_m = 42/\text{min } \mu\text{M}$ ) similar to those of Leu-enkephalin. The specificity of the assay for NEP was demonstrated by incubating Abz-GGDFLRRV-EDDnp with a kidney homogenate and with crude membrane preparations of brain and lung. For all three homogenates the complementary fragments Abz-GGDFLRR and V-EDDnp accounted for more than 95% of the products which were totally inhibited by  $1 \mu\text{M}$  thiorphan, a highly specific NEP inhibitor. A continuous fluorometric assay for only 5 min was sufficient to quantify the NEP activity with a minimum sensitivity of 5 ng of purified NEP or the equivalent enzymatic activity in crude tissue preparations.

## Key words

- Neutral endopeptidase
- Enkephalinase
- Neprilysin
- Fluorometric peptidase assay
- Neuropeptides
- Thiorphan

## Correspondence

K.M. Carvalho  
Laboratório de Neurobiologia  
Molecular Humana  
Departamento de Fisiologia e  
Farmacologia  
Centro de Ciências da Saúde  
Universidade Federal do Ceará  
Caixa Postal 3157  
Av. Cel. Nunes de Melo, 1127  
60430-270 Fortaleza, CE  
Brasil

Presented at the X Annual Meeting  
of the Federação de Sociedades de  
Biologia Experimental, Serra Negra,  
Brasil, August 23-26, 1995.

Research supported by CNPq,  
FAPESP, FUNCAP, FAPESP and  
FAPESP.

Received April 11, 1995  
Accepted September 5, 1995

Neutral endopeptidase (NEP, enkephalinase, neprilysin, EC 3.4.24.11) is a transmembrane metallo-endopeptidase present on the surface of several cell types and is widely distributed in the mammalian body where it appears to have important regulatory functions in the *in vivo* degradation of biologically active peptides such as enkephalins, substance P, bradykinin, neurotensin, chemotactic peptide, gastrin and atrium natriuretic factor (1-7).

Radiolabeled, colorimetric and fluorometric assays have been described to monitor its purification, to measure its activity

in tissues in physiological and pathological conditions, and to determine the potency of synthetic inhibitors (8-12). In general, all these methods present some disadvantages, i.e., they are time consuming, have low sensitivity and their reproducibility depends on the control of the alternative hydrolysis reactions with specific inhibitors of other enzymes, due to the low specificity of the substrates for NEP in crude enzyme preparations (11,12).

In the present study, we describe a rapid, sensitive and specific assay for NEP, using the substrate Abz-GGDFLRRV-

EDDnp, an intramolecular quenched fluorogenic peptide related to Leu-enkephalin, containing *o*-aminobenzoyl (Abz) and ethylenediamine 2,4-dinitrophenyl (EDDnp) groups at the amino- and carboxyl-termini, respectively.

The fluorogenic peptide Abz-GGDFLRRV-EDDnp was synthesized by the solution method (13,14). A recombinant soluble form of NEP (sNEP) was expressed using a baculovirus/insect-cell system and purified by immunoaffinity as previously described (15,16).

Rat tissues were homogenized in 8 volumes (w/v) of 50 mM Tris-HCl buffer, pH 7.5, using a Potter homogenizer. The crude membrane fraction was obtained as follows: the homogenate was centrifuged for 10 min at 1,000 *g* and the pellet was discarded; the supernatant was centrifuged at 80,000 *g* for 60 min; the pellet was washed three times by resuspension in the same buffer as used for homogenization and centrifuged under the conditions described above. The resulting pellet, resuspended in 50 mM Tris-HCl buffer, pH 7.5, (1/8, w/v), was used as the enzyme source. Protein was evaluated by the method of Bradford (17).

Characterization of the synthetic substrates and of their enzymatic products was performed by high-performance liquid chromatography (HPLC) as follows: substrate (10 nmol) was incubated with purified sNEP (100 ng) or crude enzyme fraction (1-10  $\mu$ l) in a final volume of 100  $\mu$ l of 50 mM Tris-HCl buffer, pH 7.5, at 37°C for a fixed time. The reaction was stopped by heating for 5 min at 100°C. After centrifugation at 10,000 *g* for 10 min, the supernatant fraction was injected into an HPLC column (Nucleosil 5  $\mu$ m C<sub>18</sub>, 145 x 4.5 mm) and eluted with a 20-40% gradient of acetonitrile containing 0.05% trifluoroacetic acid over a period of 30 min, at a flow rate of 1 ml/min. The substrate and products, detected both by

UV absorbance (220 nm) and by fluorescence ( $\lambda_{em} = 420$  nm,  $\lambda_{ex} = 320$  nm) with the detectors arranged in series, were collected to identify the cleavage site by amino acid analysis (18).

For the enzyme assay, hydrolysis of the fluorogenic substrate was monitored by measuring fluorescence at  $\lambda_{em} = 420$  nm and  $\lambda_{ex} = 320$  nm in a Shimadzu model F 2000 spectrofluorimeter. The 0.5 x 1 cm path-length cuvette containing 500  $\mu$ l of the mixture of 50 mM Tris-HCl buffer, pH 7.5, and Abz-GGDFLRRV-EDDnp (6  $\mu$ M) was placed in the thermostated cell compartment at 37°C for 5 min until temperature equilibrium of the solution was attained. The enzyme (1-10  $\mu$ l) was added and the fluorescence course was recorded continuously for 5 min. For the inhibition assays, the enzyme was pre-incubated with 1  $\mu$ M phosphoramidon for 20 min before its addition to the reaction cuvette. The slope of the fluorescence line was converted into moles of product released per min using a calibration curve obtained from the corresponding synthetic fluorescent amino-terminal fragment released during hydrolysis, as previously described (13,19).

Kinetic parameters for the NEP-catalyzed hydrolysis of Abz-GGDFLRRV-EDDnp were determined from the double-reciprocal Lineweaver-Burker plot (data not shown). The sNEP has an apparent M.W. of 87,000 (16) and this value was used for calculation of  $k_{cat}$ .

The substrate Abz-GGDFLRRV-EDDnp was selectively hydrolyzed at the R-V bond by sNEP (data not shown) with kinetic parameters ( $K_m = 3$   $\mu$ M,  $k_{cat} = 127$  /min and  $k_{cat}/K_m = 42$  /min  $\mu$ M) which are similar to those of Leu-enkephalin ( $k_{cat}/K_m = 63$  /min  $\mu$ M) (20), showing that it is an excellent substrate for this enzyme. When the substrate was incubated with rat kidney homogenate, more than 95% of all products released were the complemen-

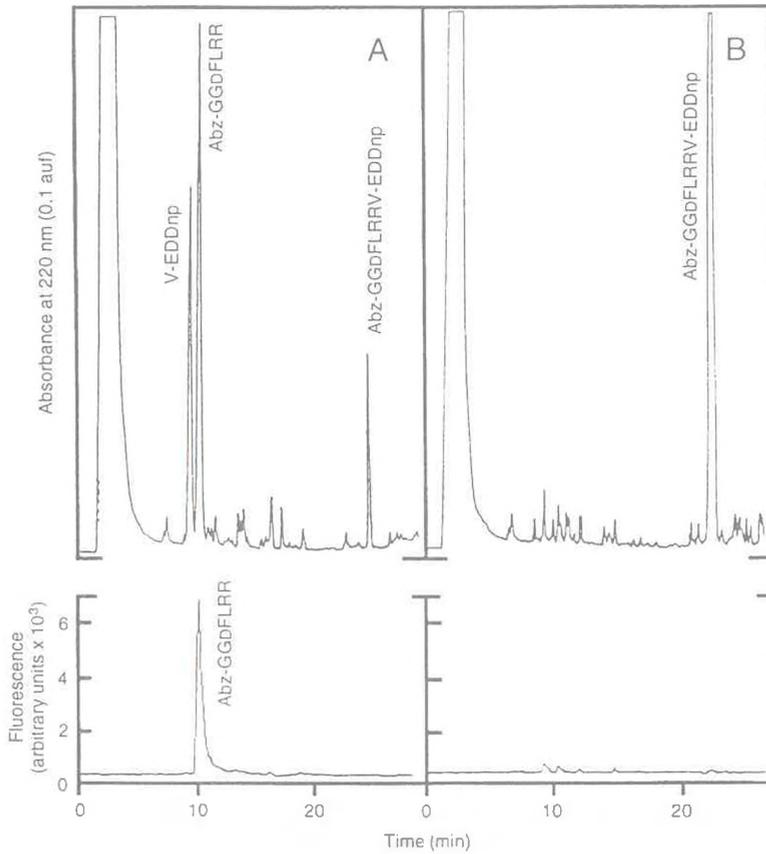


Figure 1 · HPLC elution profile of Abz-GGDFLRRV-EDDnp after hydrolysis by rat kidney homogenate (A) and inhibition of the reaction by thiorphan (B). The substrate (10 nmol) was incubated with 5 µl kidney homogenate for 30 min in 100 µl of 50 mM Tris-HCl buffer, pH 7.5, at 37°C in the presence or not of 1 µM thiorphan. The reaction was stopped by heating the mixture at 100°C for 5 min followed by centrifugation at 10,000 g for 10 min. An aliquot of the supernatant (100 µl) corresponding to 90% of the reaction mixture was submitted to HPLC as described in the text.

ry fragments Abz-GGDFLRR and V-EDDnp (Figure 1A), a fact that did not occur in the presence of 1 µM thiorphan, a highly specific NEP inhibitor (Figure 1B); similar results were also obtained with crude membrane preparations of brain and lung (data not shown). These results demonstrate that NEP was the only or the major enzyme present in these crude enzyme preparations that hydrolyzed this substrate.

The NEP fluorogenic assay was performed by continuous recording of the increase in fluorescence when purified NEP or kidney homogenate was incubated with Abz-GGDFLRRV-EDDnp for 5 min (Figure 2A,B). When control kidney homogenate incubations were performed

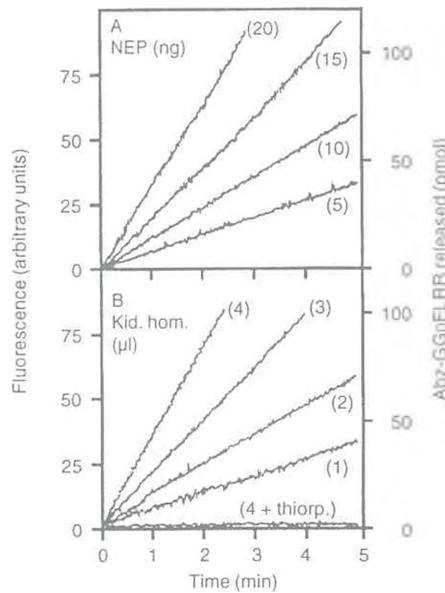


Figure 2 · Continuous fluorescence recording of the hydrolysis of Abz-GGDFLRRV-EDDnp (6 µM) with purified NEP (5-20 ng) (A) or with a kidney homogenate (1-4 µl) (B) at 37°C. The reaction volume was 500 µl of 50 mM Tris-HCl buffer, pH 7.5. The amount of Abz-GGDFLRR released was calculated from a fluorescence calibration curve obtained with the synthetic fluorescent fragment.

in the presence of 1  $\mu\text{M}$  thiorphan, substrate hydrolysis by NEP was inhibited by >95%. Using a concentration of Abz-GGdFLRRV-EDDnp (6  $\mu\text{M}$ ) two times that of its  $K_m$  (3  $\mu\text{M}$ ) for NEP, all the reactions were highly reproducible, obeying zero-order kinetics, as demonstrated by the linear increase of fluorescence with time.

The fluorometric assay presented here has some important advantages when compared to similar assays for NEP which use the internally quenched fluorogenic peptides dansyl-D-Ala-Gly-Phe(pNO<sub>2</sub>)-Gly (11) and dansyl-Gly-Phe(pNO<sub>2</sub>)-betaAla (12). First, the  $k_{cat}/K_m$  value (42/min  $\mu\text{M}$ ) of Abz-GGdFLRRV-EDDnp hydrolysis

by NEP is more than 25 times higher than those of dansyl-D-Ala-Gly-Phe(pNO<sub>2</sub>)-Gly (1.3/min  $\mu\text{M}$ ) and dansyl-Gly-Phe(pNO<sub>2</sub>)-betaAla (1.8/min  $\mu\text{M}$ ), which indicates that our fluorogenic peptide is a better substrate. Second, our NEP assay (minimum of 1 ng/ml of pure enzyme) is at least 100 times more sensitive than that of the two other substrates (minimum of 100 ng/ml of pure enzyme).

The present data show that the intramolecular quenched fluorogenic peptide related to Leu-enkephalin, Abz-GGdFLRRV-EDDnp, can be used for a continuous, rapid and highly sensitive assay for NEP in purified and crude enzyme preparations.

## References

- Malfroy B, Swerts JP, Guyon A, Roques BP & Schwartz JC (1978). High-affinity enkephalin-degrading peptidase in mouse brain and its enhanced activity following morphine. *Nature*, 276: 523-526.
- Almenoff J, Wilk S & Orlovsky M (1981). Membrane bound pituitary metalloendopeptidase: apparent identity to enkephalinase. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 102: 206-214.
- Sekizaka K, Tamaoki J, Nadel JA & Borson DB (1987). Enkephalinase inhibitor potentiates substance P and electrically induced contraction in ferret trachea. *Journal of Applied Physiology*, 63: 1401-1405.
- Sheppard D, Thompson JE, Scypinski L, Dusser D, Nadel JA & Borson DB (1988). Toluene diisocyanate increases airway responsiveness to substance P and decreases airway neutral endopeptidase. *Journal of Clinical Investigation*, 81: 1111-1115.
- Roques BP & Beaumont A (1990). Neutral endopeptidase-24.11 inhibitors: from analgesics to antihypertensives? *Trends in Pharmacological Sciences*, 11: 245-249.
- Erdős EG & Skidgel RA (1989). Neutral endopeptidase 24.11 (enkephalinase) and related regulators of peptide hormones. *FASEB Journal*, 3: 145-151.
- Roques BP, Noble F, Daugé V, Fournié-Zaluski MC & Beaumont A (1993). Neutral endopeptidase 24.11: structure, inhibition, and experimental and clinical pharmacology. *Pharmacological Reviews*, 45: 87-146.
- Vogel Z & Altstein M (1977). The adsorption of enkephalin to porous polystyrene beads: a simple assay for enkephalin hydrolysis. *FEBS Letters*, 80: 332-335.
- Llorens C, Malfroy B, Schwartz JC, Gacel G, Roques BP, Roy J, Morgat JL, Javoy-Agid F & Agid Y (1982). Enkephalin dipeptidyl carboxypeptidase (enkephalinase) activity: selective radioassay, properties, and regional distribution in human brain. *Journal of Neurochemistry*, 39: 1081-1089.
- Almenoff J & Orlovsky M (1984). Biochemical and immunological properties of a membrane-bound brain metalloendopeptidase: comparison with thermolysin-like kidney neutral metalloendopeptidase. *Journal of Neurochemistry*, 42: 151-157.
- Florentin D, Sassi A & Roques BP (1984). A highly sensitive fluorogenic assay for "enkephalinase", a neutral metalloendopeptidase that releases tyrosin-glycine-glycine from enkephalins. *Analytical Biochemistry*, 141: 62-69.
- Goudreau N, Guis C, Soleilhac JM & Roques BP (1994). Dns-Gly-(p-NO<sub>2</sub>)Phe-β-Ala, a specific fluorogenic substrate for neutral endopeptidase 24.11. *Analytical Biochemistry*, 219: 87-95.
- Oliveira MCF, Hirata IY, Chagas JR, Boschov P, Gomes RAS, Figueiredo AFS & Juliano L (1992). Intramolecularly quenched fluorogenic peptide substrates for human renin. *Analytical Biochemistry*, 203: 39-46.
- Chagas JR, Juliano L & Prado ES (1990). Intramolecularly quenched fluorogenic tetrapeptide substrates for tissue and plasma kallikreins. *Analytical Biochemistry*, 192: 419-425.
- Lemay G, Waksman G, Roques BP, Crine P & Boileau G (1989). Fusion of a cleavable signal peptide to the ectodomain of neutral endopeptidase (EC 3.4.24.11) results in the secretion of an active enzyme in COS-1 cells. *Journal of Biological Chemistry*, 264: 15620-15623.
- Fossiez F, Lemay G, Labonté N, Parmentier-Lesage F, Boileau G & Crine P (1992). Secretion of a functional form of neutral endopeptidase-24.11 from a baculovirus-infected insect cell line. *Biochemical Journal*, 284: 53-59.
- Bradford MM (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72: 248-254.
- Carvalho KM, Joudiou C, Bousseta H, Leseny AM & Cohen P (1992). A peptide-hormone-inactivating endopeptidase in *Xenopus laevis* skin secretion. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, 89: 84-88.
- Juliano L, Chagas JR, Hirata IY, Carmona E, Sucupira M, Oliveira EB & Camargo AMC (1990). A selective assay for endo-oligopeptidase A based on the cleavage of fluorogenic substrates structurally related to enkephalin. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 173: 647-652.
- Gafford JT, Randal AS, Erdős EG & Hers HB (1983). Human kidney "enkephalinase", a neutral metalloendopeptidase that cleaves active peptides. *Biochemistry*, 22: 3265-3271.