

ENCEFALINASE DE ENCÉFALO HUMANO: PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO

GLÓRIA ISOLINA BOENTE PINTO DUARTE

Dissertação submetida à Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Farmacologia da UFC, como requisito para obtenção do Grau de Mestre.

FORTALEZA - 1984

~~UFC BIBLIOTECA CENTRAL~~  
~~Nº 8803013~~  
~~22 / 05 / 88~~

B S S

FC-00003313-3

UFC	BIBLIOTECA CENTRAL
Nº. 627755	
01 / 05 / 197	

Esta Dissertação foi submetida como parte dos requisitos necessários a obtenção do Grau de Mestre em Farmacologia, outorgado pela Universidade Federal do Ceará, e encontra-se a 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.

Glória Isolina Boente Pinto Duarte

DISSERTAÇÃO APROVADA EM 15/12/1984

Dr. Krishnamurti de Moraes Carvalho  
Prof. Adjunto de Farmacologia da UFC  
Orientador da Dissertação

~~Dr. Manassés Claudino Fonteles  
Prof. Titular de Farmacologia da UFC~~

Dr. Waldemar Ladosky  
Prof. Titular de Fisiologia da UFPE

*Aos que amo  
com carinho*

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

## AGRADECIMENTOS

A todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

Em especial:

Ao prof. Krishnamurti de Moraes Carvalho, cuja dedicação como orientador foi um dos mais fortes estímulos durante estes anos de trabalho árduo, a quem cabe parte da nossa formação científica.

Ao prof. José Afonso Bruno, a quem coube a tarefa ingrata de fornecer e dissecar os encéfalos humanos.

Ao prof. Waldemar Ladosky, cuja confiança na nossa capacidade de trabalho, foi sempre um estímulo à carreira científica.

A Andrelina Noronha Coelho de Souza, colega de pós-graduação, pelo companheirismo ao longo destes anos.

Ao prof. Manassés Claudino Fonteles, por ter aceito participar da nossa banca de dissertação, contribuindo certamente com críticas valiosas.

Ao prof. Luiz Recamonde Capelo "in memória", a maior de todas as lições.

À Srta. Maria Silvândira Freire de França e a Sra. Joana Martins de Araújo Tavares pela dedicação desinteressada.

Aos companheiros de jornada, Cristina, Elane, Eliana, Geraldo, Jôse, Silvana, pela amizade e compreensão nos momentos de angústia.

À Srta. Adalcir Oliveira e Sra. Maria Vilani Alencar, pela eficiência e padrão dos trabalhos datilográficos.

# Í N D I C E

Página

LISTA DE TABELAS .....	
LISTA DE FIGURAS .....	
RESUMO .....	
SUMMARY .....	
1. INTRODUÇÃO .....	1
1.1 - Generalidades .....	1
1.2 - Peptídeos opióides .....	4
1.3 - Possíveis funções das encefalinas e endorfinas no sistema nervoso .....	6
1.4 - Metabolismo das encefalinas .....	10
1.4.1 - Enzimas relacionadas com a degradação de encefalinas .....	11
1.5 - Objetivos .....	13
2. MATERIAL E MÉTODOS .....	14
2.1 - Material .....	14
2.1.1 - Fonte de enzimas .....	14
2.1.2 - Substratos .....	14
2.1.3 - Aminoácidos e reagentes utilizados na análise de peptídeos .....	15
2.1.4 - Materiais diversos .....	15
2.1.5 - Aparelhos .....	17
2.2 - Métodos .....	18
2.2.1 - Determinação da atividade enzimática .....	18



	Página
2.2.2 - Determinação da concentração de <u>pro</u> teínas nas frações enzimáticas ....	19
2.2.3 - Extração enzimática .....	21
2.2.4 - Diálise das amostras .....	21
2.2.5 - Cromatografia em coluna de DEAE ce- lulose .....	22
2.2.6 - Concentração das frações enzimáti- cas por ultrafiltração sob pressão reduzida .....	22
2.2.7 - Eletroforese preparativa em coluna de gel de poliacrilamida .....	23
2.2.8 - Eletroforese em placa de gel de po- liacrilamida .....	24
2.2.9 - Eletrofores em placa de gel de <u>po</u> liacrilamida com dodecil sulfato de sódio .....	28
2.2.10 - Focalização isoelétrica em placa de sephadex G-25 .....	29
2.2.11 - Cromatografia em coluna de sephadex G-200 .....	32
2.2.12 - Análise dos produtos de degradação da encefalina pelo analisador auto- mático e peptídeos .....	33
2.2.12.1 - Preparação das amostras.	33

	Página
2.2.12.2 - Análise dos aminoácidos originados da hidrólise enzimática da encefalina .....	33
3. RESULTADOS .....	36
3.1 - Purificação da encefalinase de encéfalo humano	36
3.1.1 - Extração enzimática .....	36
3.1.2 - Cromatografia de troca iônica em coluna de DEAE celulose (DE-52) .....	36
3.1.3 - Eletroforese preparativa em coluna de gel de poliacrilamida .....	39
3.2 - Avaliação do grau de pureza da encefalinase....	41
3.2.1 - Eletroforese analítica em placa de gel de poliacrilamida .....	41
3.2.2 - Eletroforese em placa de gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio	42
3.2.3 - Focalização isoelétrica em sephadex G-25 .....	44
3.3 - Propriedades da enzima purificada .....	44
3.3.1 - Determinação do peso molecular .....	44
3.3.1.1 - Cromatografia em coluna de sephadex G-200 .....	44
3.3.1.2 - Eletroforese em placa de gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS)..	47

	Página
3.3.2 - Determinação do ponto isoelétrico..	49
3.3.3 - Determinação do pH ótimo .....	49
3.3.4 - Determinação da constante de Michaelis ( $K_m$ ) .....	49
3.3.5 - Inativação por metais pesados .....	53
3.3.6 - Inibidores enzimáticos .....	53
3.3.7 - Determinação da constante de inibição para a puromicina ( $k_i$ ) .....	53
3.3.8 - Efeito do ditiotreitol sobre a encefalinase .....	59
3.3.9 - Degradação enzimática da encefalina pela enzima purificada .....	59
4. DISCUSSÃO .....	63
4.1 - Metodologia utilizada para a purificação da encefalinase de encéfalo humano .....	63
4.1.1 - Estabilidade da enzima durante o processo de purificação .....	64
4.1.2 - Determinação da atividade enzimática .....	65
4.2 - Critérios de homogeneidade aplicados à encefalinase purificada .....	65
4.3 - Propriedades da enzima purificada .....	67
5. CONCLUSÕES .....	73
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	75

## LISTA DE TABELAS

	Página
Purificação e recuperação da atividade enzimática de encéfalo humano .....	38
Efeitos dos metais pesados sobre a encefalinase purificada de encéfalo humano .....	54
Efeitos dos inibidores enzimáticos sobre a encefalinase purificada de encéfalo humano .....	56
Efeito do ditiotreitol sobre a enzima purificada ...	60

## LISTA DE FIGURAS

	Página
- Determinação da atividade enzimática sobre substratos aminoacil- $\beta$ -naftilamidas .....	20
- Aparelho para eletroforese em placa de gel de poliacrilamida .....	27
- Aparelho para focalização isoelétrica em sephadex G-25 .....	31
- Cromatografia de Glu, Tre, Ser, Asp, Pro, Gli, Ala, Cis, Val, Met, Isoleu, Leu, Tir. Fen .....	35
- Cromatografia em coluna de DEAE celulose (DE-52)..	37
- Eletroforese preparativa em coluna de gel de poliacrilamida .....	40
- Eletroforese analítica em placa de gel de poliacrilamida .....	42
- Eletroforese em placa de gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio .....	43
- Determinação do ponto isoelétrico da enzima purificada por focalização isoelétrica em sephadex G-25.	45
- Determinação do peso molecular da encefalinase por cromatografia em coluna de sephadex G-200 .....	46
- Determinação do peso molecular da encefalinase por eletroforese em placa de gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio .....	48

	Página
- Determinação do pH ótimo para a atividade encefali násica purificada .....	50
- Determinação da constante de Michaelis ( $K_m$ ) para Lis- $\beta$ -naftilamida .....	51
- Determinação da constante de Michaelis para a Tir- $\beta$ -naftilamida .....	52
- Efeitos dos íons metálicos na atividade enzimáti ca purificada de encéfalo humano .....	55
- Efeito do p-aminomercúrioacetato e da bacitracina na enzima purificada .....	57
- Determinação da constante de inibição para puromi- cina .....	58
- Efeito do ditioneitol (DTT) sobre a enzima purifi cada .....	61
- Degradação enzimática da encefalina pela enzima pu rificada .....	62

## RESUMO

Uma enzima que degrada encefalina foi isolada da fração sobrenadante do encéfalo humano e purificada de 2084 vezes em relação ao homogeneizado. Vários critérios de pureza sugerem a homogeneidade desta enzima: eletroforese em gel de poliacrilamida com e sem dodecil sulfato de sódio (SDS) e focalização isoeletrica em sephadex G-25.

A enzima isolada degrada exclusivamente a encefalina na ligação  $\text{Tir}^1\text{-Gli}^2$ .

A eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio e cromatografia em coluna de sephadex G-200 indicaram que a enzima pura é constituída de uma única cadeia polipeptídica com peso molecular em torno de 100000 daltons.

A focalização isoeletrica em sephadex G-25 demonstrou que a encefalinase purificada apresenta um ponto isoeletrico em torno de 4,9. A enzima é ativada por ditiotreitol e inibida por  $\text{Cu}^{++}$ ,  $\text{Zn}^{++}$ ,  $\text{Mn}^{++}$ ,  $\text{Ni}^{++}$ , puromicina bacitracina, p-aminomercuoacetato, porém não é afetada por EDTA.

## SUMMARY

The enzyme which hydrolysis enkephalin was isolated from human brain supernatant and purified about 2084 fold. The purified enzyme was homogeneous on the basis on the polyacrylamide gel electrophoresis, SDS polyacrylamide gel electrophoresis and isoelectric focusing in sephadex G-25. The isolated enzyme cleaves only the Tyr<sup>1</sup>-Gly<sup>2</sup> bond of the enkephalin. Sodium dodecyl sulphate gel electrophoresis and sephadex G-200 chromatography indicated a single polypeptide chain with molecular weight of 100 000 daltons. The isoelectric focusing showed that the purified enzyme has a pI near 4,9. The enzyme was activated by addition of dithiothreitol and inhibited by Cu<sup>++</sup>, Zn<sup>++</sup>, Mn<sup>++</sup>, Ni<sup>++</sup>, puromycin, bacitracin and p-aminomercuriacetate but not was affected by EDTA. The K<sub>m</sub> value for Met-enkephalin was  $4,16 \times 10^{-5}$  M suggesting that these enzyme may be enveloped in mechanisms of physiological hydrolysis of opioid peptides.



## 1 - INTRODUÇÃO

### 1.1 - Generalidades

Entender a base celular e molecular das funções do cérebro humano tem sido um dos maiores desafios científicos. A intensificação dos estudos nesta área, tem permitido, nas últimas duas décadas, notáveis progressos, resultantes da descoberta de novos fatores cerebrais - peptídeos e polipeptídeos - que parecem controlar o funcionamento da hipófise, sistema endócrino e possivelmente do próprio cérebro.

O estudo dos peptídeos distribuídos amplamente nos mamíferos, particularmente no cérebro e trato gastrointestinal, além de trazer novas perspectivas acerca da regulação da neurotransmissão, permitiu a identificação dos neurônios peptidérgicos em outras áreas do tecido nervoso, fora do eixo hipotálamo - hipofisário. Estes neurônios caracterizam-se por sintetizarem o neurotransmissor (peptídeo) apenas no corpo celular, por não possuírem o fenômeno de recaptação e por armazenarem o mediador em vesículas de 1.000 Å, o que os distingue dos neurônios clássicos (Speidel, 1919; Bargman & Scharrer, 1951; Hild, 1951; Hökfelt et al, 1980). O fato dos receptores peptidérgicos serem ativados por concentrações menores do neurotransmissor (neuropeptídeo), em relação às necessárias

ã estimulação dos neurônios clássicos permite uma ação mais prolongada dessas substâncias (Hökfelt, et al, 1980).

A suspeita de dois grupos celulares interagindo por meio de um mensageiro químico motivou uma sequência de experimentos que levaram inicialmente à caracterização de dois hormônios secretados pelo lobo posterior da hipófise - vasopressina e ocitocina - como sendo um peptídeo (Du Vigneaud et al, 1953). Estes dois hormônios, apesar de terem sido caracterizados inicialmente em mamíferos, representam uma classe de peptídeos cuja estrutura foi preservada ao longo do processo evolutivo. Em muitos vertebrados inferiores é representado por uma substância simples denominada arginina-vasotocina. Nos mamíferos há uma substituição do aminoácido arginina na posição 8 por leucina, passando a chamar-se ocitocina (ver revisão Bloom, 1981). Em seguida, foram descobertos os neurônios peptidérgicos no hipotálamo, contendo hormônio liberador da tireotrofina (TRH), hormônio liberador do hormônio luteinizante (LHRH) e somatostatina (ver revisão Browstein, 1977; Hökfelt et al, 1980). Aos poucos, a pequena lista feita por McLENNAN (1963), acerca dos possíveis neurotransmissores, iniciada pela acetilcolina, noradrenalina e serotonina (transmissores clássicos), vem crescendo dia após dia. Invariavelmente, cada mensageiro é descoberto primeiro como um fator - uma substância de composição química desconhecida, que tem um efeito farmacológico qualquer. Na maioria das vezes, conclui

se que este fator é constituído por aminoácidos e que é ativo no cérebro, sendo denominado neuropeptídeo.

As técnicas para a determinação rápida de peptídeos e da sequência de aminoácidos têm facilitado bastante as pesquisas nesta área, permitindo a identificação de um número cada vez maior de peptídeos, dentro e fora do eixo hipotálamo-hipofisário. A imunohistoquímica, por sua vez, tem contribuído com uma série de mapeamentos no sistema nervoso e em outros tecidos, podendo ser citados: a substância P (Cuello & Kanazawa, 1978), as encefalinas (Hökfelt et al, 1977a; Simantov et al, 1977; Watson et al, 1977; Bloom et al, 1978, Sar et al, 1978; Larsson et al, 1979), as endorfinas (Bloom et al, 1978), ocitocina e vasopressina (Swanson, 1977; Defendini & Zimmerman, 1978), etc.

Nos últimos tempos, vários trabalhos têm demonstrado que um peptídeo pode coexistir com um neurotransmissor clássico no mesmo neurônio, como é o caso: da serotonina na medula oblonga do rato com a substância P (Chan Palay et al, 1978, Singer et al, 1979), com o hormônio tireotrófico (Hökfelt et al, 1980); da noradrenalina com a somatostatina nos gânglios simpáticos da cobaia (Hökfelt et al, 1977b) e com as encefalinas no gânglio cervical superior do rato (Hökfelt et al, 1980).

Aos neuropeptídeos tem sido atribuída uma variedade de funções, além daquelas atribuídas ao eixo hipotálamo-hipofisário, destacando-se a neurotransmissão (Nicol & Barker,

1971a; Konishi & Otsuka, 1974a,b, Renaud et al, 1975; Saito et al, 1975; Barker, 1976, 1977, Hökfelt et al, 1980; Snyder et al, 1980; Giust, 1982) e a modulação da atividade nervosa (Nicol & Barker, 1971b, Barker & Gainer, 1974; Henry et al, 1975; Mayeri & Simon, 1975; Barker & Smith, 1976; Barker, 1977; Hökfelt et al, 1980).

## 1.2 - Peptídeos opióides

Os exemplos mais típicos de peptídeos relacionados com a transmissão são, provavelmente, as endorfinas e encefalinas. A saga das endorfinas e encefalinas começou com a descoberta, em vários laboratórios, de certos neurônios que possuíam receptores estereoespecíficos saturáveis para os opiáceos (Pert & Snyder, 1973; Simon et al, 1973; Terenius, 1973). Logo depois, HUGHES & KOSTERLITZ (1975), descreveram o isolamento, no encéfalo de porco, de uma substância que apresentava ações semelhantes à morfina sobre o íleo de cobaia, mas que ao ser incubada com enzimas proteolíticas perdia a atividade. Esta propriedade levou-os a acreditar tratar-se de um peptídeo, denominando-o na ocasião de encefalina. MORRIS, trabalhando no mesmo projeto com HUGHES (1975), analisando a sequência de aminoácidos da substância isolada, observou que se tratava de dois pentapeptídeos que tinham em comum uma sequência N-terminal (Tir-Gli-Gli-Fen-X), diferindo na posição 5, podendo esta ser Met ou Leu, sendo então denominadas Met-5-encefalina e Leu-5-encefalina.

Daí por diante, numerosos trabalhos têm sido lançados na literatura, demonstrando o esforço de vários pesquisadores na tentativa de encontrar uma substância que possa prolongar o tempo de vida das encefalinas e conseqüentemente aliviar a dor. Além disso, apesar das afirmativas acerca dos seus papéis na neurotransmissão e modulação, a busca dos seus possíveis papéis fisiológicos continua.

O interesse por outros peptídeos que mimetizam a ação da morfina foi despertado com a descoberta de peptídeos morfinomiméticos na hipófise (Goldstein, 1976) cujas cadeias eram bem maiores que aquelas das encefalinas. Um desses peptídeos foi a  $\beta$ -lipotrofina que contém 91 resíduos aminoacídicos e cuja porção carboxílica terminal possui 31 resíduos de aminoácidos, sendo denominada  $\beta$ -endorfina (Smith & Li, 1977). Essa última é até agora a mais potente das substâncias endógenas do tipo opiáceo. Outros fragmentos da  $\beta$ -endorfina da atividade morfínica foram extraídos por GUILLEMIN (1978). Estes fragmentos foram chamados  $\alpha$ -endorfina e  $\gamma$ -endorfina.

A descoberta da  $\beta$ -endorfina na hipófise e a conclusão de que a sequência de aminoácidos 61-65 do hormônio hipofisário era idêntica à sequência de aminoácidos da Met-encefalina (Hughes, 1975; Simon & Hiller, 1978; Terenius, 1978) levaram alguns pesquisadores a especular se as encefalinas existiam naturalmente no cérebro ou se seriam produtos de degradação da  $\beta$ -endorfina. Alguns chegaram inclusive a afirmar que as encefalinas eram artefatos produzidos por enzimas contidas

nos tecidos, possuindo por "ligante endógeno" a  $\beta$ -endorfina. Essa possibilidade foi eliminada com a demonstração de que as encefalinas são rapidamente destruídas por enzimas proteolíticas do cérebro, enquanto a  $\beta$ -endorfina é mais estável, não sendo facilmente destruída (Hughes, 1975; 1978), fato confirmado com a síntese de um análogo das encefalinas (Pert et al, 1976).

### 1.3 - Possíveis funções das encefalinas e endorfinas no sistema nervoso

Como comentado no item anterior, nos estudos iniciais sobre encefalinas e endorfinas, alguns pesquisadores se equivocaram quanto à identidade de ambas, lançando na literatura afirmações contraditórias e não suficientemente específicas. Baseados em aspectos peculiares da biossíntese e distribuição, alguns trabalhos de revisão como os de GIUST (1982) fazem distinção entre estas substâncias. De uma maneira geral, os peptídeos do tipo opiáceo estão presentes, em especial, nas áreas do SNC hipoteticamente relacionadas com a percepção da dor (lâmina I, II e V, núcleo trigeminal, núcleo cinzento do periaqueduto, núcleo cinzento periventricular e núcleo da rafe) atividade motora, humoral e comportamental (globo pálido, estria terminal locus ceruleus). Enfim, são encontrados em todas as áreas que se dispõem à regulação da função neuroendócrina (eminência média) e também, em célu-

las cujas funções estão relacionadas à motilidade intestinal (plexos nervosos e glândulas exógenas do estômago e intestino). Acredita-se ainda, que as encefalinas estejam contidas em neurônios internunciais, enquanto a beta endorfina encontra-se, principalmente, na pars intermedia, pars distalis da hipófise e no hipotálamo. Alguns dos neurônios que as contêm possuem fibras de projeção ascendente e descendente, que terminam em áreas que parecem desempenhar papel importante na modulação da dor e onde foi encontrada grandes concentrações de encefalinas (ver Snyder, 1978, Herz, 1978; Gramsch et al, 1979; Cox, 1982).

Ao que parece, as encefalinas e endorfinas pertencem a sistemas funcional e anatomicamente diferentes, atuando como neurotransmissores, moduladores da neurotransmissão ou neurohormônios (Bloom et al, 1978; Gramsch et al, 1979; Hökfelt et al, 1980; Bloom, 1981; Giust, 1982).

A beta endorfina é considerada um neurohormônio devido à sua localização no hipotálamo e à sua ação relativamente prolongada. A distribuição mais ampla das encefalinas, a dependência de cálcio na sua liberação, a destruição muito rápida e sua localização nos sinaptosomas, sugerem que estas atuem como neurotransmissores ou moduladores da função sináptica (ver Goodman & Gilman, 1980; Giust, 1982). Supõe-se ainda que as encefalinas encontradas no SNC, desempenhem predominantemente o papel de transmissores pré-sinápticos do ti-

po inibitório (Giust, 1982), e que os opiáceos (tipo morfina) e opiáceos de ação mista (drogas que podem agir como agonista ou como antagonistas) produzem efeitos imitando as ações dos ligantes endógenos. Além disso, como parecem existir várias espécies de receptores, há a possibilidade de que os opiáceos exógenos possam exercer ações sobre alguns receptores que não sejam ativados fortemente por seus próprios "ligantes endógenos" (Goodman & Gilman, 1980; Giust, 1982).

A analgesia induzida por opiáceos, provavelmente se deve a ações exercidas em diversos sítios no SNC, envolvendo vários sistemas de neurotransmissores. A presença de receptores para opiáceos nas lâminas I e II (substância gelatinosa) da medula espinhal e no núcleo espinhal do nervo trigêmeo, apoia a idéia de que os estímulos nocivos podem alterar e diminuir, neste primeiro nível de integração sensitiva. Possivelmente, os opiáceos exógenos e as encefalinas endógenas agem alterando a liberação central dos neurotransmissores de nervos aferentes, sensíveis a estímulos nocivos. Estes nervos assim como os neurônios internunciais que contêm encefalinas, também são afetados pela entrada das raízes descendentes e talvez, pela beta endorfina circulante (Goodman & Gilman, 1980; Giust, 1982).

Apesar da maioria dos experimentos levarem a sugerir que a modulação da dor seria a função primária das encefalinas e endorfinas (Nikol & Barker, 1971; Barker & Gainer, 1974; Hökfelt et al, 1977, 1980), observou-se que quando da adminis



tração de Met-5-encefalina e Leu-5-encefalina no ventrículo cerebral de animais experimentais, ocorria um aumento, diminuição ou produção de mudanças bifásicas na pressão sanguínea (Laubie et al, 1977; Bolme et al, 1978; Bellet et al, 1980; Yukimura et al, 1982; Baum et al, 1983) e que as encefalinas estão distribuídas em regiões como o trato solitário, hipotálamo e núcleo ambíguo, sugerindo que possam participar do controle cardiovascular (Baum et al, 1983). Também foram encontradas em circuitos relacionados com a temperatura corporal, regulação da secreção hormonal e controle do movimento corporal (Bloom, 1981). Somando-se ao interesse dos pesquisadores em estudar os efeitos comportamentais e analgésicos (Snyder, 1978; Terenius, 1978), o possível envolvimento dos peptídeos opióides em alguns estados patológicos começam a despertar atenção. DIGUILIO et al (1979), relata a redução dos níveis de encefalinas imunoreativas em ratos com hipertensão espontânea. Também, têm sido responsabilizados como um dos fatores que contribuem para o crescimento do tumor mamário induzido por carcinógenos em ratos (Aylsworth et al, 1979; Zagon & Mc Laughlin, 1983; Su et al, 1983). Esta amplitude de possíveis funções tem confundido os esforços em atribuir aos mensageiros o domínio de uma única função. Uma das limitações desse estudo é a dificuldade em isolar-se as enzimas-frequentemente lábeis - capazes de degradar e liberar peptídeos, o que leva a crer que a identificação do sistema enzimático possa vir a ajudar a esclarecer as suas funções e seu mecanismo de

ação.

#### 1.4 - Metabolismo das encefalinas

As encefalinas como método alternativo para o alívio da dor, como proposto desde sua descoberta (Hughes, 1975) apresentam uma grande dificuldade: meia vida curta (Pert et al, 1976). São rapidamente inativadas no cérebro e no plasma, sendo sua natureza transitória "in vivo" atribuída, em parte, à clivagem enzimática por aminopeptidases (Hambrook et al, 1976, Schnebli et al, 1979; Traficante et al, 1980; Wagner et al, 1981; Hersh, 1982; Schwartz et al, 1982; Cushman et al, 1983; Gordon et al, 1983). Esforços nesta área têm sido centralizados na tentativa de sintetizar análogos destas substâncias, resistentes à degradação enzimática, aumentando assim, a meia vida. Nesse sentido, PERT et al, 1976, observaram que a substituição da Gli por D-Ala, na posição 2 da molécula de encefalina, resulta em um composto mais estável e ativo via intra-cerebral ou intra-vascular (Hughes, 1978).

Uma outra forma de aumentar a ação efetiva das encefalinas seria, possivelmente, limitando sua velocidade de degradação por bloqueio das vias enzimáticas associadas ao seu catabolismo.

#### 1.4.1 - Enzimas relacionadas com a degradação de encefalinas

A busca de uma enzima que degrade fisiologicamente as encefalinas trouxe para a literatura um grande acervo de trabalhos. A molécula de encefalina contém quatro sítios de clivagem, em potencial. Dos quatro, três foram hidrolisados por enzimas presentes no cérebro de mamíferos (Hambrook et al, 1976; Malfroy et al, 1978; Gorenstein & Snyder, 1979; Schnebli et al, 1979; Traficante et al, 1980; Wagner et al, 1981; Hersh, 1982; Schwartz, 1982; Gordon et al, 1983). Entretanto, um dos maiores questionamentos é se as enzimas responsáveis fisiologicamente pela degradação das encefalinas seriam endopeptidases, exopeptidases ou ambas.

As endopeptidases presentes no cérebro são conhecidas de há muito por degradar peptídeos biologicamente ativos. Em 1973, CAMARGO et al, isolaram pela primeira vez uma endopeptidase neutra do cérebro de coelho, demonstrando que esta hidrolisava bradiginina. Em 1979, ORLOWSKI et al, também purificaram uma endopeptidase do cérebro do coelho que degradava bradiginina. No mesmo ano, foi isolada uma endopeptidase capaz de degradar TRH (Rupnow e cols, 1979), LHRH, angiotensina II, ocitocina e neurotensina (Taylor & Dixon, 1980). KNIGHT & KLEE (1979), relataram a identificação e caracterização de duas endopeptidases do cérebro de rato, que liberam Met-encefalina do precursor  $\beta$ -lipotrofina. CARVALHO (1981), identificou e purificou até à aparente homogeneidade duas endopeptida

ses do cérebro de coelho que hidrolisam hormônios peptídeos, produzindo anticorpos anti-enzima (Carvalho & Camargo, 1981).

GORENSTEIN & SNYDER (1979, 1980), relataram a purificação de duas formas de dipeptidil carboxipeptidases que degradam encefalinas. Estas enzimas foram denominadas encefalinases  $A_1$  e  $A_2$ . A encefalinase "A" tem sido encontrada em vários tecidos de rato, incluindo a adrenal e o corpo estriado (Hersh, 1982). Nas glândulas salivares, tiróide, rim e pulmão, estas atividades são altas, com o pulmão possuindo cinco vezes mais atividade que o corpo estriado (Hersh, 1982). A encefalinase "A" parece degradar vários peptídeos biologicamente ativos. Ao trabalhar com a fração ligada à membrana, em cérebro de rato, esses autores obtiveram uma atividade enzimática semelhante a dipeptidil aminopeptidase, que cliva a ponte  $\text{Gli}^2\text{-Gli}^3$  da molécula de encefalina, nomeando-a encefalinase B. Segundo MATSAS et al (1983), a enzima cerebral e a endopeptidase 24.11, isolada do rim de mamífero, são imunologicamente idênticas. Esta última pode hidrolisar substância P (Matsas et al, 1983), colecistocinina, LHRH, neurotensina (Relton et al, 1983).

Apesar da existência de todos esses trabalhos apontando as endopeptidases como enzimas que degradam encefalinas, frequentemente a perda de atividade biológica das encefalinas tem sido correlacionada a hidrólise da ponte  $\text{Tir}^1\text{-Gli}^2$  por aminopeptidases (Brecher & Suskiw, 1969; Hambrook et al, 1976; Hayashi & Oshima, 1977; Hayashi, 1978, Malfroy et al,

1978; Schnebli et al, 1979; Swerts et al, 1979; Traficante et al, 1980; Wagner et al, 1981; Hersh, 1981; Hersh, 1982; Giust, 1982; Chaillet et al, 1983; Shimamura et al, 1983). Essas enzimas tem sido purificadas de várias fontes, incluindo cérebro de rato (Schnebli et al, 1979; Wagner et al, 1981), corpo estriado de cérebro bovino (Brecher & Suskiw, 1969; Hersh & McKelvy, 1981), cérebro de macaco (Hayashi & Oshima, 1977; Shimamura et al, 1983) e corpo estriado do cérebro humano (Traficante et al, 1980). Entretanto, apesar dessas enzimas degradarem encefalinas "in vitro", até o momento não foi comprovado se atuam fisiologicamente, tornando-se necessário um estudo mais profundo do problema.

### 1.5 - Objetivos

A constatação de uma série de trabalhos na literatura, conduzindo à degradação enzimática de encefalinas, despertaram em nós a curiosidade de verificar a existência de encefalinases do tipo "aminopeptidases" no encéfalo humano. Assim sendo, o presente trabalho teve por objetivos principais:

- a) Determinar a presença no encéfalo humano de encefalinases capazes de hidrolisar a ligação  $\text{Tyr}^1\text{-Gli}^2$  das encefalinas;
- b) isolar a encefalinase mais abundante no encéfalo e purificá-la até à homogeneidade;
- c) estudar as várias propriedades da enzima purificada.

## 2 - MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 - MATERIAL

#### 2.1.1 - Fonte de enzimas

Encéfalos humanos congelados a  $-18^{\circ}\text{C}$ , cedidos pelo Departamento de Morfologia da Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, após um tempo de "post mortem" que variou de 3-6 horas.

#### 2.1.2 - Substratos

L-lisil- $\beta$ -naftilamida carbonato.  $1/2 \text{H}_2\text{O}$  - Mann Research Laboratories

L-leucil- $\beta$ -naftilamida hidrocloreídrica - Serva Feinbiochemica, Heildberg

L-arginil- $\beta$ -naftilamida - Lote nº M 1715, Vega Biochemical, Tucson

L-metionil- $\beta$ -naftilamida - Lote nº 906260, Orangeburg, New York

3-aspartil- $\beta$ -naftilamida - Lote nº 11071, Vega Biochemical, Tucson

L-tirosil- $\beta$ -naftilamida - Lote nº 16205, United

States Corporation, Cleveland, Ohio

L-prolil- $\beta$ -naftilamida - Fluka A G, Buschs S. G.

### 2.1.3 - Aminoácidos e reagentes utilizados na análise de peptídeos

Padrão de aminoácidos, tampões, soluções de ninidrina fornecidos pela Pearce Chemical Co, Rockford, Illinois, U.S.A.

### 2.1.4 - Materiais diversos

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

Ácido clorídrico - Merck, Brasil

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

Acrilamida - Fluka A G, Buschs S.G.

Albumina bovina - Miles Laboratories Inc., U.S.A.

Amfolines - L K B, Bromma, Suécia

Bacitracin - Sigma Chemical Company, St. Louis

Blue dextran 2.000 - Pharmacie Fine Chemicals A.B., Upsalla, Suécia

Beta-mercaptoetanol - E. Merck, Darmsdatt

Coomassie B. Blue - Lote 18C - 0132, nº B 1131, Sigma

Cloreto de cálcio - E. Merck, Darmsdatt

Cloreto de cobalto - E. Merck, Darmsdatt

Cloreto férrico - E. Merck, Darmsdatt

Cloreto de magnésio - E. Merck, Darmsdatt

Cloreto de manganês - E. Merck, Darmsdatt

Cloreto de potássio - E. Merck, Darmsdatt

Cloreto de sódio - E. Merck, Darmsdatt

Cloreto de zinco - E. Merck, Darmsdatt

DEAE celulose (DE 52) microgranular, pré-inchado,  
lote nº 2452143, Whatman, Maidstone, Inglaterra

Ditiotreitól (DTT) - Lote nº 310098, Calbiochemical,  
San Diego, Califórnia, U.S.A.

Dodecil sulfato de sódio - Pearce Chemical Co, Rock  
ford, U.S.A.

Folin Ciocalteus Phenol reagens - E. Merck, Darmsdatt

Glicerol - Carlos Erba, Brasil

Glicina P.A. - E. Merck, Darmsdatt

Hidróxido de sódio - Reagen, Brasil

Membranas para diálise - Union Carbide Corporation,  
Illinois

N-N'metileno bis acrilamida - Fluka A G, Buschs, S G.

N-(1-naftil) etilenodiamina 2 HCl (NED) - E. Merck,  
Darmsdatt

Nitrito de sódio P.A. - Reagen, Brasil

Ovoalbumina - Pearce Chemical Co, Rockford, Illi-  
nois, U.S.A.

Persulfato de amônio - Lote nº 3687, Canalco



Puromicina hidrocloreídrica - Sigma Chemical Company,  
St. Louis

P-cloromercuriobenzoato - Sigma Chemical Company,  
St. Louis

Sacarose P.A. - E. Merck, Darmsdatt

Sulfato de cobre - E. Merck, Darmsdatt

Sulfato de níquel - E. Merck, Darmsdatt

Sephadex G-25 - Pharmacie Fine Chemicals, Lote nº  
6148, Suécia

Sephadex G-200 - Pharmacie Fine Chemicals, Suécia

Silicone (pasta) - Dow Corning, EEUU

Tetrametiletilenodiamina (TEMED) - Lote nº 3693, Ca  
nalco

Tris-(hidroximetil)-aminometano -E.Merck, Darmsdatt

#### 2.1.5 - Aparelhos

Analizador de peptídeos - construído no Laboratório  
de Química de Proteínas F.M.R.P., USP, São Paulo,  
modificado em nosso laboratório.

Aparelho para eletroforese preparativa em coluna de  
gel de poliacrilamida - construído em nosso labora-  
tório

Aparelho para eletroforese em placa de gel de poli-

acrilamida-construído na Oficina de Precisão da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, USP, São Paulo.

Aparelho para focalização isoelétrica - contruído na oficina Mecânica de Precisão da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, USP, São Paulo.

Aparelho para monitorização de "colunas" - LKB tipo 4701 A, Stockolm, Suécia.

Bomba peristáltica - Technicon Instrumentos Corporation, New York.

Centrífuga refrigerada - Beckmann, modelo J-21C, rotores JA-14 e JA-20, Beckmann Instruments, Inc., Califórnia, U.S.A.

Espectrofotômetro - Beckmann, modelo G-2400, Beckmann Instruments Inc., Munchen, Alemanha.

Liquidificador - ARNO, Brasil

Potenciômetro MV85 - Clamann & Grahmert, Dresde, Alemanha.

## 2.2 - MÉTODOS

### 2.2.1 - Extração enzimática

A extração da atividade enzimática de três encéfalos humanos (3-6 horas "post-mortem") foi realizada por homogeneização destes em sacarose 0,25M (1:4 p/v) a 4°C, em liquidifica

dor durante 90 segundos.

O homogeneizado foi centrifugado a 25.000 x g durante 90 minutos em centrífuga refrigerada, com a temperatura oscilando entre 0°C a 4°C. O sobrenadante obtido foi utilizado nas etapas seguintes de purificação e o precipitado descartado.

### 2.2.2 - Determinação da atividade enzimática

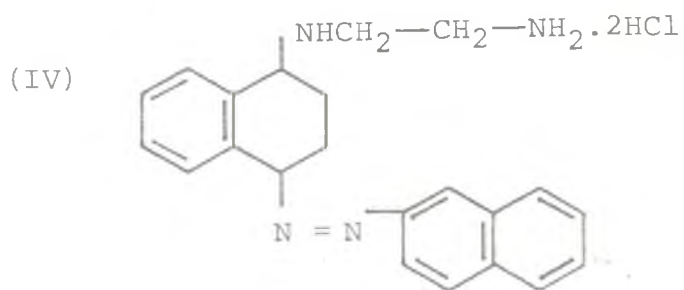
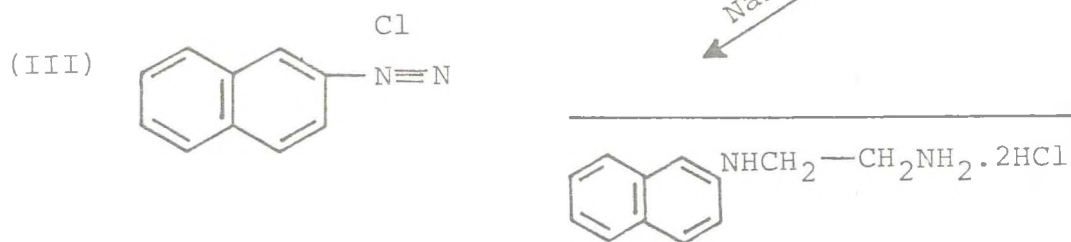
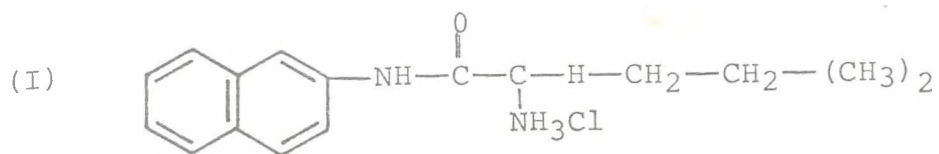
A atividade enzimática foi determinada através da quantificação da hidrólise do substrato aminoacil- $\beta$ -naftilamida, segundo procedimento de GOLDBARG et al (1959) modificado.

O meio de reação, apresentando um volume final de 0,5ml, continha: uma alíquota da fração enzimática previamente ativada com ditioneitol ( $5 \times 10^{-4}M$ ) durante 10 minutos a 37°C, em quantidade suficiente para hidrolisar no máximo 50% do substrato em 60 minutos, 0,25ml do substrato na concentração de  $1 \times 10^{-4}M$  em tampão Tris-HCl 0,05M contendo 0,1M de NaCl. A reação foi interrompida pela adição de ácido tricloroacético a 40% (peso/volume).

Em seguida, o material foi centrifugado a 5.000 x g durante 10 minutos. Retirou-se 0,5ml da fração sobrenadante, adicionou-se a esta 0,5ml de nitrito de sódio (1 mg/ml) a fim de ser processada a diazotização da  $\beta$ -naftilamina (Fig. 1), 0,5ml de sulfato de amônio (5 mg/ml) para eliminar o excesso de nitrito, 1,0ml de 1-naftiletilenodiamina (0,5mg/ml), resul-

FIGURA 1: Determinação da atividade enzimática sôbre substratos aminoacil- $\beta$ -naftilamida

O método consiste em medir a quantidade de  $\beta$ -naftilmina (II) liberada por hidrólise enzimática do substrato aminoacil- $\beta$ -naftilamida (I), isto é feito através da diazotização da  $\beta$ -naftilamina (III) acoplamento do produto formado com a N-(1-naftil) etilenodiamina, resultando em um azo-corante azul estável (IV).



tando em um azo corante azul estável. Após 20 minutos de repouso, foi feita a quantificação dos produtos de hidrólise da naftilamida através de espectrofotometria, utilizando-se um comprimento de onda de 560nm (Goldbarg et al, 1959).

### 2.2.3 - Determinação da concentração de proteínas nas frações enzimáticas

A concentração de proteínas nas frações enzimáticas foi determinada pelo método de Lowry (1951), utilizando-se como padrão albumina bovina (1 mg/ml).

O perfil de proteínas durante as cromatografias foi realizado através da absorção de luz ultravioleta, no comprimento de onda de 230nm e 280nm, pelas frações obtidas.

### 2.2.4 - Diálise de amostras

Um volume da fração sobrenadante foi dialisada a 4°C, utilizando-se membranas de diálise, contra quatro volumes do tampão Tris-HCl 0,05M, contendo  $\beta$ -mercaptoetanol ( $10^{-3}$ M) realizando-se um mínimo de cinco trocas. As trocas foram efetuadas a intervalos de 10 horas.

### 2.2.5 - Cromatografia em coluna de DEAE - celulose (DE-52)

A cromatografia em coluna de DEAE celulose (DE-52) foi

realizada de acordo com o método descrito por OLIVEIRA et al., (1976), MARTINS (1977) e CARVALHO (1981), modificado.

A resina de DEAE, após ser reciclada de acordo com as especificações do fabricante (WHATMAN), foi equilibrada com lavagens exaustivas de Tris-HCl 0,05M, pH 7,5, até o pH do tampão permanecer inalterado.

A coluna, medindo 2,6cm de diâmetro por 30cm de comprimento, foi compactada por gravidade com um fluxo de 600ml por hora, utilizando-se durante a cromatografia um fluxo de 72ml por hora, obtido com o auxílio de uma bomba peristáltica.

Após ter sido submetido a várias diálises o sobrenadante do homogeneizado foi aplicado à coluna DEAE, e em seguida eluído por aumentos discretos da força iônica dos tampões que continham 0,05M, 0,07M, 0,1M, 0,15M, 0,3M e 1,0M de NaCl.

#### 2.2.6 - Concentração das frações enzimáticas por ultrafiltração sob pressão reduzida

Uma membrana para diálise, medindo 25cm de comprimento, com um nó em uma das extremidades, foi adaptada a uma pipeta, a qual foi introduzida em uma rolha de borracha vedando um kitasato com capacidade para 4.000ml. Após a aplicação da amostra na pipeta, o ar do interior do kitasato foi aspirado com o auxílio de uma bomba de vácuo, concentrando-se a amostra à temperatura de 2-4°C.

## 2.2.7 - Eletroforese preparativa em coluna de gel de poliacrilamida

A eletroforese em coluna de gel de poliacrilamida foi realizada segundo um novo sistema desenvolvido por CARVALHO (1981) e CARVALHO & CAMARGO (1981)

Em nossos experimentos foram introduzidas pequenas modificações, tendo sido reduzido o espaço da câmara de eluição e abolida a câmara de refrigeração.

A coluna de gel ( $T^* = 10,34\%$  e  $C^* = 3,22\%$ ), preparada conforme descrição no item 2.2.8 (Métodos), tinha 4,0cm de diâmetro e 10cm de comprimento. As cubas superior e inferior continham tampão Tris-glicina, pH 8,2 (0,012M de Tris e 0,095M de glicina). O tampão de eluição penetrava na câmara através de duas conexões laterais e saía pelo centro da membrana de diálise que foi adaptada a dois anéis de plásticos, contendo um filtro de teflon com um orifício central conectado a um tubo de polietileno (cubeta de eluição cujo espaço vazio foi preenchido com sephadex G-25). A porção central da membrana permanecia em contacto com o tampão da cuba inferior para permitir a passagem de corrente.

---

\* T = peso total de monômeros/100ml de solução.

\* C = quantidade de bis acrilamida expressa como percentagem (p/p) da quantidade total de monômeros.



O fluxo utilizado para o tampão de eluição foi de 5ml/hora (1,66 ml/fração). Após uma pré corrida de 20 horas, usando como indicador o azul de bromofenol, com uma corrente de 20mA, para eliminar prováveis impurezas do gel, a amostra foi adicionada lentamente ao topo do gel.

Nos experimentos foram utilizados no máximo 25mg de proteínas, obtendo-se uma boa separação das bandas.

O método foi desenvolvido a 0°C em câmara fria.

#### 2.2.8 - Eletroforese em placa de gel de poliacrilamida

A eletroforese foi realizada segundo método de MAIZEL (1965) modificado para proteínas nativas com o sistema de tampão para proteínas ácidas, descrito por DAVIS (1964).

As soluções utilizadas na preparação do gel, foram guardadas em frascos escuros a 4°C e desprezadas após 6 meses do seu preparo. Exceção feita a solução de persulfato de amônio que deve ser preparada na hora.

Solução A: -

HCl 1.0N.....	48,0ml
Tris.....	36,3g
Temed.....	0,23ml
Água.... qsp.....	100ml

(ajustar o pH para 8,9)

## Solução B:

HCl 1.0N .....	48,0ml
Tris.....	5,98g
Água.... qsp .....	100ml

(acertar o pH para 6,7)

## Solução C:

Acrilamida .....	19,2g
Bis acrilamida.....	0,64g
Água .... qsp.....	40ml

## Solução G:

Persulfato de amônio.....	35mg
Água .... qsp .....	25ml

## Solução H:

Tris .....	1,5g
Glicina .....	7,2g
Água .... qsp .....	1000ml

## Diluyente da amostra:

Glicerol.....	15,0ml
Solução B .....	5,0ml
Água .....	10,0ml

Os géis com  $T = 10,34\%$  e  $C = 3,22\%$ , foram obtidos da mistura de 7,9ml da solução A com 13,3ml da solução C e 10,5ml de água, deaerada, adicionada a solução G (44.38mg/31,7ml água), também deaerada.

A solução final foi agitada cuidadosamente, evitando-se a formação de bolhas, e imediatamente pipetada no interior do espaço formado por duas placas de vidro (Fig. 2 A e 2 B) acopladas por garras de metal e vedadas com o auxílio de fitas de acrílico besuntadas com silicone. Após o preenchimento das placas, foi introduzido um "pente" de acrílico (Fig. 2 C) entre ambas, formando "poços" com a polimerização da poliacrilamida e bis-acrilamida. Em seguida, as placas foram conectadas às cubas de eletroforese, contendo tampão Tris-glicina, pH 8,2 (0,012M de Tris e 0,095M de glicina).

Após uma pré corrida de uma hora, utilizando o corante azul de bromofenol em 20% de glicerol (v/v), as amostras obtidas das etapas de purificação, foram colocadas nos "poços", diluídas na proporção máxima de 1:1 (v/v).

O processo eletroforético foi desenvolvido em câma

---

\* Notação de HJERTON (1962) para representar as concentrações de acrilamida e bis-acrilamida nos géis, onde T = peso total de monomeros/100ml de solução; C = quantidade de bis-acrilamida expressa com percentagem (p/p) da quantidade total dos monomeros.

Os géis com  $T = 10,34\%$  e  $C = 3,22\%$ , foram obtidos da mistura de 7,9ml da solução A com 13,3ml da solução C e 10,5ml de água, deaerada, adicionada a solução G (44.38mg/31,7ml água), também deaerada.

A solução final foi agitada cuidadosamente, evitando-se a formação de bolhas, e imediatamente pipetada no interior do espaço formado por duas placas de vidro (Fig. 2 A e 2 B) acopladas por garras de metal e vedadas com o auxílio de fitas de acrílico besuntadas com silicone. Após o preenchimento das placas, foi introduzido um "pente" de acrílico (Fig. 2 C) entre ambas, formando "poços" com a polimerização da poliacrilamida e bis-acrilamida. Em seguida, as placas foram conectadas às cubas de eletroforese, contendo tampão Tris-glicina, pH 8,2 (0,012M de Tris e 0,095M de glicina).

Após uma pré corrida de uma hora, utilizando o corante azul de bromofenol em 20% de glicerol (v/v), as amostras obtidas das etapas de purificação, foram colocadas nos "poços", diluídas na proporção máxima de 1:1 (v/v).

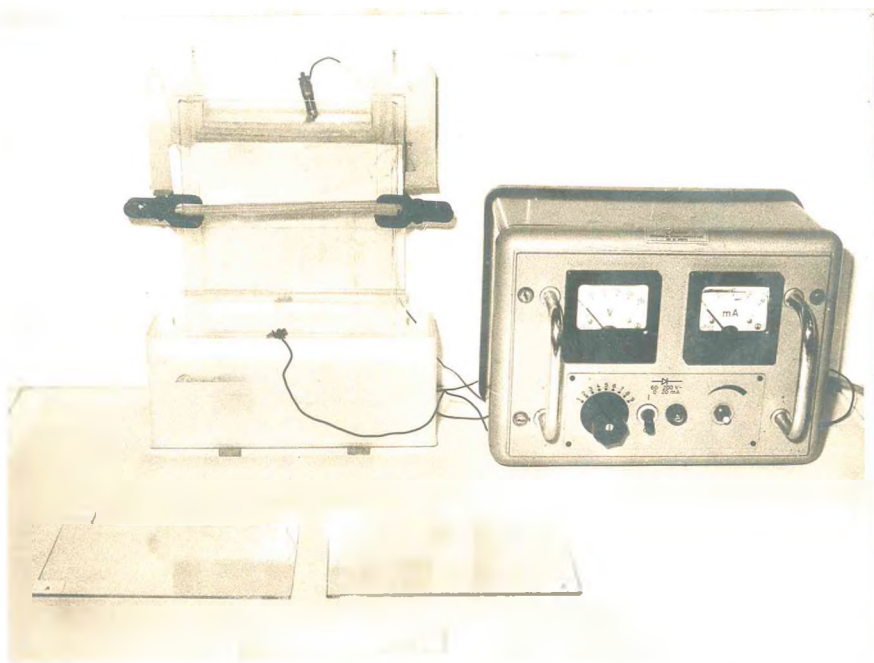
O processo eletroforético foi desenvolvido em câma

---

\* Notação de HJERTON (1962) para representar as concentrações de acrilamida e bis-acrilamida nos géis, onde T = peso total de monomeros/100ml de solução; C = quantidade de bis-acrilamida expressa com percentagem (p/p) da quantidade total dos monomeros.

FIGURA 2: Aparelho para eletroforese em placa de gel de poliacrilamida

Placas de vidro (A, B) que depois de acopladas com garras metálicas são preenchidas pela solução que forma o gel. Após o preenchimento das placas, um "pente" de acrílico (C) foi introduzido entre elas, formando "poços" após a polimerização do "gel" e retirada do pente.



ra fria a 0°C, utilizando-se uma corrente de 16mA, interrompida quando a banda de corante atingia uma distância de aproximadamente 5mm do término do gel. Este após ser retirado da placa, foi fixado e corado durante 30 minutos a 56°C, com uma solução de Coomassie Brilliant Blue (0,3g de Coomassie B. Blue, 9,0g de ácido sulfosalicílico e 30g de ácido tricloroacético dissolvidos em 75ml de metanol e 186ml de água) e descorado com lavagens sucessivas de uma solução constituída por água, etanol e ácido acético (65:25:8). (Vesterberg, 1972).

A conservação dos géis foi feita em uma solução de ácido acético a 7% (v/v).

#### 2.2.9 - Eletroforese em placa de gel de poliacrilamida com do decil sulfato de sódio

A eletroforese foi realizada de acordo com o método descrito por WEBER & OSBORN (1969), CARVALHO (1981), modificado.

Foram utilizados géis com T = 10,34% e C = 3,22%, preparados com proporções adequadas das soluções apresentadas no item 2.2.8 (Métodos), adicionados de 0,1% (p/v) de SDS.

As amostras foram diluídas na proporção de 1:1(v/v) com o tampão Tris-glicina pH 8,2 (0,012M de Tris e 0,095M de glicina), contendo 2% (p/v) de SDS e 2% (v/v) de  $\beta$  mercaptoetanol. A seguir, esta solução foi aquecida a 100°C, durante 3

minutos e colocadas nos "poços". As cubas de eletroforese continham tampão Tris-glicina, pH 8,2 (0,012M de Tris e 0,095M de glicina) com 0,1% (p/v) de SDS. O aparelho de eletroforese permaneceu à temperatura ambiente durante todo o experimento. A eletroforese foi desenvolvida com uma corrente de 16mA e interrompida após cerca de 4 horas de migração.

Os géis foram corados por 4 horas à temperatura ambiente com uma solução de Coomassie B. Blue 0.2% (p/v) em ácido acético, água, metanol (2:9:9) e descorados com lavagens sucessivas da mesma solução sem o corante, sendo conservados em uma solução de ácido acético a 7% (v/v).

#### 2.2.10 - Focalização isoelétrica em placa de sephadex G-25

A focalização foi realizada com o objetivo de determinar o ponto isoelétrico da enzima de acordo com o método descrito por RIGHETTI & DRYSDALE (1970) modificado.

O método baseia-se na separação de proteínas pela diferença no ponto isoelétrico, diferença conseguida devido ao estabelecimento de um gradiente de pH numa matriz (Camar-go, 1972), onde se faz migrar a preparação enzimática a ser analisada. O gradiente de pH é conseguido pela adição de uma substância anfótera (amfoline - LKB) à matriz (no caso, sephadex G-25) e estabelecendo-se uma diferença de potencial nas extremidades do aparelho que contém a preparação.



A "matriz" foi preparada com 2,0g de sephadex G-25 ao qual foi adicionado uma solução contendo 10% de glicerol e 1,5% de amfoline\*. Em seguida, adicionou-se 1,5ml da preparação proteica, a qual foi distribuída no aparelho - formado de uma placa de vidro com uma "escavação" em toda sua extensão e uma placa plana que se superpõe a parte "escavada" (conforme Fig.3). Nas extremidades da camada de sephadex, ou melhor da pasta preparativa, colocou-se pequenos pedaços de esponja contendo ácido sulfúrico 1M e hidróxido de sódio 1M, cuja finalidade foi a de estabelecer contato com os eletrodos.

A focalização foi realizada em câmara fria a 2°C, durante 24 horas.

O processo foi desenvolvido, utilizando-se uma voltagem em torno de 220V e uma corrente de 4mA. Entretanto, à medida em que ocorria a migração, a amperagem caía gradualmente enquanto a voltagem mantinha-se constante.

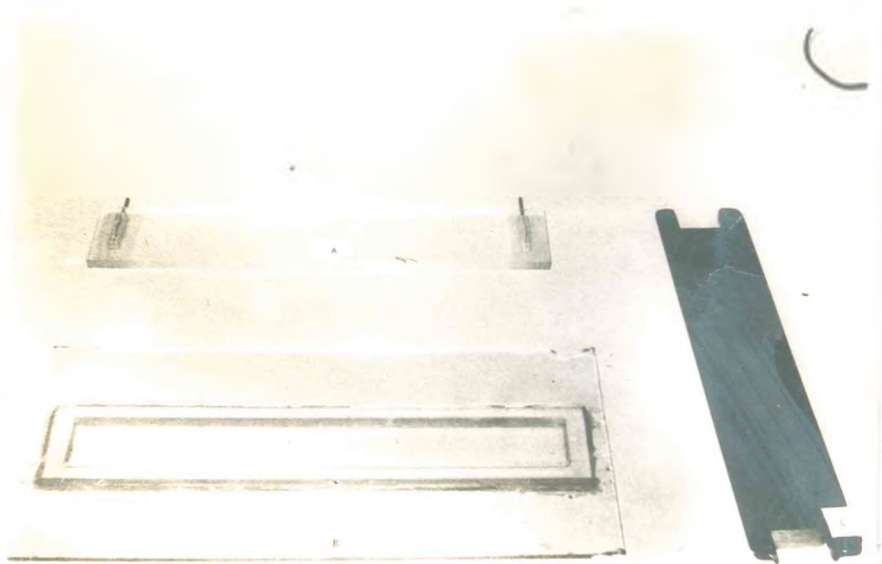
No término da focalização, a camada de sephadex G-25 foi dividida em 35 pedaços com 0,5cm de largura, com o auxílio de um pente de metal. A essas porções foram adicionadas 1,0ml de água bidestilada gelada e deaerada, filtrando-se em seguida através de tubos contendo filtro de teflon, com a ajuda de uma bomba de vácuo, determinando-se o pH do filtrado e adicionan-

---

\* A substância anfótera (amfoline) utilizada, produz um gradiente de pH no sephadex que varia entre 4 a 6.

FIGURA 3: Aparelho para focalização isoelétrica em sephadex G-25

Placa de vidro com "escavação" central central na qual foi distribuída a preparação proteica (A) e placa plana que se superpõe a parte escavada (B). Pente metálico (C), cuja finalidade é dividir o gel após a focalização.



do-se a cada fração 100 $\mu$ l de tampão Tris-HCl 0,5M, pH 7,5, contendo 1M de NaCl a fim de que pudessemos neutralizar as soluções e determinar a atividade enzimática destas.

#### 2.2.11 - Cromatografia em coluna de Sephadex G-200

A cromatografia em coluna de Sephadex G-200 foi realizada segundo metodologia descrita por ANDREWS (1970), FISCHER (1971), CARVALHO (1981). Sua finalidade principal foi a determinação do peso molecular da enzima purificada, utilizanando para isso padrão de proteínas, conforme descrição no item 3.3.1.1.

Inicialmente o pó de Sephadex G-200 foi adicionado em água deionizada, permanecendo em repouso durante 48 horas à temperatura ambiente, tempo suficiente para haver um entumescimento do gel. As partículas mais finas foram decantadas e o gel foi lavado várias vezes com água deionizada. Na última lavagem foi adicionado tampão Tris HCl 0,5M pH 7,5, contendo 1,0M de NaCl, na proporção 1:1 (volume do tampão: volume da suspensão do gel). Em seguida, uma coluna com dimensões de 2,5cm de diâmetro por 150cm de comprimento foi compactada com Sephadex G-200, por gravidade, a 4°C, tendo-se o cuidado para que a altura entre a superfície do líquido do topo da coluna e o fim do polietileno de escoamento do tampão da mesma, não ultrapassasse 10cm. A coluna foi lavada com tampão Tris -HCl 0,05N, pH 7,5, contendo 0,1M de NaCl, utilizando-se um fluxo

de 12ml/hora (aproximadamente 90% do fluxo de compactamento), obtido com o auxílio de uma bomba peristáltica.

Antes da aplicação da amostra, uma solução a 0,2% (p/v) de blue dextran 2.000 foi cromatografada com a finalidade de verificar-se possíveis defeitos de compactação do gel.

2.2.12 - Análise dos produtos de degradação da encefalina pelo analisador automático de aminoácidos e peptídeos

2.2.12.1 - Preparação das amostras

Após o tempo de incubação desejada, em 1ml do volume de reação contando com uma quantidade conhecida do substrato (encefalina), uma alíquota da enzima previamente ativada a 37°C por 10 minutos com ditioneitol ( $5 \times 10^{-4}M$ ) em tampão Tris-HCl 0,05M, pH 7,5, contendo 0,1M de NaCl, foi acrescentado tampão citrato de sódio 0,2M com polietileno glicol 15%. Alíquotas desta fração foram aplicadas no reservatório de amostras do analisador automático de aminoácidos e peptídeos.

2.2.12.2 - Análise dos aminoácidos originados da hidrólise enzimática da encefalina

A análise de aminoácidos foi realizada de acordo com o método de SPACKMAN et al (1958) modificado por CARVALHO (1984). Este método baseia-se na separação dos peptídeos por

8803013/12  
S S C 3

cromatografia de troca iônica e posterior quantificação do efluente da coluna por um processo fotométrico, fundamentado na cor originada da reação da ninidrina com os grupamentos - NH<sub>2</sub> dos peptídeos. Utilizou-se um registrador automático para as medidas de absorção feitas em 570 e 440 nm, em que a concentração do peptídeo é diretamente proporcional à área do pico obtido no registro cromatográfico. A identificação e quantificação dos produtos de hidrólise da encefalina eluídos da coluna, foram realizadas comparando-se o cromatograma da amostra com o cromatograma padrão (figura 4).

O cromatograma padrão foi obtido utilizando-se uma coluna de Aminex A-5, de dimensões 0,2 x 50cm, e desenvolvida a 55°C, a um fluxo de 0,15ml/min com tampões citrato de sódio 0,2M, pH 3,18 e pH 3,70.

FIGURA 4: Cromatografia de Glu, Tre, Ser, Asp, Pro, Gli, Ala, Cis, Val, Met, Isoleu, Leu, Tir, Fen

O cromatograma foi obtido com uma coluna de Aminex A-5, de dimensões 0,2 x 50cm, desenvolvida a 55°C, a um fluxo de 0,15ml/min, com tampões citrato de sódio 0,2M, pH 3,18 e pH 3,7. A amostra continha 3 nmoles de Glu, 3 nmoles de Tre, 3 nmoles de Ser, 3 nmoles de Asp, 3 nmoles de Pro, 3 nmoles de Gli, 3 nmoles de Ala, 1,5 nmoles de Cis, 3 nmoles de Val, 3 nmoles de Met, 3 nmoles de Isoleu, 3 nmoles de Leu, 3 nmoles de Tir, 3 nmoles de Fen.

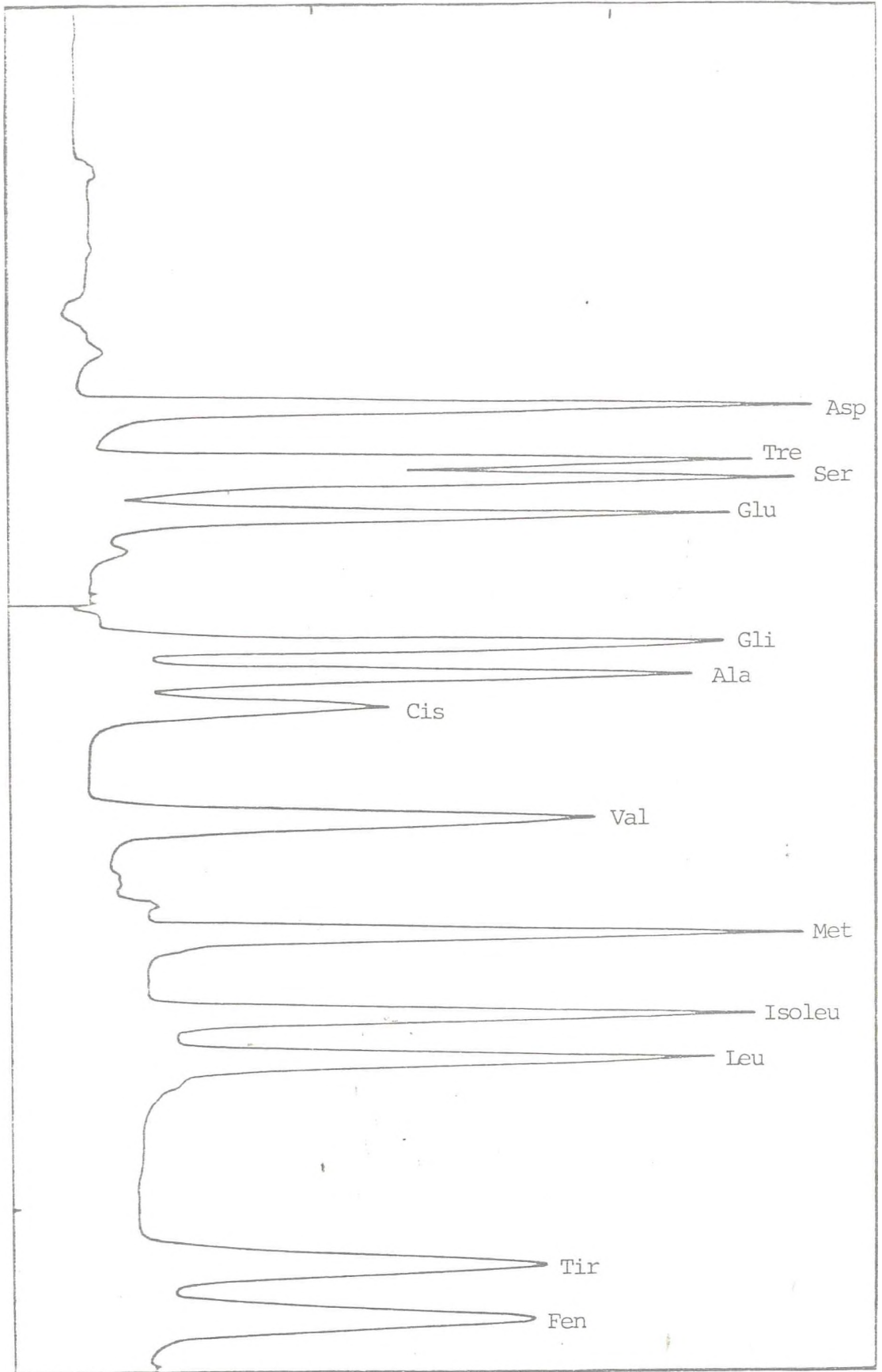
VOLUME EFLENTE (ML)

10

20

0,05

0,1





### 3 - RESULTADOS

#### 3.1 - Purificação da encefalinase de encéfalo humano

##### 3.1.1 - Extração enzimática

Após centrifugação do homogeneizado de encéfalos humanos, a fração sobrenadante apresentou 74% da atividade inicial, sendo purificada de 5,3 vezes. A fração correspondente ao precipitado, embora não conste na tabela 1, apresentou cerca de 26% da atividade inicial e um índice de purificação menor que aquele do próprio homogeneizado.

A quantificação enzimática do homogeneizado com tempo de "post mortem" variando entre 3-6 horas não apresentou diferença significativa.

##### 3.1.2 - Cromatografia de troca iônica em coluna de DEAE celulose (DE-52)

A figura 5 apresenta o perfil cromatográfico da coluna de DEAE celulose (DE-52) da fração sobrenadante 25.000 x g x 90 minutos, submetida previamente à diálise em tampão Tris HCl 0,05N, pH 7,5, contendo  $\beta$  mercaptoetanol ( $10^{-3}$ M) e realizada por aumentos discretos da força iônica dos tampões eluentes

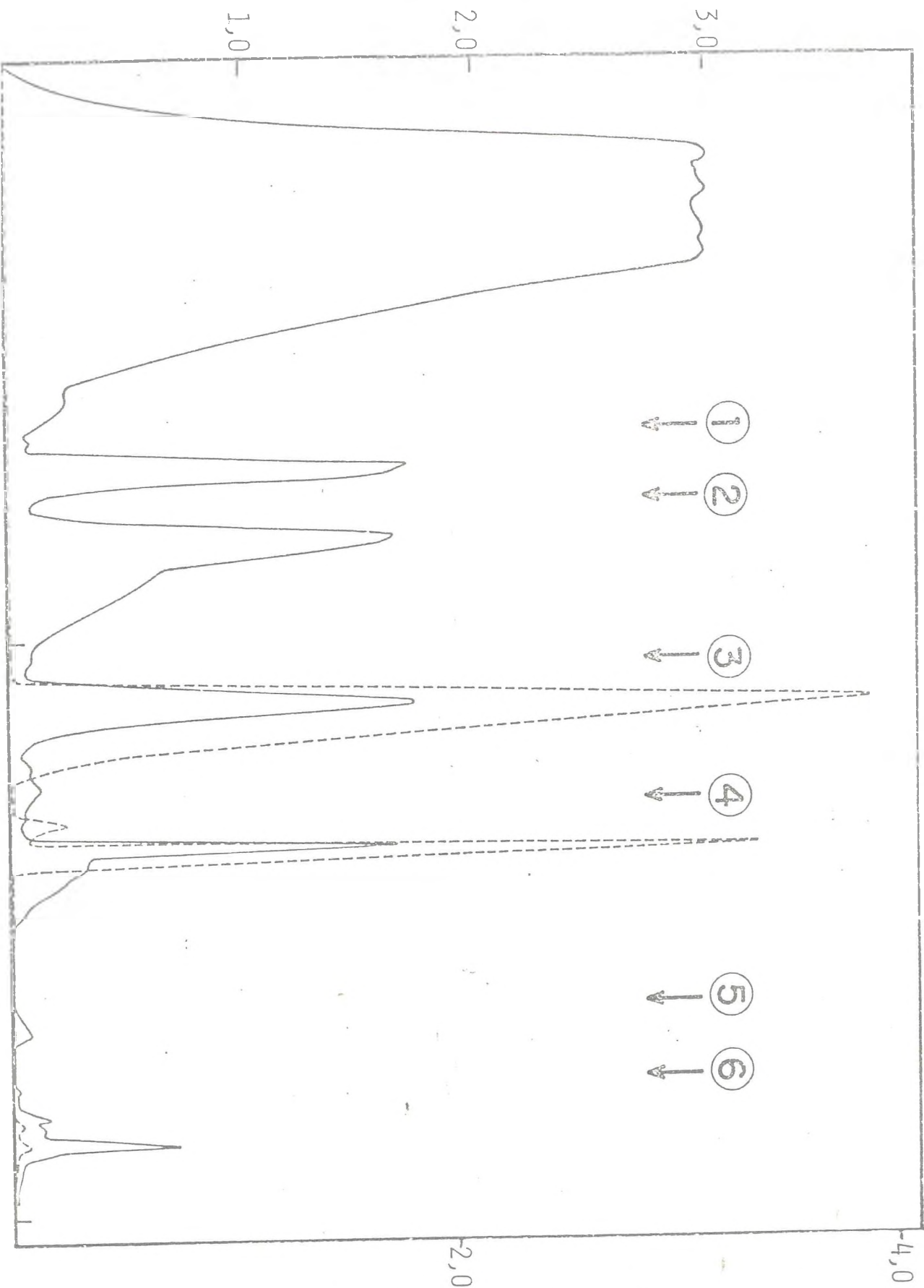
FIGURA 5: Cromatografia em coluna de DEAE-celulose (DE-52)

A coluna, com dimensões de 2,6cm de diâmetro e 30cm de comprimento, foi equilibrada com tampão Tris-HCl 0,05M, pH 7,5 e desenvolvida a 4°C, com o fluxo de 72ml por hora.

A amostra foi dialisada contra o mesmo tampão de equilíbrio da coluna e mediou um volume de 3500ml contendo 125263,6 nmol hidrolisado x 60min x 10<sup>3</sup> de atividade enzimática e 11568mg de proteína.

Após a aplicação da amostra, a cromatografia foi desenvolvida por aumentos discretos da força iônica, cujas setas indicam o local da mudança dos tampões utilizados, que foram Tris-HCl 0,05M, pH 7,5 contendo NaCl nas seguintes concentrações, respectivamente: 0,05; 0,07; 0,1; 0,15; 0,3 e 1,0M de NaCl.

As frações de números 275 a 284 e 338 a 345 foram reunidas para a formação dos "pools" de atividade enzimática, os quais foram concentrados a 4°C, por ultrafiltração sob pressão reduzida. A determinação da atividade enzimática do eluente da coluna foi realizada de acordo com método de GOLD BARG et al (1959) modificado (ver métodos).



ATIVIDADE ENZIMATICA x 10<sup>3</sup> (---)

NMOLES TIR-β-NAFTILAMIDA HIDROLISADA / 60MIN/ML

TABELA 1: Purificação e recuperação da atividade enzimática de encéfalo humano

Etapas de purificação	Atividade total nmoles hidrolizado x 60min/ml (x 10 <sup>3</sup> )	Proteína total (mg)	Recuperação proteína (%)	Recuperação atividade (%)	Atividade específica	Purificação
Homogeneizado	168705	82650	100	100	2,04	1
Sobrenadante 25000 x g 90min	125263,6	11568	13,9	74,25	10,82	5,3
DEAE celulose <sup>-</sup>						
"pool I" (100mM)	24309,1	276,8	0,33	14,4	87,82	43
"pool II" (150mM)	20386,7	231,4	0,27	12,08	88,10	43
ELETROFORESE						
"pool I" (100mM)						
"pool I"	8855,5	2,08	0,005	5,3	4257,4	2084
"pool II"	3879,0	4,0	0,009	2,3	967,5	473,5
ELETROFORESE						
"pool II" (150mM)						
"pool I"	6198,8	2,08	0,005	3,7	2980	1458,5
"pool II"	2709,0	4,0	0,009	1,6	677,2	331,5

(Martins et al, 1980; Carvalho, 1981).

O cromatograma demonstra que:

- . a maior parte das proteínas aplicadas à coluna de DEAE não foram adsorvidas.
- . as frações que continham proteínas não adsorvidas, não possuíam atividade enzimática.
- . a maior parte da atividade enzimática foi eluída com tampões Tris-HCl 0,05N, pH 7,5, contendo 0,1 e 0,15M de NaCl.

A recuperação e o grau de purificação da atividade enzimática desde a homogeneização encontra-se na tabela 1, on de pode ser observado que:

- . a recuperação da atividade enzimática do sobrena dante foi cerca de 11% em relação ao homogeneizado.
- . o grau de purificação foi crescente.
- . o "pool" principal da coluna de DEAE foi purifica do cerca de 43 vezes em relação ao homogeneizado.

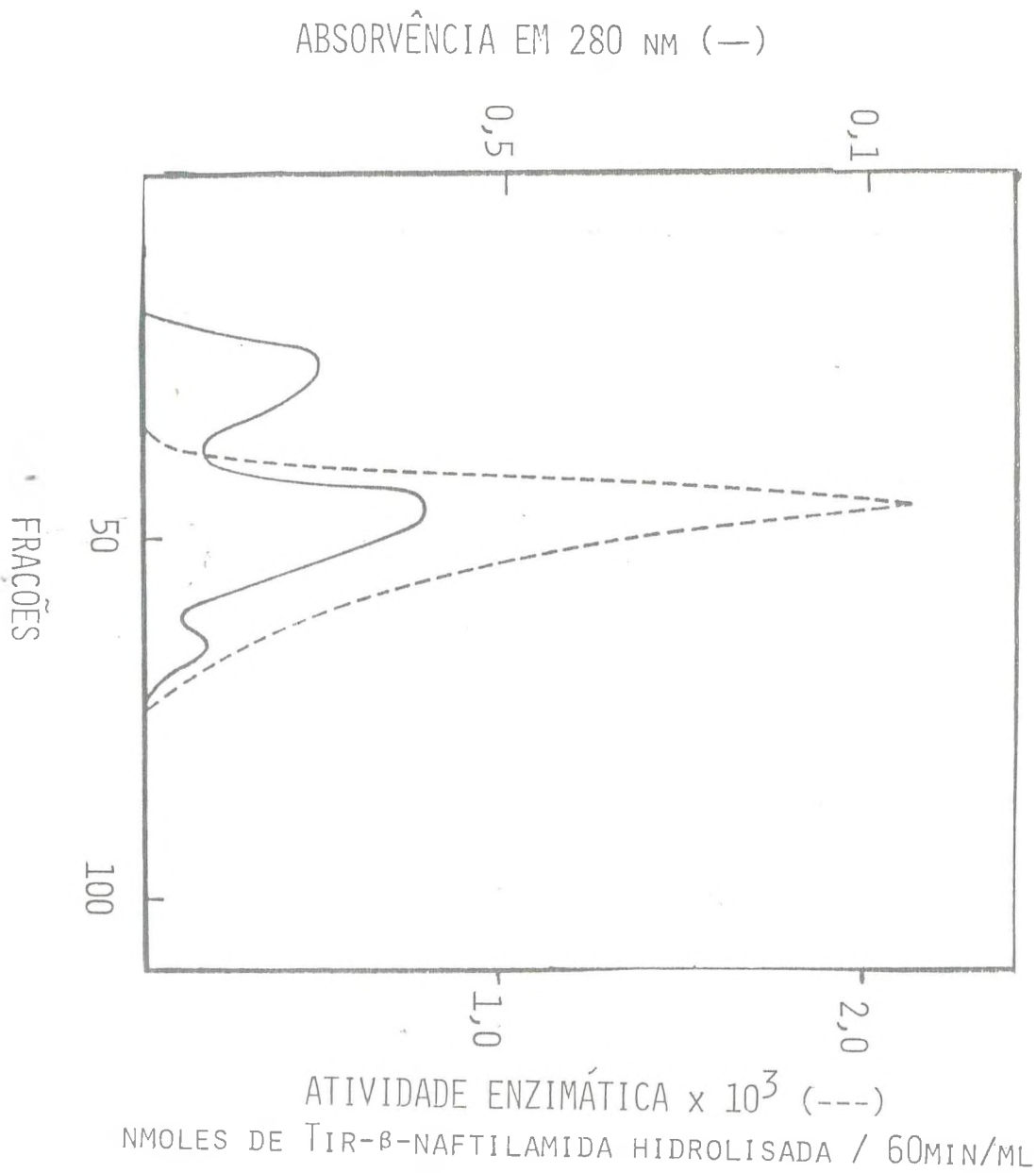
### 3.1.3 - Eletroforese preparativa em coluna de gel de poliacri lamida

O "pool" I da coluna de DEAE - celulose foi dividido em volumes iguais e submetidos separadamente à eletroforese preparativa em coluna de gel de poliacrilamida, conseguindo-se

FIGURA 6: Eletroforese preparativa em coluna de gel de poliacrilamida

A eletroforese foi realizada de acordo com métodos descrito por CARVALHO (1981). A coluna de gel (T = 10,34% e C = 3,22%) apresentou dimensões de 4,0cm de diâmetro e 10cm de comprimento. As cubas superior e inferior continham tampão Tris-glicina pH 8,2. O fluxo na câmara de eluição foi de 5ml/hora (1,66/ml/fração/20 minutos). Após uma pré-corrida de 20 horas com uma corrente de 20mA, para eliminar possíveis impurezas do gel, uma alíquota do "pool I" obtido da cromatografia em DEAE celulose, foi adicionada ao topo do gel lentamente, com o auxílio de uma bomba peristáltica.

A atividade das frações eluídas na eletroforese foram determinadas de acordo com métodos de GOLDBARG et al (1959) modificado. Em seguida as frações de números 43 a 50 foram reunidas em um "pool" de atividade enzimática que foi concentrado por ultrafiltração a 4°C.



resultados reproduzíveis.

A figura 6 apresenta o perfil cromatográfico do "pool" I submetido à eletroforese. Observa-se a presença de três picos de proteínas e um pico de atividade enzimática.

A tabela 1 apresenta o grau de recuperação e purificação dos "pools" I e II da coluna de DEAE, submetidos à eletroforese. Verificou-se que o "pool" I da coluna de DEAE submetido à eletroforese foi purificado cerca de 2084 vezes, enquanto o "pool" II foi purificado cerca de 1458 vezes.

### 3.2 - Avaliação do grau de pureza da encefalinase

#### 3.2.1 - Eletroforese analítica em placa de gel de poliacrilada

A figura 7 apresenta a eletroforese analítica em placa de gel de poliacrilamida da encefalinase purificada: uma única banda de proteína foi indentificada.

#### 3.2.2 - Eletroforese em placa de gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS)

A figura 8 mostra a eletroforese em placa de gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS) da encefalinase purificada: uma única banda de proteína foi identificada.



FIGURA 7: Eletroforese analítica em placa de gel de poliacrilamida

A eletroforese foi realizada conforme descrito em métodos. A amostra continha 25 $\mu$ g da enzima purificada.



FIGURA 8: Eletroforese em placa de gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio

A eletroforese foi realizada conforme descrito em métodos. A amostra continha 25 $\mu$ g da enzima purificada.



### 3.2.3 - Focalização isoelétrica em sephadex G-25

A figura 9 mostra a focalização isoelétrica em sephadex G-25, contendo 2% de amfoline na faixa de pH 4-6, da encefalinase purificada: um único pico de atividade enzimática foi identificado.

## 3.3 - Propriedades da enzima purificada

### 3.3.1 - Determinação do peso molecular

Para determinar o peso molecular foram utilizados a cromatografia em coluna de sephadex G-200 (Andrews, 1970) e a eletroforese em placa de gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (Weber & Osborn, 1969).

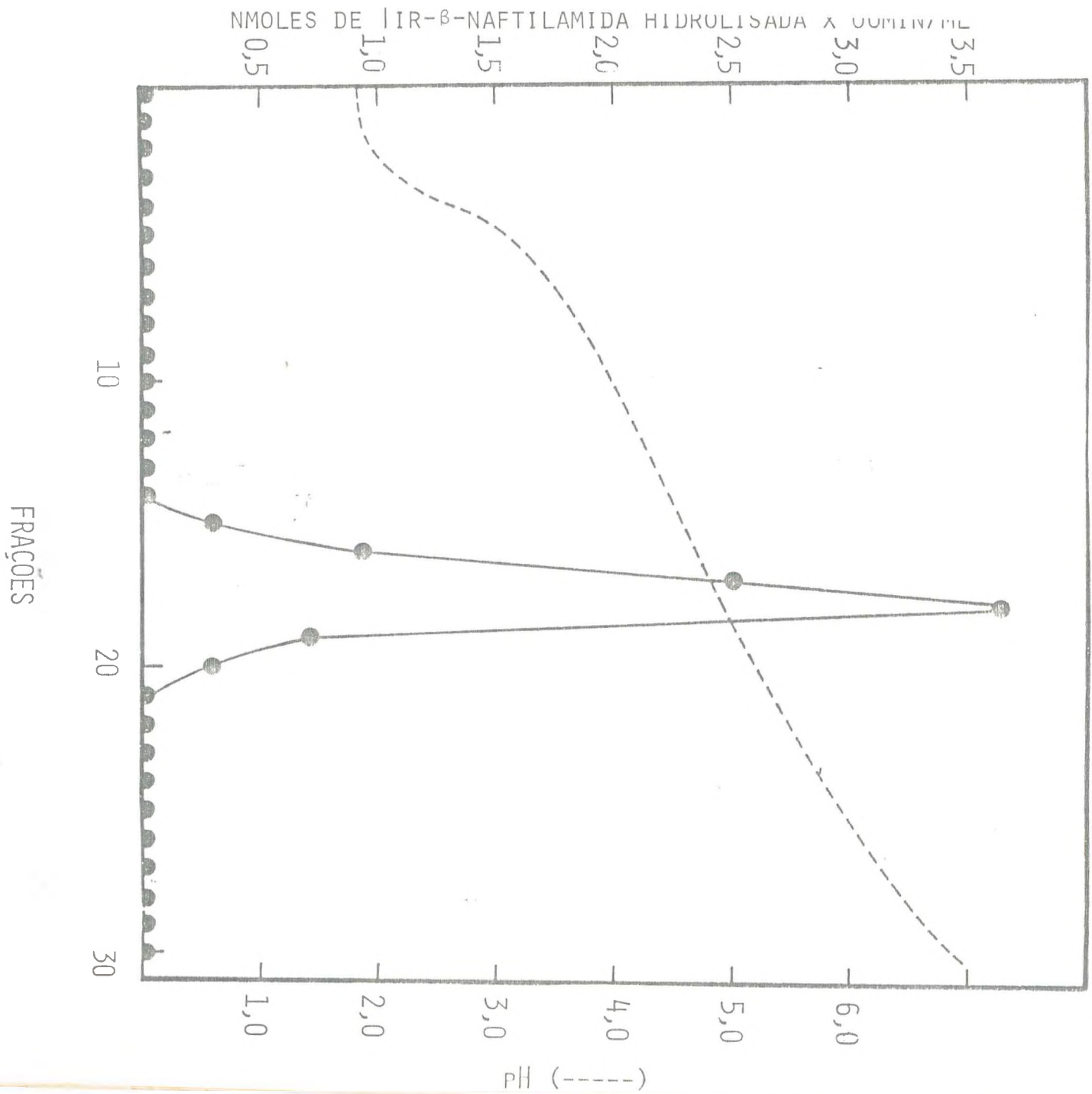
#### 3.3.1.1 - Cromatografia em coluna de sephadex G-200

As seguintes proteínas puras foram utilizadas como padrões para a determinação do peso molecular: albumina bovina (p.m. 68.000), ovoalbumina (p.m. 45.000), gama-globulina (p.m. 150.000). Um "pool" medindo um volume de 2ml foi formado pela dissolução de 10mg de cada uma das proteínas citadas acima em Tris-HCl 0,05N, pH 7,5, contendo 0,1M de NaCl e a seguir submetido à cromatografia em sephadex G-200.

Colocando-se em um gráfico os logaritmos dos pesos

FIGURA 9: Determinação do ponto isoelétrico da enzima purificada por focalização isoelétrica em sephadex G-25

A focalização isoelétrica em sephadex G-25 foi realizada conforme descrito em métodos, identificando-se um único pico de atividade na região de pH 4,9.



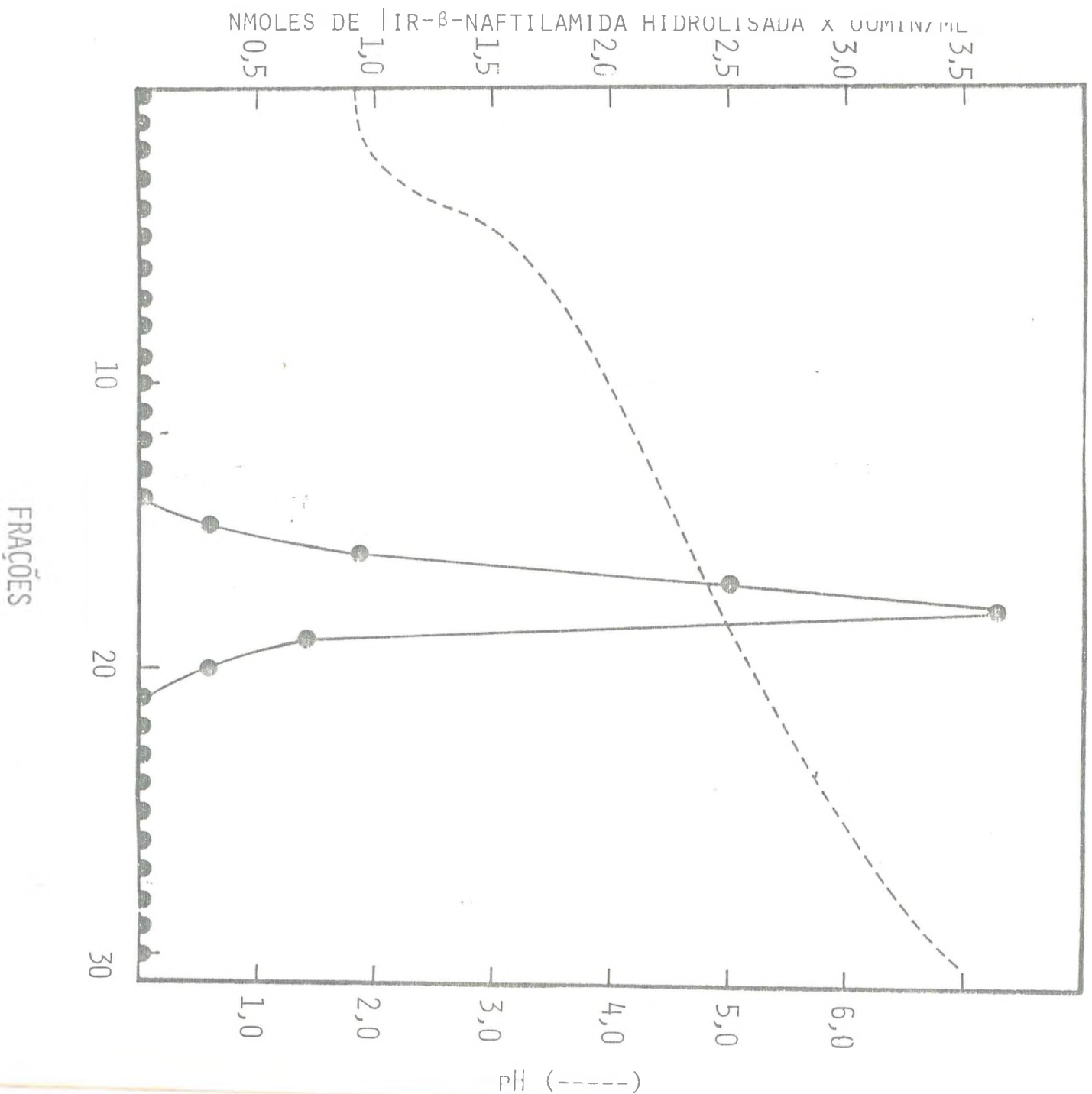
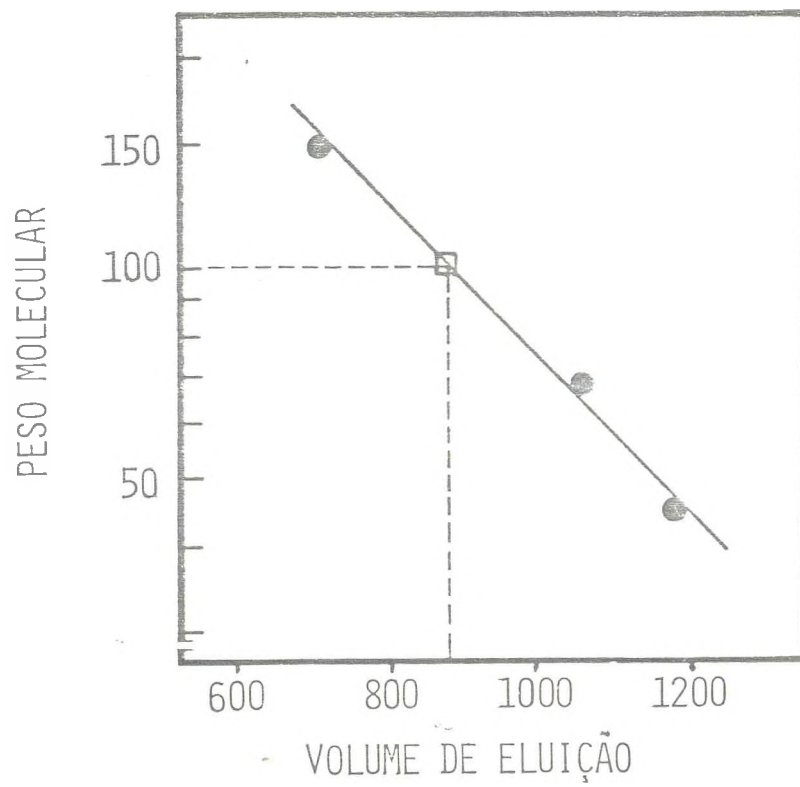




FIGURA 10: Determinação do peso molecular da encefalinase por cromatografia em coluna de sephadex G-200

A cromatografia foi realizada conforme descrição em métodos.

A estimativa do peso molecular foi calculada colocando-se no gráfico os logaritmos dos pesos moleculares na ordenada e as mobilidades relativas, na abscissa, encontrando-se uma relação linear para os pontos obtidos. Neste caso, o peso molecular foi estimado em torno de 100000 daltons.



moleculares na ordenada e as mobilidades relativas na abcissa pode-se encontrar uma relação linear para os pontos obtidos. Neste caso, o peso molecular foi estimado em torno de 100.000 daltons (figura 10).

### 3.3.1.2 - Eletroforese em placa de gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS)

As seguintes proteínas puras foram utilizadas como padrões para a determinação do peso molecular por eletroforese em placa de gel de poliacrilamida com SDS: albumina bovina (68.000), ovoalbumina (p.m. 45.000). Estas proteínas foram dissolvidas em tampão Tris-glicina, pH 8,2 contendo 1% de SDS e 1% de  $\beta$ -mercaptoetanol, em quantidade suficiente para uma concentração de cada uma delas de 1mg/ml. Este "pool" foi aquecido em banho maria a 100°C por 5 minutos.

Uma alíquota de 25 $\mu$ l deste "pool", contendo 50 $\mu$ g de cada proteína, foi submetida à eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS.

Terminada a eletroforese, os cálculos da migração das proteínas citadas acima foram feitos pela seguinte fórmula:

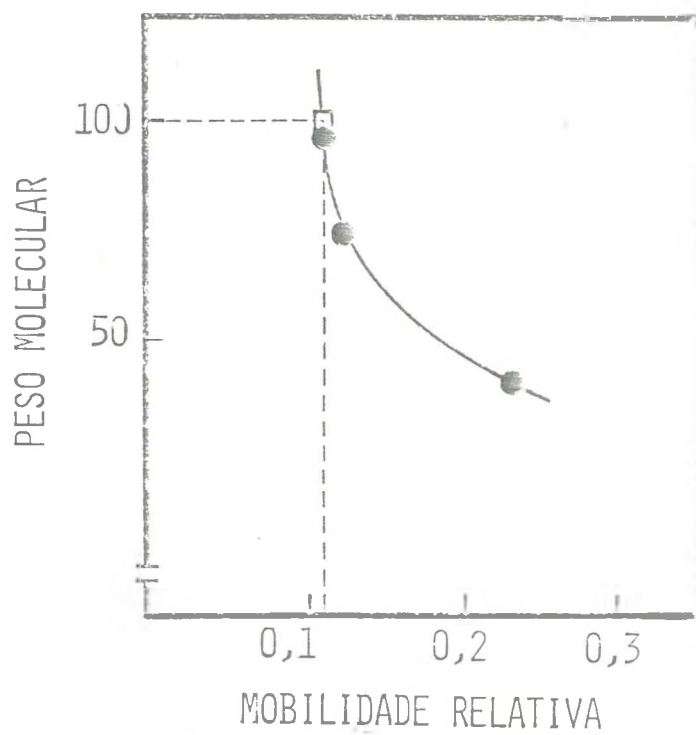
$$\text{Mobilidade relativa} = \frac{\text{distância da proteína da origem (mm)}}{\text{distância do corante da origem (mm)}}$$

Colocando-se em um gráfico os logaritmos dos pesos moleculares na ordenada e as mobilidade relativas na abscis

FIGURA 11: Determinação do peso molecular da enzima purificada por eletrofores em gel de poliacrilamida com SDS

A eletrofores foi realizada conforme descrição em métodos.

A estimativa do peso molecular foi calculada colocando-se no gráfico os logarítmos dos pesos moleculares na ordenada e as mobilidades relativas na abscissa, encontrando-se uma relação linear para os pontos obtidos.



sa, pode-se encontrar uma relação linear para os pontos obtidos (Weber & Osborn, 1969). O peso molecular foi estimado em torno de 100000 daltons (figura 11).

### 3.3.2 - Determinação do ponto isoelétrico

A figura 9 apresenta a focalização isoelétrica em placa de sephadex G-25. Conforme acha-se ilustrado, foi encontrado um único pico de atividade na região de pH 4,9.

### 3.3.3 - Determinação do pH ótimo

A figura 12 apresenta a variação do pH do meio de incubação para a atividade da encefalinase de encéfalo humano purificada.

A faixa de pH compreendida entre 5 e 8 foi obtida com tampões fosfato do Sorensen.

O valor de pH ótimo para a atividade da encefalinase utilizando substrato Tir- $\beta$ -naftilamida foi 7,5.

### 3.3.4 - Determinação da constante de Michaelis ( $K_m$ )

As figuras 13, 14 e 15 apresentam a variação da velocidade de reação em função da concentração do substrato do meio de incubação para quantidades determinadas da enzima pura, utilizando-se como substratos Lis- $\beta$ -naftilamida e Tir-

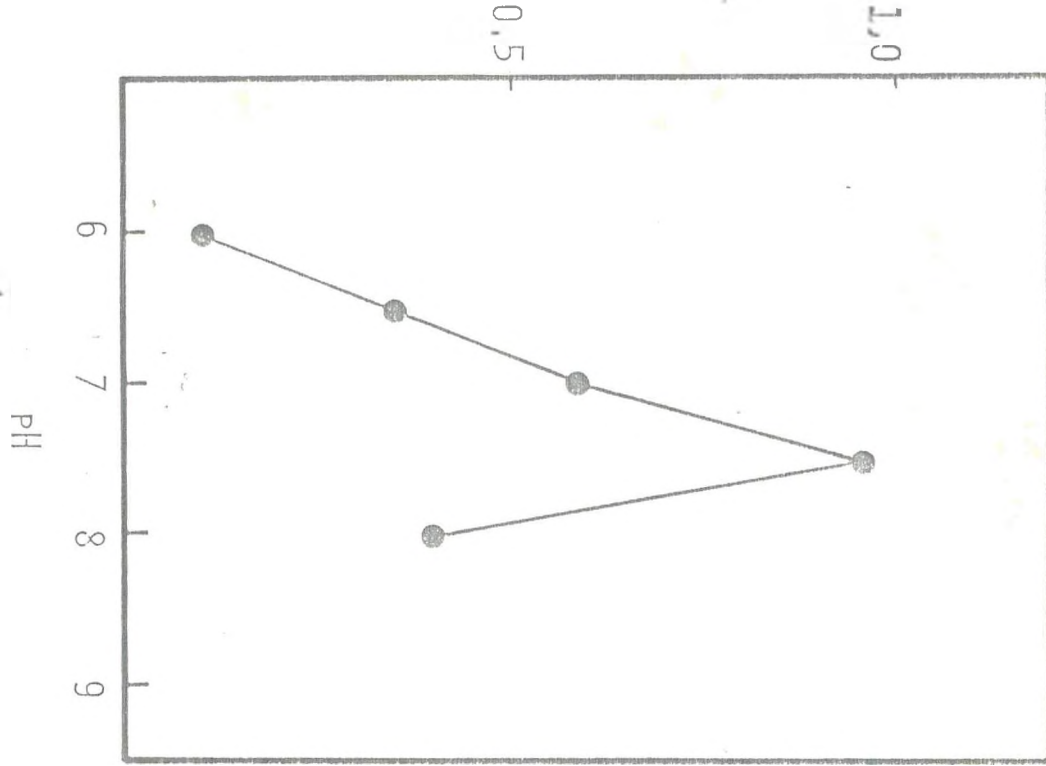
FIGURA 12: Determinação do pH ótimo para a atividade encefalínica purificada

A faixa de pH compreendida entre 5 e 8 foi obtida com tampões fosfato de Sorensen.

O meio de reação continha: uma alíquota da enzima previamente ativada por 10 minutos, a 37°C, com DTT e Tir- $\beta$ -naftilamida nos tampões fosfato de Sorensen com os diversos valores de pH apresentados acima. A quantificação da atividade de enzimática foi realizada conforme descrito em métodos.

# ATIVIDADE ENZIMÁTICA

NMOLES DE TIR- $\beta$ -NAFTILAMIDA HIDROLISADA X 60MIN/ML



R624755 / 91



FIGURA 13: Determinação da constante de Michaelis ( $K_m$ ) para Lis- $\beta$ -naftilamida

A constante de Michaelis ( $K_m$ ) foi determinada de acordo com o método de LINEAWER BURK.

O meio de reação continha: uma alíquota da enzima pura previamente ativada por 10 minutos, a 37°C, com DTT e várias concentrações de Lis- $\beta$ -naftilamida em tampão Tris-HCl 0,05N, pH 7,5, contendo 0,1N de NaCl.

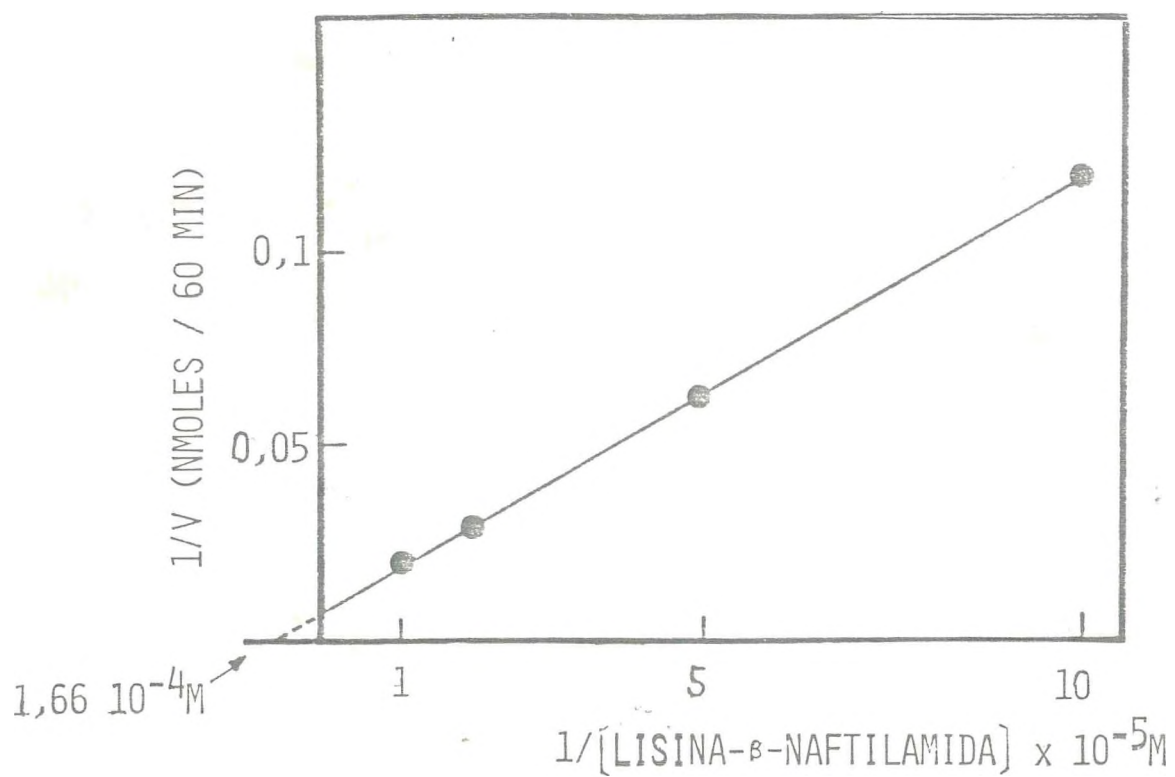
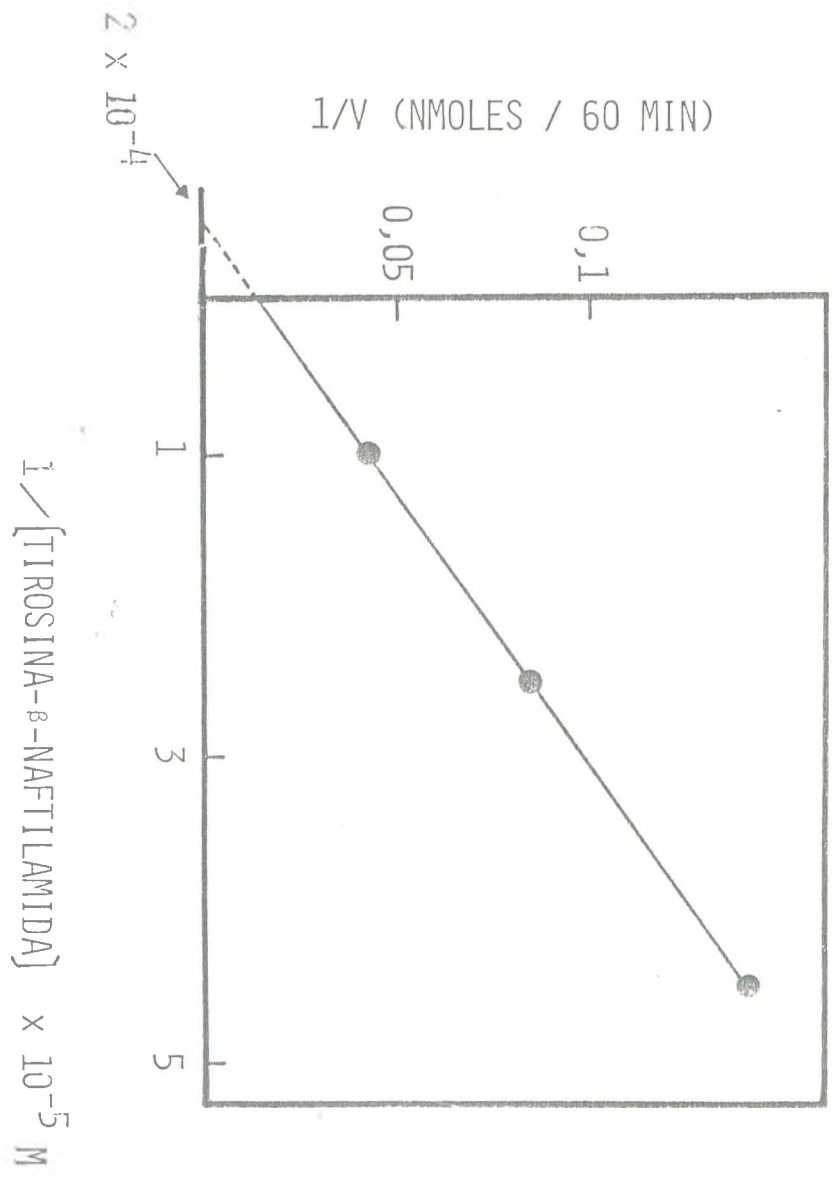


FIGURA 14: Determinação da constante de Michaelis para a Tir-B-naftilamida

A constante de Michaelis ( $K_m$ ) foi determinada de acordo com o método de LINEAWER BURK (1934).

O meio de reação continha: uma alíquota da enzima pura previamente ativada por 10 minutos, a 37°C, com DTT e várias concentrações de Tir-B-naftilamida em tampão Tris-HCl 0,05N, pH 7,5, contendo 0,1M de NaCl.



$\beta$ -naftilamida e Met-encefalina. A constante de Michaelis ( $K_m$ ) foi determinada através do método de LINEAWER BURK (1934).

A encefalinase apresentou os seguintes valores de  $K_m$ :  $2,0 \times 10^{-4}$  para a Tir- $\beta$ -naftilamida,  $1,66 \times 10^{-4}$  para a Lis- $\beta$ -naftilamida e  $4,16 \times 10^{-5}$  M para Met-encefalina.

### 3.3.5 - Inativação por metais pesados

A tabela 2 e a figura 16 apresentam a inativação da enzima pura quando incubada com cloreto de zinco, cloreto de níquel, cloreto de manganês, cloreto de cobre em diversas concentrações.

### 3.3.6 - Inibidores enzimáticos

A tabela 3 apresenta a inativação da enzima pura incubada com puromicina, bacitracina, paraminomercurioacetato e com o agente quelante EDTA em várias concentrações. A figura 17 apresenta a inativação da enzima incubada com bacitracina e p-aminomercurioacetato.

### 3.3.7 - Determinação da constante de inibição para a puromicina ( $K_i$ )

A figura 18 apresenta a constante de inibição para a puromicina que foi cerca de  $2,5 \times 10^{-5}$  M.

FIGURA 15: Determinação da constante de Michaelis para a Met-encefalina

A constante de Michaelis ( $K_m$ ) foi determinada de acordo com o método de LINEAWER BURK (1934).

O meio de reação continha: uma alíquota da enzima pura previamente ativada por 10 minutos, a 37°C, com DTT e várias concentrações de Met-encefalina em tampão Tris-HCl 0,05N, pH 7,5, contendo 0,1M de NaCl.

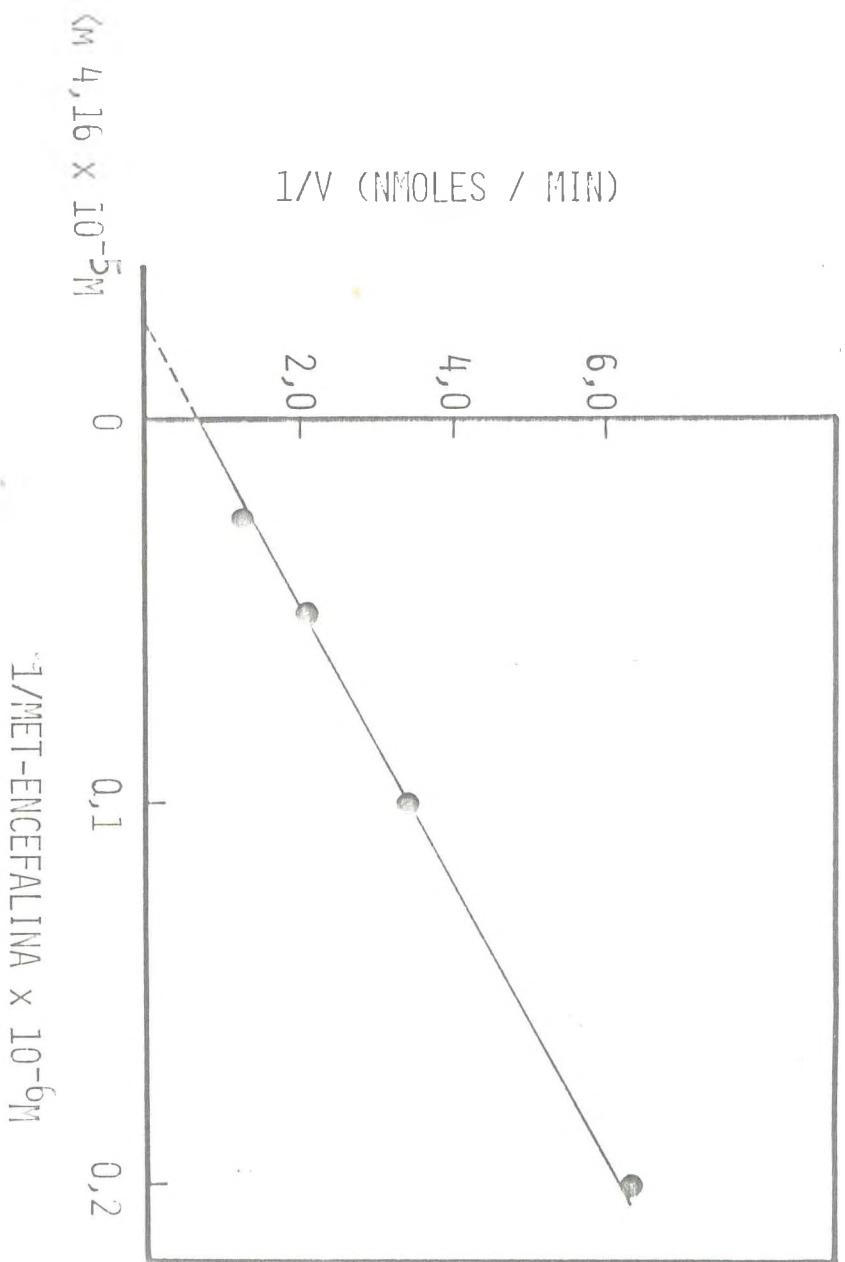


TABELA 2: Efeitos dos metais pesados sobre a encefalinase purificada de encéfalo humano

Ion	Conc. (M)	Inibição (%)
Cu <sup>++</sup>	10 <sup>-3</sup>	100
	10 <sup>-4</sup>	91
	10 <sup>-5</sup>	31,5
Zn <sup>++</sup>	10 <sup>-3</sup>	96,7
	10 <sup>-4</sup>	86,6
	10 <sup>-5</sup>	72,2
Ni <sup>++</sup>	10 <sup>-3</sup>	67,8
	10 <sup>-4</sup>	61,1
	10 <sup>-5</sup>	22,2
Mn <sup>++</sup>	10 <sup>-3</sup>	22,2
	10 <sup>-4</sup>	16,6
	10 <sup>-5</sup>	6,1
Fe <sup>++</sup>	10 <sup>-3</sup>	15,0
	10 <sup>-4</sup>	11,0
	10 <sup>-5</sup>	11,0
Co <sup>++</sup>	10 <sup>-3</sup>	19,5
	10 <sup>-4</sup>	16,2

O meio de incubação continha 0,25ml de íon dissolvido em diversas concentrações, uma alíquota da enzima e 0,25ml de substrato Tir-β-naftilamida. A quantificação enzimática foi realizada conforme descrito em métodos.



FIGURA 16: Efeitos dos íons metálicos na atividade enzimática purificada de encéfalo humano

A atividade enzimática para hidrolisar Tir- $\beta$ -nafilamida, não tratada por íons metálicos foi tomada como 100%.

Zn<sup>++</sup> ● , Ni<sup>++</sup> □ , Mn<sup>++</sup> ▲ , Cu<sup>++</sup> ○

O meio de reação continha: uma alíquota da enzima, 0,25ml dos íons citados acima, dissolvidos em tampão Tris HCl 0,05N contendo 0,1M de NaCl, e 0,25ml de substrato  $\beta$ -nafilamida.

A quantificação da atividade enzimática foi determinada pelo método de GOLDBARG (ver métodos).

PERCENTAGEM DA ATIVIDADE ORIGINAL  
NMOLES DE TIR- $\beta$ -NAFTILAMIDA HIDROLIS. / 60MIN

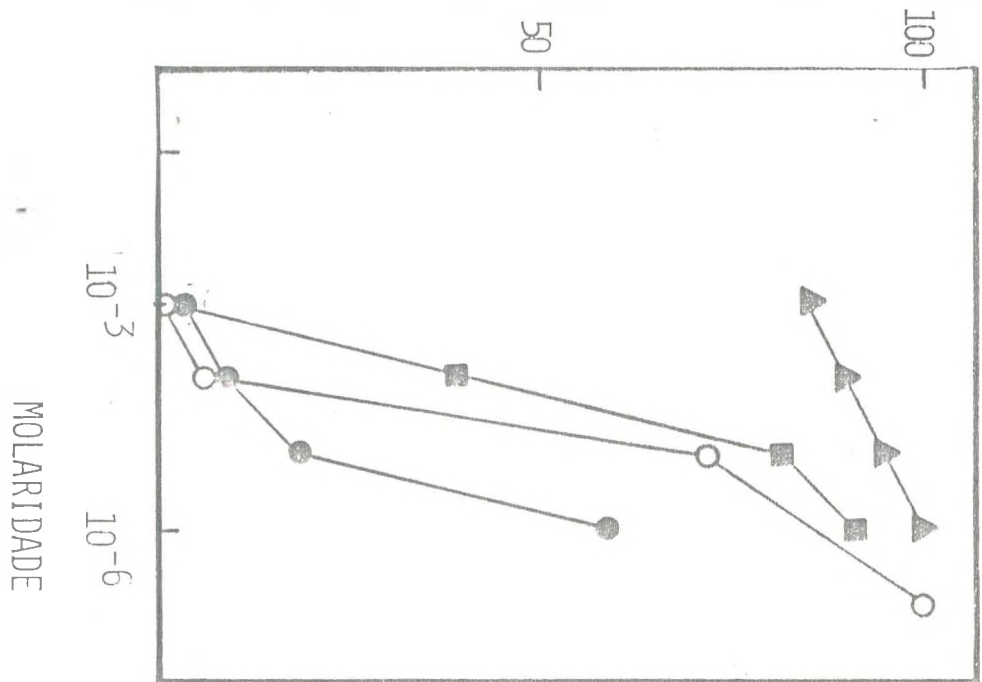


TABELA 3: Efeitos dos inibidores enzimáticos sobre a encefalinasse purificada de encéfalo humano

Inibidor	Conc. (M)	Inibição %
Bacitracina	$10^{-3}$	83
	$10^{-4}$	71,4
	$10^{-5}$	31,8
Puromicina	$10^{-3}$	74,9
	$10^{-4}$	43,5
	$10^{-5}$	7,5
p-aminomercurioacetato	$10^{-3}$	47,7
	$10^{-4}$	21,4
	$10^{-5}$	18,9
PMSF	$10^{-3}$	5,3
	$10^{-4}$	1,0
	$10^{-5}$	0
EDTA	$10^{-3}$	1,09
	$10^{-4}$	0

O meio de incubação continha 0,25ml de inibidor dissolvido em várias concentrações, uma alíquota da enzima e 0,25ml do substrato Tir- $\beta$ -naftilamida. A quantificação enzimática foi realizada conforme descrito em métodos.

FIGURA 17: Efeito do p-aminomercurioacetato e da bacitracina na enzima purificada

A enzima não tratada com estes inibidores foi tomada como possuindo 100% de atividade enzimática.

O meio de reação continha: uma alíquota da enzima, 0,25ml das substâncias citadas dissolvidas em tampão Tris-HCl 0,05N contendo 0,1M de NaCl, e 0,25ml de substrato  $\beta$ -naftilamida.

A quantificação da atividade enzimática foi determinada pelo método de GOLDBARG (1959) modificado.

PERCENTAGEM DA ATIVIDADE ORIGINAL  
NMOLES HIDROLISADO DE TIR- $\beta$ -NAFTILAMIDA / 60MIN

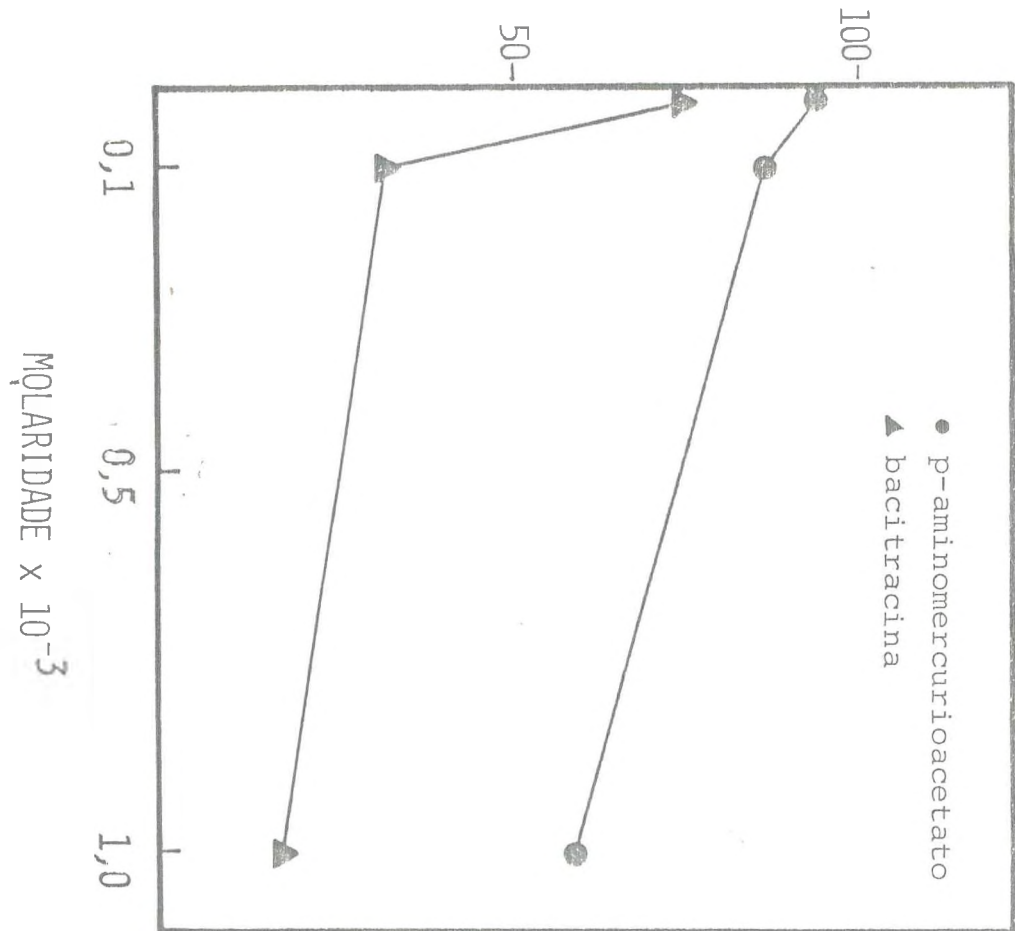
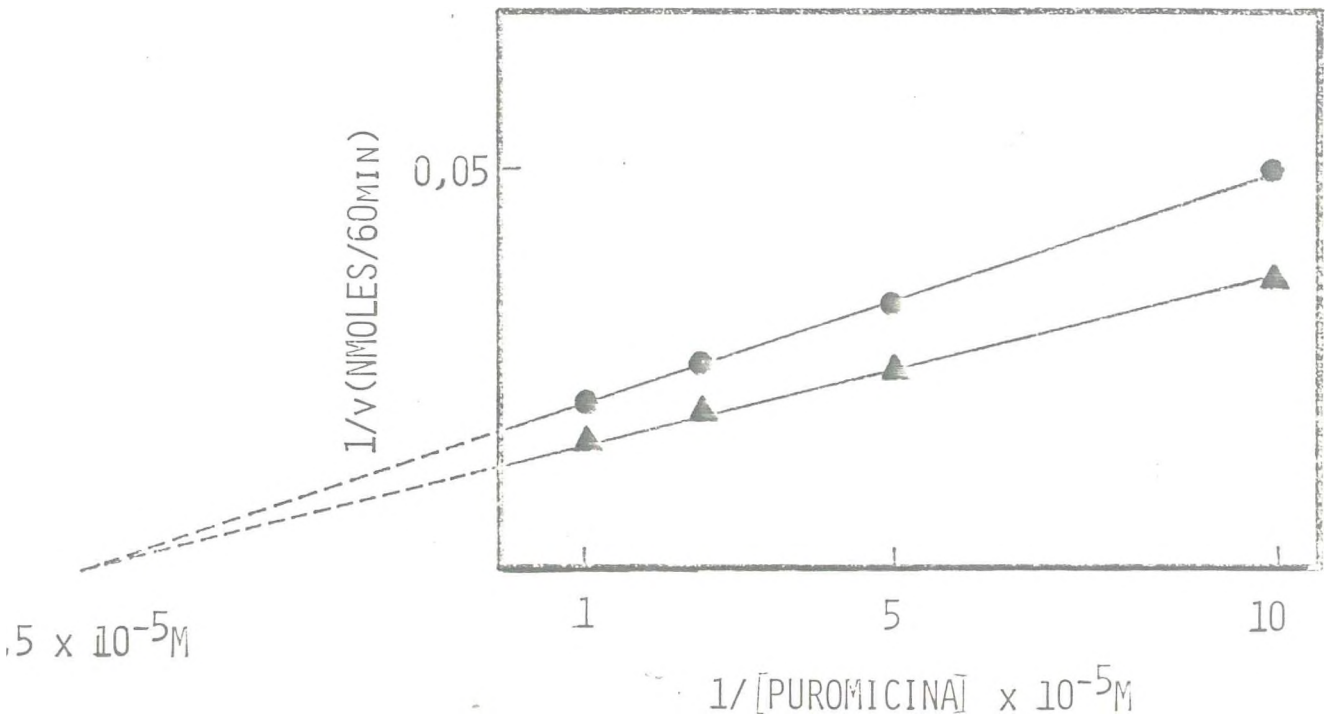


FIGURA 18 Determinação da constante de inibição para puromicina

O meio de incubação continha: uma alíquota da enzima, puromicina dissolvida em tampões Tris-HCl 0,05N contendo 0,1M de NaCl.

Meio de incubação (descrito em métodos) continha:  
▲ - ▲ apenas enzima e ● - ● enzima mais puromicina em várias concentrações.



### 3.3.8 - Efeito do ditioneitol sobre a encefalinase

A tabela 4 e a figura 19 apresentam a ativação da enzima quando incubada com ditioneitol (DTT) em várias concentrações (Cleland, 1964). O máximo de ativação obtido foi 94% com a concentração de  $1 \times 10^{-3}$  M de DTT.

### 3.3.9 - Degradação enzimática da encefalina pela enzima purificada

O único produto de hidrólise identificado após a incubação da encefalinase purificada com a Met-encefalina foi a tirosina. A figura 20 apresenta as quantidades de tirosina liberadas do meio de incubação em diversos tempos. Observa-se também que não ocorreu liberação de outros aminoácidos.



TABELA 4: Efeitos do Ditionotreitól sobre a enzima purificada

	Conc. (M)	Ativação (%)
DTT	$1 \times 10^{-3}$	94,1
	$0,5 \times 10^{-3}$	91
	$1,0 \times 10^{-4}$	76,1
	$1,0 \times 10^{-5}$	65,2
	$1,0 \times 10^{-6}$	55,2

O meio de incubação continha 0,25ml do DTT dissolvido em várias concentrações, uma alíquota da enzima e 0,25ml do subtrato Tir-β-naftilamida. A quantificação enzimática foi realizada conforme descrito em métodos.

FIGURA 19: Efeito do Ditiotreitól (DTT) sobre a enzima purifi-  
cada

O meio de incubação continha: uma alíquota da enzi-  
ma, 0,25ml de tampão Tris-HCl 0,05N contendo 0,1N de NaCl, di-  
tiotreitól em várias concentrações.

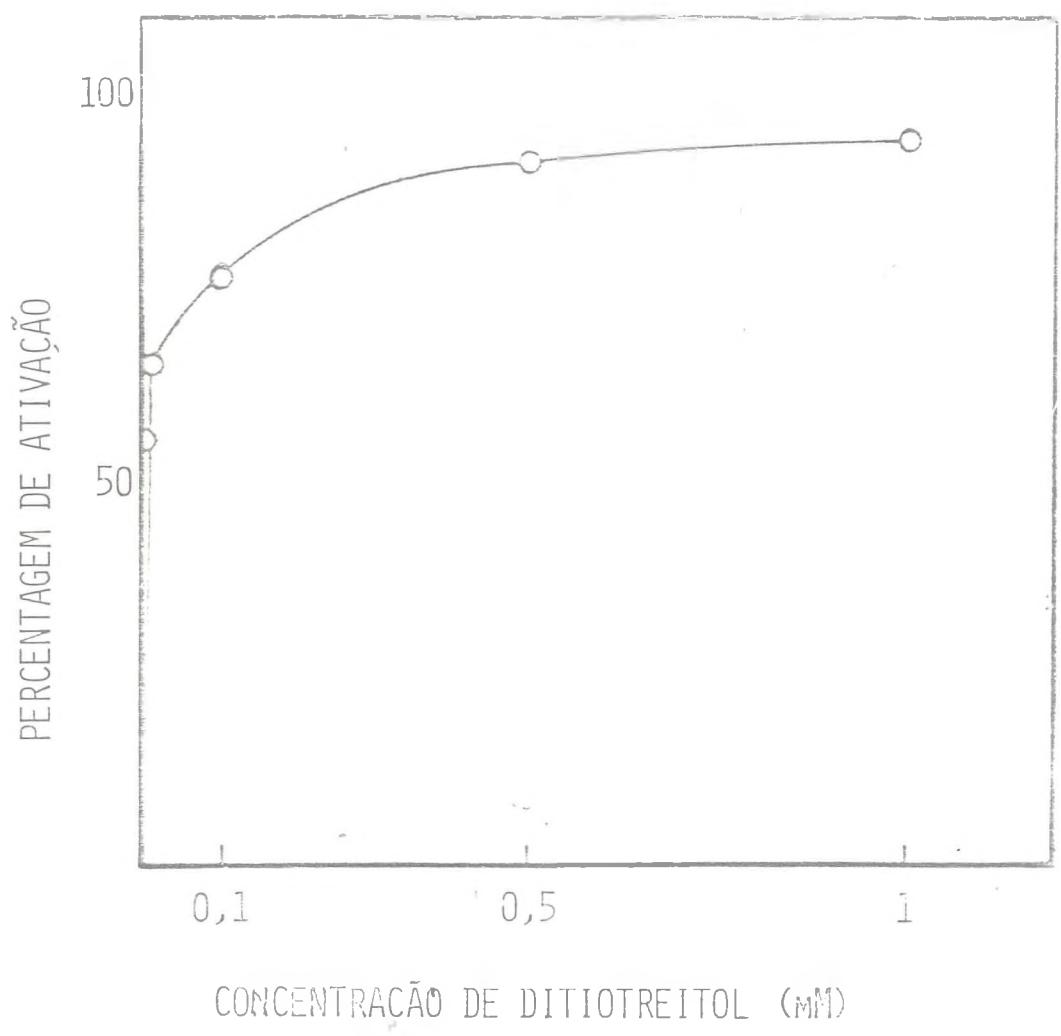


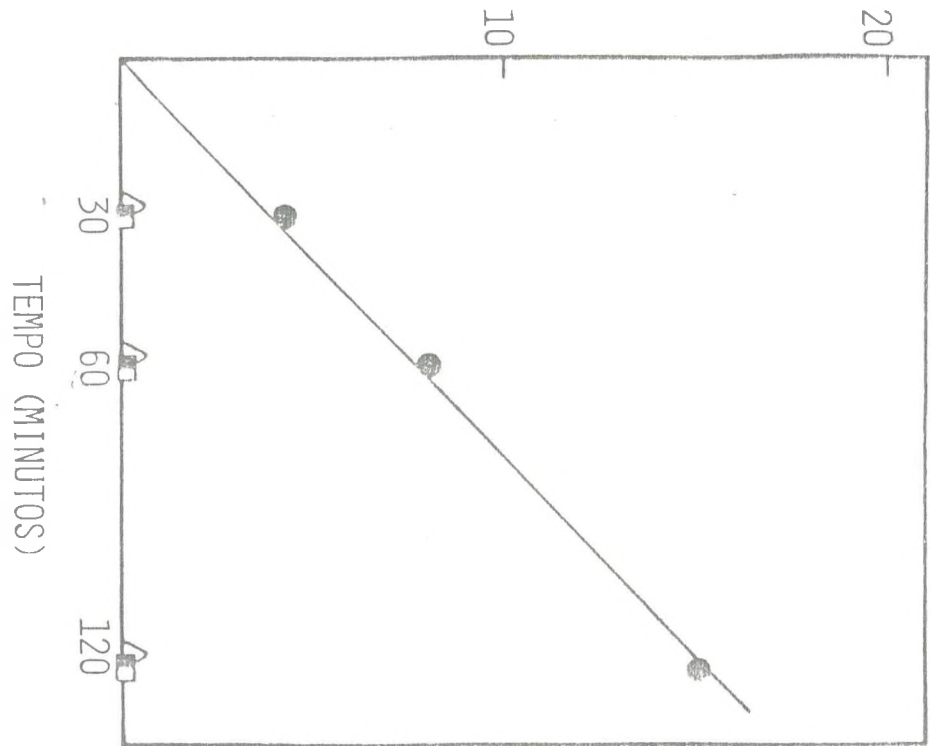
FIGURA 20: Degradação enzimática da encefalina pela enzima purificada

A análise de aminoácidos foi realizada como descrito em métodos (item 2.2.12).

O meio de incubação continha 100 nmoles de Met-encefalina e 10 $\mu$ g de enzima purificada dissolvidos em 0,45ml de tampão Tris-HCl, pH 7,5, contendo 0,1M de NaCl. Nos tempos de incubação 30,60 e 120 minutos foram retiradas alíquotas de 0,15ml do incubado aos quais foram adicionados 0,15ml de tampão citrato, pH 2,2, contendo 15% de polietilenoglicol.

● Tir, □ Gli, ▲ Fen e ■ Met

# NMOLES DE AMINOACIDOS HIDROLISADOS



## 4 - DISCUSSÃO

### 4.1 - Metodologia utilizada para a purificação da encefalinase de encéfalo humano

A metodologia empregada para a purificação da encefalinase de encéfalo humano foi montada pela primeira vez em nosso laboratório graças a eficiente orientação do Prof. CARVALHO.

Basicamente foi a mesma metodologia utilizada por CARVALHO (1981) para a purificação de endopeptidases A e B do cérebro de coelho, com exceção da precipitação em pH 5.0, do fracionamento com sulfato de amônio e da cromatografia em sephadex G-100, métodos que não elevaram significativamente o índice de purificação da enzima.

O perfil cromatográfico da coluna de DEAE- celulose (conforme visto em resultados), apresenta a eluição de um pico principal de atividade enzimática com tampão Tris-HCl 0,05 N contendo 100mM de NaCl, pH 7,5. O pico secundário provavelmente é uma outra aminopeptidase, porém como foi menos abundante suas propriedades não foram estudadas nesse trabalho.

A eletroforese preparativa em coluna de gel de poli-acrilamida com eluição contínua, foi o método mais eficaz na purificação (ver resultados). Como descrito por CARVALHO

(1981), o método apresenta a vantagem de associar simultaneamente dois processos de separação: por carga e por tamanho molecular (Morris & Morris, 1976; Carvalho, 1981; Carvalho & Camargo, 1981).

O aparelho de eletroforese que utilizamos apresenta duas modificações em relação ao original construído por CARVALHO (1981): uma menor câmara de eluição, preenchida com sephadex G-25, na tentativa de minimizar a formação de uma câmara de mistura; ausência da coluna de refrigeração, uma vez que o aparelho foi mantido em câmara fria à uma temperatura de 0-2°C. Como a capacidade de proteínas do sistema não deve ultrapassar 25mg (Carvalho, 1981), submetemos parceladamente os "pools" obtidos da coluna de DEAE-celulose (DE-52), parcialmente purificados, à eletroforese.

Os resultados foram reproduzíveis, havendo semelhança nos perfis de eluição das proteínas e da atividade da encefalinase obtidos nos diversos experimentos.

#### 4.1.1 - Estabilidade da enzima durante o processo de purificação

A enzima parece ser bastante lábil, pois a atividade da fração solúvel diminui cerca de 30% após a permanência da mesma durante uma semana a 4°C, diminuindo drasticamente após congelamento e descongelamento sucessivos. A utilização do  $\beta$ -mercaptoetanol ( $10^{-3}$ M) - redutor de pontes dissulfetos - no tam

pão de diálise atenua a perda de atividade. O uso do glicerol a 20% (v/v), citado por MARTINS (1977) e CARVALHO (1981) como uma forma de evitar a perda de atividade cininásica das endopeptidases, aparentemente não evitou a perda de atividade da encefalinase, porém, pareceu preservá-la melhor, quando submetida a sucessivos descongelamentos.

#### 4.1.2 - Determinação da atividade enzimática

A determinação da atividade enzimática da encefalina se foi realizada durante todo o processo de purificação, através da quantificação da hidrólise do substrato tirosil- $\beta$ -naftilamida, uma vez que ele contém o aminoácido terminal das encefalinas. Utilizamos esse substrato sintético devido a rapidez e precisão da quantificação da hidrólise enzimática (Hayashi & Oshima, 1977; Traficante et al, 1980).

#### 4.2 - Critérios de homogeneidade aplicados à encefalinase purificada

Segundo MORRIS & MORRIS (1976) a homogeneidade química de um produto natural só pode ser obtida pela sua síntese. Logo, os critérios de pureza aplicados a uma substância recém isolada apenas sugerem a sua homogeneidade.

Existem várias formas de avaliar o grau de pureza de uma substância, porém o método mais utilizado ainda é a eletro



forese em gel de poliacrilamida (Morris & Morris, 1976), devido ao alto poder de resolução com a utilização de pequenas quantidades de proteínas.

Os métodos eletroforéticos que utilizamos incluíram e letroforese analítica em gel de poliacrilamida e eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS). Na eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS, as proteínas, previamente desnaturadas por aquecimento a 100°C durante 5 minutos, tiveram suas pontes dissulfetos (S-S) reduzidas por  $\beta$ -mercaptoetanol (10%) e comportaram-se como ânions ao serem complexadas ao dodecil sulfato de sódio (2%) (Morris & Morris, 1976, Carvalho, 1981). Ambos os métodos demonstraram a presença de uma única banda de proteína quando a enzima pura foi submetida a tais critérios de homogeneidade. O peso molecular determinado por eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS e por cromatografia em sephadex G-200 são semelhantes, o que elimina a possibilidade de existir monômeros idênticos à enzima. Esses resultados sugerem que ela é constituída de uma única cadeia polipeptídica.

Até o momento, a maioria das aminopeptidases, isoladas de cérebro, que hidrolisam as encefalinas, têm sido descritas também como polipeptídeos constituídos por uma única cadeia de peso molecular variando entre 90.000 e 100.000 daltons, quando submetidas à eletroforese em poliacrilamida com SDS (Hayashi & Oshima, 1977; Traficante et al, 1980; Hersh & Mc Kelvy, 1981; Wagner et al, 1981). A única exceção foi uma

aminopeptidase purificada do cérebro de rato por SCHNEBLI et al (1979), constituída de duas cadeias polipeptídicas, fato no entanto, não comprovado por WAGNER et al (1981).

#### 4.3 - Propriedades da enzima purificada

O peso molecular da enzima pura, estimado através de filtração em coluna de sephadex G-200 e por eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS, foi aproximadamente 100.000 daltons, semelhantes àqueles determinados para as aminopeptidases purificadas do cérebro de macaco (Hayashi & Oshima, 1977), cérebro de rato (Schnebli et al, 1979; Wagner et al, 1981), cérebro bovino (Hersh & Mc Kelvy, 1981). Esse resultado difere daquele encontrado para enzima do corpo estriado do cérebro humano, o qual teve seu peso molecular estimado em torno de 62.000 daltons (Traficante et al, 1980).

O ponto isoelétrico da nossa encefalinase não pode ser comparado a outras enzimas que hidrolisam encefalinas devido a falta desse dado na literatura, lamentavelmente não justificado.

O valor de pH ótimo para a atividade enzimática da encefalinase de encéfalo humano está em torno de 7,0 sendo semelhante aos valores determinados para as aminopeptidases de cérebros de outros mamíferos (Hayashi & Oshima, 1977; Schnebli et al, 1979; Swerts et al, 1979; Traficante et al, 1980; Wagner et al, 1981; Hersh, 1982; Shimamura et al, 1983).

A constante de Michaelis ( $K_m$ ), da nossa enzima, aparentemente homogênea, para a lisina- $\beta$ -naftilamida ( $1,66 \times 10^{-4} M$ ) e para a tirosina  $\beta$  naftilamida ( $2,0 \times 10^{-4} M$ ), sugere uma ligeira preferência pelo substrato básico lisina- $\beta$ -naftilamida. Apresenta ainda, uma ampla especificidade por outros substratos  $\beta$ -naftilamidas básicos e neutros, assemelhando-se as aminopeptidases encontradas na literatura (Hayashi & Oshima, 1977; Schnebli et al, 1979; Hersh, 1982). Ocorre, entretanto, ligeira diferença na ordem de preferência (Hayashi & Oshima, 1977; Schnebli et al, 1979; Traficante et al, 1980, Wagner et al, 1981; Shimamura et al, 1983). Assim como a nossa enzima, as demais estudadas até hoje não hidrolisam substratos ácidos, contendo por exemplo, o ácido aspártico e ácido glutâmico (Hayashi & Oshima, 1977; Schnebli et al, 1979; Traficante et al, 1980; Wagner et al, 1981; Hersh, 1982; Shimamura et al, 1983).

O fato dessas enzimas hidrolisarem aminoácidos- $\beta$ -naftilamidas, permite a sua classificação como arilamidases (Hersh, 1982). As arilamidases têm sido encontradas em outros tecidos além do cérebro, como por exemplo: fígado de rato (Hopsu et al, 1966), rim de rato (Mahadevan et al, 1967) e fígado humano (Smith et al, 1965). Entretanto, serão necessários maiores estudos com essas enzimas para demonstrar se elas são idênticas ou se apenas apresentam algumas propriedades semelhantes.

Nossa aminopeptidase foi inativada cerca de 96% por  $Zn^{++}$  ( $10^{-3} M$ ), 68% por  $Ni^{++}$  ( $10^{-3} M$ ) e 100% por  $Cu^{++}$  ( $10^{-3} M$ ). Ao ser incubada com  $Mn^{++}$  ( $10^{-3} M$ ),  $Fe^{++}$  ( $10^{-3} M$ ),  $Co^{++}$  ( $10^{-3} M$ ) perdeu

cerca de 20% de sua atividade. O EDTA pareceu não afetar a atividade enzimática, diferindo de outras enzimas encontradas no cérebro de rato e macaco, as quais são inativadas por essa substância e reativadas pela adição de íons  $\text{Co}^{++}$ ,  $\text{Zn}^{++}$ ,  $\text{Mn}^{++}$  (Hayashi & Oshima, 1977; Schnebli et al, 1979; Wagner et al, 1981). Entretanto, ela assemelha-se a enzima do cérebro bovino que também não é afetada pelo EDTA e é inativada por  $\text{Co}^{++}$  ( $10^{-3}\text{M}$ ),  $\text{Zn}^{++}$  ( $10^{-3}\text{M}$ ),  $\text{Mn}^{++}$  ( $10^{-3}\text{M}$ ) (Wagner et al, 1981). A enzima do núcleo striatum do cérebro humano, também é inativada por metais pesados como  $\text{Ni}^{++}$  ( $10^{-3}\text{M}$ ),  $\text{Zn}^{++}$  ( $10^{-3}\text{M}$ ), porém o EDTA ( $10^{-3}\text{M}$ ), conseguiu inibir 20% da sua atividade enzimática, o que a diferencia da enzima purificada no presente trabalho.

A enzima ora isolada foi inibida por puromicina e bacitracina, assemelhando-se às aminopeptidases de cérebro encontradas na literatura (Hayashi & Oshima, 1977; Schnebli et al, 1979; Vogel & Altstein, 1979; Traficante et al, 1980; Hersh & Mc Kelvy, 1981; Wagner et al, 1981; Hersh, 1982; Shimamura et al, 1983). Nosso  $K_i$  para a puromicina foi cerca de  $6.7 \times 10^{-5}\text{M}$ . Até o momento, o seu efeito inibitório não foi bem explicado (Hayashi & Oshima, 1977; Barclay & Phillips, 1978; Hersh, 1982). A bacitracina, por sua vez, apesar de ser descrita como um inibidor de baixa potência (Chaillet et al, 1983), parece proteger a encefalina exôgena da degradação "in vivo" (Pathy, 1977). Entretanto, a puromicina, que é um potente inibidor não protege significativamente a degradação de encefalinas. A dificuldade de interpretação dos resultados reside na inespecificidade des

ses inibidores (Malfroy et al, 1979).

Nossa enzima não foi afetada pelo fenilmetilsulfonil-fluoreto, assemelhando-se a aminopeptidase do rato (Schnebli et al, 1979). Esse estudo não foi realizado com outras aminopeptidases de cérebro.

A utilização de outros inibidores de aminopeptidases, tem conduzido a alguns resultados duvidosos e algumas vezes negativos (Chaillet et al, 1983). Entre esses inibidores, podemos citar os tióis (Gorenstein & Snyder, 1980), reagentes sulfidrílicos como p-cloromercuriobenzoato, iodoacetamida (Vogel & Altstein, 1979) e os barbituratos, tais como secobarbital, pentobarbital e fenobarbital, cujos mecanismos de ação permanecem desconhecidos (Hersh, 1982). Esforços no sentido de utilizar-se substâncias como tiorfano, um potente inibidor das "encefalinas" descritas na literatura (Roques et al, 1980; Baum, et al, 1983), leucinal - um inibidor estruturalmente relacionado a substratos peptídicos - têm sido realizados no sentido de potenciar a analgesia induzida pelas encefalinas (Davis et al, 1983). Além disso, várias tentativas vem sendo realizadas no sentido de se conceituar o sítio ativo das encefalinas, utilizando-se para isso modelos hipotéticos (Cushman et al, 1977; Gordon et al, 1983).

O ditiotreitól ( $1 \times 10^{-3} M$ ) - redutor de pontes dissulfeto - ativou a enzima pura em torno de 94%, enquanto que a enzima purificada por HAYASHI & OSHIMA (1977) do cérebro de macaco, foi ativada pelo referido composto em torno de 150%.

A encefalinase purificada de encéfalo humano degrada a encefalina apenas na ligação  $\text{Tir}^1\text{-Gli}^2$ , resultado semelhante àqueles encontrados para a encefalina purificada do cérebro de rato (Wagner et al, 1981) o corpo estriado do cérebro humano (Traficante et al, 1980). Entretanto todos os demais trabalhos com encefalinase de cérebros de mamíferos demonstraram que essa enzima degradava totalmente a molécula de encefalina a aminoácidos livres. Provavelmente a enzima purificada por esses autores encontrava-se contaminada por outras peptidases.

Pelo que podemos observar analisando o aparente comportamento da enzima que isolamos e comparando-a às enzimas descritas na literatura, nos aventuramos a sugerir que possivelmente a encefalinase de encéfalo humano seja a mesma aminopeptidase encontrada em cérebros de outros mamíferos, tais como rato, boi e macaco. Não obstante a atividade dessas aminopeptidases hidrolisando encefalinas em extratos do SNC, sua participação na inativação fisiológica das encefalinas ainda não foi comprovada. A hipótese de que tenham uma única função poderá ser descartada, uma vez que foi demonstrado uma distribuição quase que homogênea entre as regiões e frações subcelulares de cérebros de mamíferos (Sullivan et al, 1978; Malfroy et al, 1979; Gorenstein & Snyder, 1979; Vaughan, 1981; Underfriend & Kilpatrick, 1982; Chaillet et al, 1983; Ikeda et al, 1983).

Os objetivos principais aos quais nos propusemos

inicialmente, foram plenamente alcançados. A purificação de uma aminopeptidase de encéfalo humano que hidrolisa encefalinas vem acrescer à literatura mais uma candidata a degradação fisiológica destas substâncias, atualmente tão especulada. A afirmação de que realmente participariam na degradação fisiológica de encefalinas, no momento foge aos nossos objetivos, pois para isso necessitaríamos, no mínimo, de experimentos em que fossem utilizados inibidores dessas enzimas em um modelo animal "in vivo" e que o nível de encefalinas pudesse ser quantificado. Quanto a sua preservação no processo evolutivo, talvez os estudos realizados na escala filogenética, em nosso laboratório, por COELHO DE SOUSA (resultados não publicados) possam vir a esclarecer alguns pontos ainda obscuros.

Estudos "in vivo" com inibidores específicos da enzima, bem como a produção de anticorpos anti-enzima serão desenvolvidos em nosso laboratório e poderão auxiliar no esclarecimento dessas funções.

## 5 - CONCLUSÕES

- A maior parte da atividade encefalinásica do encéfalo humano foi detectada na fração solúvel.

- Na cromatografia em coluna de DEAE-celulose a atividade enzimática foi eluída com tampão Tris-HCl 0,05N, pH 7,5, contendo 0,1M e 0,15M de NaCl.

- A enzima foi obtida aparentemente pura após a realização da eletroforese em coluna de gel de poliacrilamida.

- Os critérios de homogeneidade utilizado para a encefalinase foram: eletroforese analítica em gel de poliacrilamida com e sem dodecil sulfato de sódio (SDS), onde uma única banda de proteína foi detectada e focalização isoelétrica, onde um único pico de atividade foi encontrado.

- A estimativa do peso molecular foi determinada pela cromatografia em coluna de sephadex G-200 e por eletroforese em gel de poliacrilamida como 100000 daltons.

- O pH ótimo para a atividade enzimática utilizando-se a Lis- $\beta$ -naftilamida e Tir- $\beta$ -naftilamida como substrato foi em torno de 7,5.

- As constantes de Michaelis ( $K_m$ ) para a Lis- $\beta$ -naftilamida e Tir- $\beta$ -naftilamida foram  $1,66 \times 10^{-4}M$  e  $2,0 \times 10^{-4}M$ , respectivamente.



- A presente enzima foi ativada por ditioneitol (DTT) e foi fortemente inibida por  $\text{Cu}^{++}$ ,  $\text{Zn}^{++}$ ,  $\text{Ni}^{++}$ , puromicina e bacitracina.

- A encefalinase é bastante lábil pois perdeu cerca de 30% de sua atividade após permanecer uma semana a 4°C e mais de 50% após três congelamentos e descongelamentos sucessivos.

- Os resultados obtidos na purificação e caracterização desta enzima sugerem uma semelhança com as aminopeptidases purificadas anteriormente de cérebro de mamíferos por outros autores.

- A enzima purificada hidrolisou a encefalina exclusivamente na ligação  $\text{Tir}^1\text{-Gli}^2$ .

- A presente enzima foi ativada por ditioneitol (DTT) e foi fortemente inibida por  $\text{Cu}^{++}$ ,  $\text{Zn}^{++}$ ,  $\text{Ni}^{++}$ , puromicina e bacitracina.

- A encefalinase é bastante lábil pois perdeu cerca de 30% de sua atividade após permanecer uma semana a 4°C e mais de 50% após três congelamentos e descongelamentos sucessivos.

- Os resultados obtidos na purificação e caracterização desta enzima sugerem uma semelhança com as aminopeptidases purificadas anteriormente de cérebro de mamíferos por outros autores.

- A enzima purificada hidrolisou a encefalina exclusivamente na ligação  $\text{Tir}^1\text{-Gli}^2$ .

## 6 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AMSTERDAM, J.G.C.; BUUREN, K.J.H.; JONG, A.M.; SOUDJIN, W. Inhibitors of calf brain enkephalinase A and B. Life Science, 33(1):109, 1983.
2. ANDREWS, P. Estimation of molecular sizes and molecular weights of biological compounds by gel filtration. Methods Biochem. Anal., 18:1, 1970.
3. AYLSWORTH, C.F.; HODSON, C.A.; MEITES, J. Opiate antagonists can inhibit mamary tumor growth in rats. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 161:18, 1979.
4. BARCLAY, R.K. & PHILLIPS, M.A. Inhibition of enkephalin degrading aminopeptidase activity by certain peptides. Biochem. Biophys. Res. Commun., 96:1732, 1980.
5. BARGMAN, W. & SCHARRER, E. The site of origin of the hormones of the posterior pituitary. Amer. Sci., 39: 255, 1959 apud CARVALHO, K.M. Purificação de duas endopeptidases de cérebro de coelho que hidrolisam hormônio-peptídeos. Produção de anticorpos anti-enzima. Tese de doutoramento. Fac. de Medicina de Ribeirão Preto, USP, São Paulo, 1981.
6. BARKER, J.L. & GAINER, H. Peptide regulation of bursting pacemaker activity in a molluscan neuroexcretory cell.

Science, 184:1371, 1974.

7. BARKER, J.L. & SMITH, T.G. Peptide regulation of neurone membrane properties. Brain. Res., 103:167, 1976.
8. BARKER, J.L. Peptides: roles in neuronal excitability. Physiol. Rev., 56:435, 1976.
9. BARKER, J.L. Physiological roles of peptides in the nervous System. In: Gainer, H. Peptides in Neurobiology. New York and London, Plenum Press, 1977, p. 295-343.
10. BAUM, T.; BECKER, F.T.; SYBERTZ, E.J.; CRAWFORD, S.; DESIDERIO, D.M. Enkephalinase "A" Inhibition by Thiorphan: Central and Peripheral Cardiovascular Effects. Eur. J. Pharmacol., 94:85, 1983.
11. BELLET, M.; MEYER, J.L.E.; PERNOLLET, M.G.; SCHIMITT, H. Central cardiovascular effects of narcotic analgesics and enkephalins in rats. Br. J. Pharmacol., 71:365, 1980.
12. BLOOM, F.; BATTENBERG, F.; ROSSIER, J.; LING, N.; GUILLEMIN, R. Neurons containing  $\beta$ -endorphin in rat brain exist separately from those containing enkephalin: immunocytochemical studies. Proc. Natn. Acad. Sci. USA, 75:1591, 1978.
13. BLOOM, F. Neuropeptides. Scientific American 245(4): 130, 1981.
14. BOLME, P.; FUXE, K.; AGNATI, L.F.; BRADLEY, R. SMYTHIES,

- J. Cardiovascular effects of morphine and opioid peptides following intracisternal administration in chloralose anesthetized rats. Eur. Journal. Pharmacol., 43: 319, 1978.
15. BRECHER, S. & SUSKIW, J.B. Brain arylamidase. Purification and characterization of the soluble bovine enzyme. Biochem. J., 112:335, 1969.
16. BROWSTEIN, J.J. Biologically active peptides in the mammalian central nervous system. In: Gainer H. Peptides in Neurobiology, New York and London, Plenum Press, 1977, p. 145-169.
17. CAMARGO, A.C.M. Isolamento e caracterização de peptidases neutras do cérebro de coelho com atividade sobre hormônio peptídeos. Tese de livre docência. Fac. de Medicina de Ribeirão Preto, USP, São Paulo, 1972.
18. CARVALHO, K.M. Purificação de duas endopeptidases do cérebro de coelho que hidrolisam hormônio-peptídeos. Produção de anticorpos anti-enzimas. Tese de doutoramento. Fac. de Medicina de Ribeirão Preto, USP, São Paulo, 1981.
19. CARVALHO, K.M. & CAMARGO, A.C.M. Purification of rabbit brain endooligopeptidases and preparation of anti-enzyme antibodies. Biochem., 20:7082, 1981.
20. CHAN-PALAY, V.; JONSSON, G. & PALAY, S.L. Serotonin and substance P neurons, their processes and connections by

"in vivo" microinjections of monoclonal antibodies. Anat. Embriol., 156:225, 1978.

21. CLELAND, W.W. Dithiothreitol, a new protective reagent for SH groups. Biochem., 3(4):480, 1964.
22. COX, B.M. Endogenous opioid peptides: a guide to structures and terminology. Life Sci., 31(16-17):1645, 1982.
23. CUELLO, A.C. & KANAZAWA, I. The distribution of substance P immunoreactive fibers in the rat central nervous system. J. Compl. Neurol., 178:129, 1978.
24. CUSHMAN, D.W.; GORDON, E.M.; WANG, F.L.; CHEUNG, H. S.; TUNG, R.; DELANEY, N.G. Purification and characterization of enkephalinase, angiotensin converting enzyme and a third peptidyl dipeptidase from rat brain. Life Sci., 33(1):35, 1983.
25. DAVIS, B.J. Disk electrophoresis II Method and application to human serum proteins. Ann. N.Y. Acad. Sci., 121:404, 1964.
26. DAVIS, K.R.; HERNANDEZ, D.E.; WOLFENOEN, R. Leucinal inhibits brain aminopeptidase activity and potentiates analgesia induced by leu-enkephalin. Pharmacol. Biochem. 19:791, 1983.
27. DEFENDINI, R.; ZIMMERMAN, E.A. The magnocellular neurosecretory system of the mammalian hypothalamus In: REICHLIN, S.; BALDESSARINI, R.J.; MARTIN, J.B: The Hypothalamus. New York, Raven Press., 1978, p. 137-152.

28. DIGUILIO, A.M.; YANG, H.Y.; FRATTA, W.; COSTA, E. Decreased content of immunoreactive enkephalin - like peptide in peripheral tissues of spontaneously hypertensive rats. Nature, 278:646, 1979.
29. DU VIGNEAUD, V.; RESSLER, C.; SWANN, J.M.; ROBERTS, C.W.; KATSOYANNIS, P.G. & GORDON, S. Synthesis of an octapeptide amide with the hormonal activity of oxytocin. J. Amer. Chem. Soc., 75:4879, 1953.
30. FISHER, L. Experimental technique in column gel chromatography. In: WORK, T.W. & WORK, E. Laboratories Techniques in Biochemistry and Molecular Biology. Amsterdam, North Holland, 1971, v. 1, cap. 2, p. 221.
31. GIUST, P. The physiopathology of opioid peptides. Clin. Ter. 100(5):493, 1982.
32. GILMAN, A.G.; GOODMAN, L.S.; GILMAN, A. Las bases farmacológicas de la terapéutica. Buenos Aires, Panamericana, 1980, p. 640.
33. GOLDBARG, J.A.; PINEDA, E.P.; RUTTENBERG, M. The measurement of activity of leucine aminopeptidase in serum, urine, bile and tissues. Amer. J. Clin. Pathol. 32(6): 571, 1959.
34. GOLDSTEIN, A. Opioid peptides (endorphins) in pituitary and brain. Science, 193:1081, 1976.
35. GORDON, E.M.; CUSHMAN, D.W.; TUNG, R.; CHEUNG, H.S.; WANG,

- F.L.; DELANEY, N.G. Rat brain enkephalinases: characterization of the active site using mercapto propanoyl aminoacid inhibitors and comparison with angiotensin-converting enzyme. Life Sci., 33(1):133, 183.
36. GORENSTEIN, C. & SNYDER, S.H. Two distinct enkephalinases: solubilization, partial purification and separation from angiotensin-converting enzyme. Life Sci., 25: 2065, 1979.
37. GORENSTEIN, C. & SNYDER, S.H. Enkephalinases. Proc. R. Soc. Lond. B. 210:123, 1980.
38. GRAMSCH, C.; VOLKER, H.; EHRAEIN, P.; PASI, A.; HERZ, A. Regional distribution of methionine enkephalin and beta-endorphin like immunoreactivity in human brain and pituitary. Brain Res., 171:261, 1979.
39. GUILLEMIN, R. Peptides in the brain: the new endocrinology of the neuron. Science, 202:390, 1978.
40. HAMBROOK, J.M.; MORGAN, B.A.; RANCE, M.J. & SMITH, C.F.C. Mode of deactivation of the enkephalin by rat and human plasma and rat brain homogenates. Nature, 262:782, 1976.
41. HAYASHI, M. & OSHIMA, K. Purification of arylamidase from monkey brain. J. Biochem., 21:631, 1977.
42. HAYASHI, M. Monkey brain arylamidase (II): Further characterization and studies on mode of hidrolýsis of phisio-



- logically active peptides. J. Biochem., 84:1363, 1978.
43. HENRY, J.L.; KRNJEVICK, K.; MORRIS, M.E. Substance P and spinal neurons. Can. J. Physiol. Pharmacol., 53:423, 1975.
44. HERSH, L.B. Solubilization and characterization of two rat brain membrane-bound aminopeptidases active on met-enkephalin. Biochem., 20:2345, 1981.
45. HERSH, L.B. & Mc KELVY. An aminopeptidase from bovine brain which catalyses the hydrolysis of enkephalin. J. Neurochem., 36:171, 1981.
46. HERSH, L.B. Degradation of enkephalins: the search for an enkephalinase. Mol. Cell. Biochem., 47:35, 1982.
47. HERZ, A. Sites of opiates action in the central nervous system. In: HERZ, A. Developments in Opiate Research, New York, Raven, 1978, p. 153.
48. HILD, W. Experimental morphologische unterouchungen über das Verhalten der "Neurosekretarischen Bahn" nach Hypophysenstiieldurchtrennungen, Eingriffen in der Wasserhaushalt und Belastung der Osmoregulation, Virchows Arch. Pathol. Anat. Physiol., 319:526, 1951 apud CARVALHO, K.M. Purificação de duas endopeptidases de cérebro de coelho que hidrolisam hormônio peptídeos. Produção de anticorpos anti-enzimas. Tese de doutoramento. Fac. de Medicina de Ribeirão Preto, USP, São Paulo, 1981.
49. HJERTEN, S.; JERSTEDT, S. & TISELINE, A. Apparatus for

large-scale preparative polyacrylamide gel electrophoresis. Analyt. Biochem., 27:108, 1962.

50. HÖKFELT, T.; ELDE, E.; JOHANSSON, O.; TERENIUS, L. & STEIN, L. The distribution of enkephalin immunoreactive cell bodies in the rat central nervous system Neurosci. Lett., 5:25, 1977a.
51. HÖKFELT, T.; ELFVIN, L.G.; ELDER, R.; SCHUTZBERG, M.; GOLDSTEIN, M. & LUFT, R. Occurrence of somatostatin-like immunoreactivity in some peripheral sympathetic noradrenergic neurons. Proc. Natn. Acad. Sci., USA 74:3587, 1977b.
52. HÖKFELT, T.; JOHANSSON, O.; LJUNGDAHL, A.; LUNDBERG, J. M. & SCHULTZBERG, M. Peptidergic neurones. Nature 284:515, 1980.
53. HOPSU, V.K.; MÄKINEN, K.K. & GLENNER, G.G. Arch. Biochem. Biophys., 114:557, 1966 apud HAYASHI, M. & OSHIMA, K. Purification and characterization of arylamidase from monkey brain. J. Biochem., 81:631, 1977.
54. HUGHES, J.; SMITH, T.W.; KOSTERLITZ, H.W.; FORTHERGIL, M. A.; MORGAN, B.A.; MORRIS, H.R. Identification of two related pentapeptides from the brain with potent agonistic activity. Nature (Lond) 258:577, 1975.
55. HUGHES, J. Les morphines du cerveau. Recherche, 93(9):866, 1978.
56. IKEDA, Y.; NAKAO, K.; YOSHIMASA, T.; SAKAMOTO, M. Parallel

- distribution of methionine - enkephalin - Arg<sup>6</sup>-Gly<sup>7</sup>-Leu<sup>8</sup> with methionine enkephalin, leucine-enkephalin and methionine enkephalin-Arg<sup>6</sup>-Phe<sup>7</sup> in human and bovine brain. Life Sci., 33(1) 65, 1983.
57. KNIGHT, M. & KLEE, W.A. The relationship between enkephalin degradation and opiate receptor occupancy. J. Biol. Chem., 253(11) 3843, 1978.
58. KNIGHT, M. & KLEE, W.A. Enkephalin generating activity of rat brain endopeptidases. J. Biol. Chem., 254:10426, 1979.
59. KONISHI, S. & OTSUKA, M. The effects of substance P and other peptides on spinal neurons of the frog. Brain. Res. 65:397, 1974a.
60. KONISHI, S. & OTSUKA, M. Excitatory action of hypothalamic substance P on spinal motoneurons of newborn rats. Nature (Lond) 252:734, 1974b.
61. LARSSON, L.I. & REHFELD, I.F. Localization and molecular heterogeneity of colecystokinin in the central and peripheral system. Brain. Res., 165:201, 1979.
62. LAUBIE, M.; SCHMITT, H.; VICENT, M. & REMOND, G. Central cardiovascular effects of morphinomimetic peptides in dog. Eur. J. Pharmacol., 46:47, 1977.
63. LINEWEAVER, H. & BURK, D. J. Amer. Chem. Soc., 56:658.
64. LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A.L. & RANDALL, R. J. Proteins measurements with the Folin Phenol Reagent. J. Biol. Chem., 193:265, 1951.

65. MAHADEVAN, S. & TAPPEL, A.L. J. Biol. Chem., 242:2369, 1967.  
apud HAYASHI, M. & OSHIMA, K. Purification and characterization in monkey brain. J. Biochem., 81:631, 1977.
66. MAIZEL, Jr.; J.V. Acrylamide gel electrophoresis of proteins and nucleic acids. In: HABEL, K. & SALZMAN, N.P. Fundamental Techniques of Virology. New York, Academic Press., 1965, p. 334-362.
67. MALFROY, B.; SWERTZ, J.P.; GUYON, A.; ROQUES, B.P.; SCHWARTZ, J.C. High-affinity enkephalin degrading peptidase in brain is increased after morphine. Nature, 276:523, 1978.
68. MALFROY, B.; SWERTZ, J.P.; LLORENS, C.; SCHWARTZ, J. C. Regional distribution of a high affinity enkephalin degrading peptidase (enkephalinase) and effects of lesions suggest localization in the vicinity of opiate receptors in brain. Neurosci. Lett., 11:329, 1979.
69. MARTINS, A.R. Metabolismo de hormônio peptídeos no SNC. Isolamento e caracterização de peptidases do sistema proteolítico do tecido nervoso. Tese de doutoramento, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, USP, São Paulo, 1977.
70. MATSAS, R.; FULCHER, I.S.; KENNY, A.J. & TURNER, A.J. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80:3111, 1983 apud RELTON, J.M. ; GEE, N.S.; MATSAS, R.; TURNER, J.; KENNY, A. Purification of endopeptidase 24.11 from pig brain by immunoadsor

- bent chromatography. Biochem. J., 215:519, 1983.
71. MAYERI, E. & SIMON, S. Modulation of synaptic transmission and burster neuron activity after release of a neurohormone in Aplysia. Neurons Abstr., 1:584, 1975.
72. Mc LENNAN, H. Synaptic transmission, Philadelphia, Saunders, 1963.
73. MORRIS, C.J.O.R. & MORRIS, P. Separation Methods in Biochemistry, 2 ed, London, Pitman, 1976.
74. NICOLL, R.A. & BARKER, J.L. The pharmacology of recurrent inhibition in the supra optic neurosecretory system. Brain. Res., 35:501, 1971a.
75. NICOLL, R.A. & BARKER, J.L. Excitation of supraoptic neurosecretory cells by angiotensin II. Nature, (London). New. Biol., 233:172, 1971b.
76. OLIVEIRA, E.B.; MARTINS, A.R. & CAMARGO, A.C.M. Isolation of brain endopeptidases: influence of sizes and sequence of substrates structurally related to bradykinin. Biochem., 15:1967, 1976.
77. ORLOWSKI, M.; WILK, E.; PEARSE, S. & WILK, S. Purification and properties of a prolyl endopeptidase from rabbit brain. J. Neurochem., 33:461, 1979.
78. PATEY, G.S.; DE LA BAUME, J.C.; SCHWARTZ, C.; GROS, C.; ROQUES, B.P.; FOURNIE-ZALUSKI, M.C.; LUCAS, E.S. Selective protection of methionine enkephalin released from

- brain slices by enkephalinase inhibition. Science, 212: 1153, 1977.
79. PATTHY, A.; GRAF, L.; KENESSEY, A.; SZEZELY, J.I.; BAJUSZ, S. Effect of bacitracin on the biodegradation of  $\beta$ -endorphin. Biochem. Biophys. Res. Commun., 77:254, 1977.
80. PEARSE, A.G.E. Hidroxytryptophan uptake by dog thyroid C cells and its possible significance in polypeptide hormone production. Nature, (Lond) 211:598, 1966.
81. PERT, C.B. & SNYDER, S.H. Opiate receptor: its demonstration in nervous tissue. Science, 179:1011, 1973.
82. PERT, C.B.; PERT, A.; CHANG, J.K. & FONG, B.T.W. [D-Ala<sup>2</sup>]-met-enkephalinamide: a potent, long-lasting synthetic pentapeptide analgesic. Science, 194:330, 1976.
83. PFEIFFER, A.; FEURSTEIN, G.; FADEN, A.; KOPIN, I.J. Evidence for an involvement of mu, but not delta ou Kappa opiate receptors in sympathetically and parasympathetically mediated cardiovascular responses to opiates upon anterior hypothalamic injection. Life. Sci., 31:1279, 1982.
84. RELTON, J.M.; GEE, N.S.; MATSAS, R.; TURNER, A.; KENNY, A. J. Purification of endopeptidase 24:11 (enkephalinase) from pig brain by immunosorbent chromatography. Biochem. J., 215:519, 1983.
85. RENAUD, L.P.; MARTIN, J.B. & BRASEAU, P. Depressant action of TRH, LHRH, somatostatin on activity of central neu-

rons. Nature (London), 255:233, 1975.

86. RIGHETTI, P. & DRYSDALE, J.W. Isoelectric focusing in polyacrylamide gels. Biochem. Biophys. Acta., 236:17, 1970.
87. RUPNOW, J.H.; TAYLOR, W.L. & DIXON, J.E. Purification and characterization of a TRH deamidase from rat brain. Biochem., 18:1206, 1979.
88. SAITO, K.; KONISHI, S. & OTSUKA, M. Antagonism between Lioresal and substance P in rat spinal cord. Brain. Res., 97:177, 1975 apud CARVALHO, K.M. Purificação de duas endopeptidases do cérebro de coelho que hidrolisam hormônio-peptídeos. Produção de anticorpos anti-enzimas. Tese de doutoramento. Fac. de Medicina de Ribeirão Preto, USP, São Paulo, 1981.
89. SAR, M.; STUMPF, W.E.; MILLER, R.J.; CHANG, K.J.; CUATRECASAS, P. Immunohistochemical localization of enkephalin in rat brain and spinal cord. J. Compl. Neurol., 182:17, 1978.
90. SCHNEBLI, H.P.; PHILLIPS, M.A. & BARCLAY, R. Isolation and characterization of an enkephalin degrading aminopeptidase from rat brain. Biochem. Biophys. Acta., 569:89, 1979.
91. SCHWARTZ, J.C.; BAUME, S.; YI, C.C.; CHAILLET, P.; COLLADO, H.M.; CONSTENTIN, J. Enkephalin metabolism in brain and its inhibition. J. Physicopharmacol., 6:665, 1982.

92. SHIMAMURA, M.; HAZATO, T.; KATAYAMA, T. A membrane-bound aminopeptidase isolated from monkey brain and its action on enkephalin. Biochem. Biophys. Acta., 756:223, 1983.
93. SIMANTOV, R.; KUHAR, M.J.; VHL, G.K.; SNYDER, S.H. Opioid peptide enkephalin: immunohistochemical mapping in rat central nervous system. Proc. Natn. Acad. Sci. USA 74:2167, 1977.
94. SIMON, E.J.; HILLER, J.M.; EDELMAN. I. Stereospecific binding of the potent narcotic analgesic H<sup>3</sup> etorphine to rat brain homogenate. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 70:1947, 1973.
95. SINGER, E.; SPERK, G.; PLACHETA, P.; LEEMAN, S.E. Reduction of substance P levels in the ventral cervical spinal cord of the rat after intracisternal 5,7 dihydroxytryptamine injection. Brain. Res., 174:362, 1979.
96. SMITH, E.E.; KAUFMAN, J.T. & RUTENBURG, A.M. J. Biol. Chem., 240:1718, 1965 apud HAYASHI, M. & OSHIMA, K. Purification and Characterization of Arylamidase from Monkey. Brain. J. Biochem., 81:631, 1977.
97. SNYDER, S.H. The brain's own opiates. C. & EN, 28:26, 1977.
98. SNYDER, S.H. Brain peptides as neurotransmitters. Science, 209:976, 1980.
99. SPACKMAN, D.H.; STEIN, W.H. & MOORE, S. Automatic recording apparatus in chromatography of aminoacids. Anal. Chem., 30:1190, 1958.
100. SPEIDEL, C.C. Gland cells of internal secretion in the



- spinal corf of the skates. Carnegie. Inst. Publ., 13:  
1, 1919.
101. SU, T.P.; Mc QUINN, R.; NAVA, C.A. Increased level of  
imunoreactive enkephalins in the brain of tumor-  
bearing mouse. Res. Commun. Chem. Pathol. Pharm., 42  
(3):417, 1983.
102. SULLIVAN, S.; AKIL, H. & BARCHAS, J.D. "In vivo" degra-  
dation of enkephalin evidence for cleavage at the Gly-  
Phe bond. Commun. Psychopharmacol., 2:225, 1978.
103. SWANSON, L. Imunohistochemical evidence for a neurophy-  
sin-containing autonomic pathway arising in the para-  
ventricular nucleus of the hypothalamus. Brain Res.,  
128:346, 1977.
104. SWERTS, J.P.; PERDRISOT, R.; PATEY, G.; BAUME, S.; SCHWAR-  
TZ, J.C. "Enkephalinase" is distinct from brain angio-  
tensin-converting enzyme. Eur. J. Pharmacol., 57:279,  
1979.
105. TAYLOR, W.L. & DIXON, J.E. Catabolism of neuropeptides  
by a brain proline endopeptidase. Biochem. Biophys.  
Res. Comm., 94:9, 1980.
106. TERENIUS, L. Stereospecific interaction between narcotic  
analgesics and a synaptic plasma membrane fraction of  
rat cerebral cortex. Acta. Pharmacol. Toxicol., 32:  
317, 1973.
107. TERENIUS, L. Endogenous peptides and analgesia. Rev.

Pharmacol. Toxicol., 18:189, 1978.

108. TRAFICANTE, L.J.; ROTROSEN, J.; SIEKIERSKI, J.; TRACER, H.; GERSHOR, S. Enkephalin inactivation by N-terminal tyrosine cleavage: purification and partial characterization of a highly specific enzyme from human brain. Life Sci., 26:1697, 1980.
109. UNDERFRIEND, S.; KILKPATRICK, D.L. Biochemistry of the enkephalins and enkephalin containing peptides. Ach. Bioch. Biophys., 221(2):309, 1982.
110. VAUGHAN, P.F.T. The effect of neuropeptides on neurotransmitter biochemistry in the CNS. Cell. Mol. Biophys., 28(4):369, 1981.
111. VESTERBERG, O. Isoelectric focusing of proteins in polyacrylamide gels. Biochem. Biophys. Acta., 257:11, 1972.
112. VOGEL, Z. & ALTSTEIN, M. The adsorption of enkephalin to porous polystyrene beads: a simple assay for enkephalin hydrolysis. Febs. Lett., 80(2):237, 1977.
113. VOGEL, Z. & ALTSTEIN, M. The effect of puromycin on the biological activity of Leu-enkephalin. Febs. Lett., 9:44, 1979.
114. WAGNER, G.W.; TAVIANINI, M.A.; HERMANN, M.; DIXON, J. E. Purification and characterization of an enkephalin aminopeptidase from rat brain. Biochem., 20:733, 1981.

115. WATSON, S.J.; AKIL, H.; SULLIVAN, S. & BARCHAS, J.O. Immunocitochemical localization of methionine enkephalin: preliminary observations. Life Sci., 21:733, 1977.
116. WEBER, K. & OSBORN, M. The reliability of molecular weight determination by dodecil sulfate polyacrylamide gel electrophoresis. J. Biol. Chem., 244:4406, 1969.
117. YUKIMURA, T.; STOCK, G.; STUMPF, H.; UNGER, T. GAMTEN. Effects of [D-Ala<sup>2</sup>]-methionine-enkephalin on blood pressure control: role of enkephalins in rats. Clin. Sci., 61:347, 1981.
118. ZAGON, I.S.; Mc LAUGHLIN, P.J. Naltrexone modulates tumor response in mice with neuroblastoma. Science, 221:671, 1983.