

PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DA ENDO-OLIGOPEPTIDASE-A
DE MEMBRANAS DO CÉREBRO HUMANO.

KÁTIA MACHADO DA SILVEIRA FURTADO

D
7615-1
-987P

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

FORTALEZA - 1990.

FC-00002577-7

UNIVERSO DO CEARÁ
Biblioteca de Ciências da Saúde

Esta Dissertação foi submetida como parte dos requisitos necessários à obtenção do Grau de Mestre em Ciências Biológicas (Área de concentração Farmacologica), outorgado pela Universidade Federal do Ceará, e encontra-se à disposição dos interessados na Biblioteca Central da referida Universidade.

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

Kátia Machado da Silveira Furtado

Dissertação aprovada em 05 de outubro de 1990.

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. José Afonso Bruno
Prof. Adjunto de Anatomia da UFC

D E D I C O

aos meus queridos pais, pelos esforços que empreenderam em favor do meu aperfeiçoamento profissional e do meu crescimento humano;

ao meu dedicado esposo, pela compreensão e carinho, nas horas mais difíceis, quando tive arduamente de conciliar minhas obrigações do lar e meus deveres universitários;

e às minhas queridas filhinhas, pelo puro e infantilmente compreensivo amor, a mim dedicado, sabendo suportar a minha ausência de mãe, durante tanto tempo.

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

A G R A D E C I M E N T O S .

Ao fim de um trabalho como este, que, ao longo de cinco anos, me levou a conhecer e a conviver com inúmeras pessoas, é sempre possível que eu possa incorrer em omissões involuntárias, quanto a lembrar e agradecer, nominalmente, a todos aqueles que prestaram, de uma forma ou de outra, sua colaboração construtiva, e sobretudo leal e amiga.

Perdoem-me, portanto, os involuntariamente omitidos, aos quais também estendo o meu reconhecido agradecimento.

Em razão do convívio funcional vivenciado, de modo destacado e cordial, A G R A D E Ç O

ao Professor KRISHNARMURTI DE MORAIS CARVALHO a discreta sapiência, a proficiência pedagógica, a temperança e a firmeza de atitudes - qualidades intelectuais e espirituais que tão bem exercitou no orientar-me, e que tanto me serviram de seguro arrimo e de sábio incentivo, em momentos difíceis de desânimo, em meio à minha decisão segura e determinada de chegar ao fim.

Com igual destaque e apreço, A G R A D E Ç O

à Professora e amiga GISELA COSTA CAMARÃO a disposição solícita e afável para auxiliar-me com a sua experiência.

Ainda MEUS AGRADECIMENTOS:

ao Professor MANASSES CLAUDINO FONTELES, de cuja erudição científica usufruí valioso proveito;

ao Professor ANTONIO CARLOS MARTINS DE CAMARGO, por seu apoio e estímulo valiosos;

ao Professor JOSÉ AFONSO BRUNO, que contribuiu com a cessão do material mais nobre do trabalho - o encefalo humano;

ao Professor RUY CAPAZ, que colaborou gentilmente na elaboração dos gráficos;

ao Professor CARLOS GEMINIANO NOGUEIRA COELHO, por sua habitual prestimosidade em ajudar-me em matéria de fotografia;

à Professora MARIA FRANCELINA FURTADO CHAGAS, por sua significativa contribuição em assunto fotográfico;

à Bibliotecária NORMA LINHARES, pela maneira gentil de propiciar-me acesso fácil às fontes bibliográficas deste trabalho;

à colega MARIA GORETTI DE RODRIGUES QUEIROZ, pelo espírito de companheirismo e de equipe, em todos os momentos da caminhada;

aos meus diletos pais e familiares, que muito me ajudaram na edição computadorizada deste trabalho;

às prestimosas colaboradoras SILVANDIRA FREITAS DE FRANÇA e JOANA MARTINS DE ARAÚJO TAVARES, pelo importante auxílio nas tarefas laboratoriais.

ÍNDICE

Página

1- INTRODUÇÃO :

1.1- Peptídeos opióides.....	01
1.2- Famílias de peptídeos opióides.....	02
1.2.1- Pró-opiomelanocortina.....	02
1.2.2- Pró-dinorfina ou pró-encefalina-B.....	03
1.2.3- Pró-encefalina ou pró-encefalina-A.....	05
1.3- Distribuição dos peptídeos opióides.....	07
1.4- Degradação de peptídeos opióides endógenos.....	09
1.4.1- Enzimas de degradação de encefalinas.....	09
A- Aminopeptidase.....	10
B- Dipeptidilaminopeptidase.....	11
C- Dipeptidilcarboxipeptidase.....	11
D- Enzima conversora de angiotensina.....	12
1.5- Enzimas liberadoras de encefalinas.....	13
1.6- Objetivos.....	15

2- MATERIAL E MÉTODOS

Página

2.1- Material.....	16
2.1.1- Origem enzimática.....	16
2.1.2- Peptídeos utilizados.....	16
2.1.3- Materiais diversos.....	16
2.2- Métodos.....	18
2.2.1- Extração enzimática.....	18
2.2.2- Determinação do método ideal de solubiliza- ção da endo-peptidase-A de membranas.....	19
2.2.3- Cromatografia em DEAE-celulose.....	21
2.2.4- Concentração das frações enzimáticas por ul- tra filtração sob pressão reduzida.....	22
2.2.5- Eletroforese preparativa em coluna de gel de poliacrilamida.....	22
2.2.6- Determinação da atividade enzimática.....	25
2.2.7- Focalização isoelétrica em placa de sepha- dex-G-25.....	28
2.2.8- Cromatografia em Coluna sephadex-G-100.....	30
2.2.9- Eletroforese em placa de gel de poliacri- lamida sem S.D.S.....	32
2.2.10- Determinação das encefalinas liberadas dos peptídeos opióides pela endo-oligopep- tidase-A de membranas do cérebro humano.....	33

2.2.11- Determinação da concentração de proteínas nas frações enzimática.....	Página 33
---	--------------

3- RESULTADOS :

3.1- Determinação do método ideal para a solubilização da endo-oligopeptidase-A de membranas.....	35
3.2- Cromatografia em DEAE-celulose da fração solubilizada do precipitado do homogenato do cérebro humano....	36
3.3- Eletroforese preparativa em coluna de gel de poliacrilamida dos pools da cromatografia em DEAE-celulose.....	38
3.4- Determinação do peso molecular da endo-oligopeptidase-A purificada.....	41
3.5- Focalização isoelétrica do endo-oligopeptidase-A de membranas em placa em sephadex-G-25.....	41
3.6- Efeitos de cátions divalentes, substâncias inibidoras e ativadoras sobre a endo-oligopeptidase-A de membranas.....	41
3.7- Liberação de encefalinas presentes em peptídeos opióides quando incubados com a endo-oligopeptidase-A de membranas do cérebro humano.....	46

4- DISCUSSÃO :	Página
4.1- Metodologia de solubilização e purificação.....	54
4.1.1- Solubilização da endo-oligopeptidase-A de membranas do cérebro humano.....	54
4.1.2- Purificação da endo-oligopeptidase-A de mem- branas do cérebro humano.....	54
4.2- Caracterização da endo-oligopeptidase-A de mem- branas do cérebro humano e comparação com a endo- oligopeptidase-A solúvel.....	55
4.3- Endo-oligopeptidase-A de membranas e diferente da metaloendopeptidase (E.C.3.4.24.15.) ?.....	56
4.4- Envolvimento de endo-oligopeptidase-A de membranas na liberação de encefalinas a partir de peptídeos intermediários contendo encefalina.....	57
4.5- Endo-oligopeptidase-A de membranas pode estar en- volvida com a fisiologia da dor ?.....	59
5- CONCLUSÃO	62

LISTA DE FIGURAS

Página

01- Peptídeos liberados através do processamento da pró-opiomelanocortina no lobo anterior da hipófise, lobo intermediário e sistema nervoso.....	04
02- Peptídeos liberados através do processamento da pró-encefalina na medula supra-renal e sistema nervoso.....	06
03- Peptídeos liberados através do processamento da pró-dinorfina no lobo anterior da hipófise, neuro-hipófise e sistema nervoso.....	08
04- Processo de extração enzimática.....	20
05- Sítio de hidrólise da bradicinina pela endo-oligopeptidase-A.....	27
06- Cromatografia de ARG, ARG1-FEN5, ARG1-PRO7, ARG1-FEN8, GLI4-ARG9, FEN5-ARG9, SER6-ARG9, e FEN-ARG em coluna de aminex A-5 acoplada ao micro analisador de peptídeos.....	29
07- Cromatografia em DEAE-celulose.....	37
08- Quantificação dos produtos de hidrólise da bradicinina pela endo-oligopeptidase-A em uma coluna de aminex A-5 coplada ao micro analisador de peptídeos.....	39
09- Eletroforese preparativa em coluna de gel de poliacrilamida.....	40
10- Cromatografia em coluna de Sephadex-G-100.....	42
11- Peso molecular da endo-oligopeptidase-A.....	43

	Página
12- Determinação do ponto isoelétrico da enzima purificada por focalização em Sephadex-G-25.....	44
13- Efeitos dos cátions divalentes, inibidores e substância ativadora sobre a endo-oligopeptidase-A de membranas purificada do cérebro humano.....	45
14- Estruturas e sítio de clivagem dos peptídeos opióides utilizados como substratos para a endo-oligopeptidase-A purificada do cérebro humano.....	47
15- Cinética de liberação da MET-enkefalina por hidrólise enzimática do BAM-12, octopeptídeo e MET-enkefalina-ARG-GLI-LEU-LIS pela endo-oligopeptidase-A de membranas purificada de cérebro humano.....	48
16- Cinética de liberação da LEU-enkefalina por hidrólise enzimática da dinorfina 1-8, B-neo-endorfina, alfa-neo-endorfina e dinorfina-B pela endo-oligopeptidase-A de membranas purificada do cérebro humano.....	49
17- Eletroforese em placa de gel de poliacrilamida sem S.D.S.....	50
18- Propriedades das endo-oligopeptidases-A de membranas e da fração solúvel do cérebro humano.....	51
19- Correlações dos efeitos dos cátions divalentes e substâncias inibidoras sobre as endo-oligopeptidases-A de membranas e da fração solúvel, purificadas do cérebro humano.....	52

ABREVIATURAS

ALFA-NEO-END. OU ALFA-NEO = ALFA-NEO-ENDORFINA

BAM 12 = PEPTIDEO OPIOIDE CONTENDO 12 AMINO-ACIDOS

BAM 22 = PEPTIDEO OPIOIDE CONTENDO 22 AMINO-ACIDOS

ENDO-A = ENDO-OLIGOPEPTIDASE-A

S.D.S = DUODECILSULFATO DE SODIO

R E S U M O

A endo-oligopeptidase-A de membranas do cérebro humano foi purificada próximo a homogeneidade, apresentando os seguintes passos de purificação:

- a) homogeneização com água na proporção de 1:4 (P.V);
- b) centrifugação a 25.000 G, durante 60 minutos;
- c) cromatografia em DEAE-celulose ; e
- d) eletroforese preparativa em gel de poliacrilamida.

Após a purificação, a enzima foi submetida a eletroforese em placa sem S.D.S., resultando no aparecimento de uma banda de proteína, com um leve contaminante.

A enzima purificada apresentou as seguintes propriedades:

- pH ótimo próximo da neutralidade;
- ponto isoelétrico de 5,36;
- peso molecular de 70.000 Dalton ;
- inibição pelos cátions Cu^{++} , Zn^{++} , Ni^{++} , Co^{++} , Ca^{++} e Fe^{++} , inibição pelo PMAC e PMSF;
- não foi inibido pelo EDTA e ortofenantrolina ;
- houve uma reativação com B-mercaptoetanol.

A endo-oligopeptidase-A de membranas liberou MET e LEU-encefalinas dos peptídeos opióides, tais como : Dinorfina 1-8 ; MET-ence.-ARG-GLI-LEU-LIS; Octopeptídeo ; BAM 12 ; B-neo-endorfina; Alfa-neo-endorfina e B-dinorfina. No entanto não liberou encefalinas de

peptídeos opióides com número de amino-ácido ≤ 7 ou ≥ 17 .

SUMMARY

From the membranes of human brain, the endo-oligopeptidase - A was purified close to homogeneity, introducing the following steps of purification.

- a) homogeneization with water in the proportion of 1:4 (W/V);
- b) centrifugation at 25,000 G., during 60 min;
- c) chromatography in DEAE-cellulose; and
- d) preparative electrophoresis in polyacrilamide gel.

After purification, the enzyme was submitted to plate electrophoresis without S.D.S., resulting in the appearance of a band of protein, with a light contaminant.

The purified enzyme showed the following properties:

- PH near to neutrality;
- isoelectric point of 5.36;
- molecular weight of 70,000 daltons;
- inhibited by cations Cu^{++} , Zn^{++} , Ni^{++} , Co^{++} , Ca^{++} and Fe^{++} ;
- inhibited by PMAC and PMSF;
- not inhibited by EDTA and orthophenanthralene;
- has a reactivation with B - mercaptoethanol.

The membranous endo-oligopeptidase - A released MET and LEU-enkephalins from the opioid peptides, such as: Dinorphin 1-8; MET-enkephalin-ARG-GLI-LEU-LIS; Octapeptide; BAM 12; B-Neo-endorphin and B-Dinorphin. However, it did not liberate enkephalins

with amino acid number of ≤ 7 or ≥ 17 from the opioid peptides.



INTRODUÇÃO .

1. - I N T R O D U Ç Ã O.

1.1 - PEPTIDEOS OPIÓIDES.

O fato de que alcalóides, semelhantes à morfina produziam no ser humano analgesia, sonolência, alteração do humor e obnubilação, criou a hipótese da existência de receptores opióides no S.N.C.

Com o avanço da tecnologia radioisótopa e com o uso de antagonistas e agonistas opióides, foi possível a determinação de estruturas específicas, no S.N.C., as quais tinham afinidade com agonistas e antagonistas opióides (PERT e SNYDER - 1973; SIMON e cols. - 1973; TERENIUS - 1973). Tais estruturas foram designadas de receptores opióides.

Após a identificação dos receptores opióides, levantou-se a idéia de que, no organismo, havia uma substância endógena que tinha alta afinidade com os receptores opióides, e que produziam efeitos semelhantes ao da morfina.

Em 1975, HUGHES e cols. isolaram, no homogenato do cérebro do porco, uma estrutura, biologicamente ativa, capaz de se ligar a receptores opióides. A substância endógena isolada era uma mistura de pentapeptídeos com seqüência de amino-ácidos de TIR-GLI-GLI-PHE-MET e TIR-GLI-GLI-PHE-LEU, as quais foram denominadas de MET-encefalina e LEU-encefalina.

Em 1976, foi demonstrado que os efeitos inibitórios das encefalinas poderiam ser completamente revertidos pela naloxone antagonista da morfina (GENT & WOLSTENCRAFT - 1976).

Um outro peptídeo de trinta e um amino-ácidos foi isolado da hipófise do camelo (LI e CHUNG - 1976), e designado de B-endorfina, o qual estava contido na seqüência terminal da B-lipotropina. Com a verificação da correlação entre a B-endorfina e a B-lipotropina (B-LPH), houve um maior interesse na descoberta de novos peptídeos a nível de S.N.C.

A partir do fato de que a B-lipotropina continha a seqüência de amino-ácidos da B-endorfina, surgiu a idéia de que possivelmente tanto a B-lipotropina como a B-endorfina originavam-se de uma macromolécula comum. No entanto, em 1977, MAINS e cols. demonstraram que a B-lipotropina derivava de uma macromolécula denominada de pró-opiomelanocortina (POMC).

1.2 - FAMILIAS DOS PEPTÍDEOS OPIÓIDES.

A identificação das macromoléculas, precursoras dos peptídeos opióides endógenos, foi realizada graças a tecnologia do DNA recombinante, que permitiu a elucidação das estruturas primárias das três famílias dos peptídeos opióides existentes, a saber:

- 1.2.1 - PRO-OPIOMELANOCORTINA - identificada por ROBERTS e cols., em 1977, e NAKANISHI, em 1979;
- 1.2.2 - PRO-DINORFINA ou PRO-ENCEFALINA B - identificada por KARIDANI e cols. - 1982
- 1.2.3 - PRO-ENCEFALINA ou PRO-ENCEFALINA A - identificada por NODA e cols. - 1982, e COM e cols., em 1982.

1.2.1 - FAMILIA PRÓ-OPIOMELANOCORTINA (POMC).

A pró-opiomelanocortina é uma macromolécula que contém 241 amino-ácidos. Sua extremidade amino terminal glicosilada possui

resíduos de cisteína seguida das seqüências ACTH e B-LPH, que ficam na extremidade carboxila.

A pró-opiomelanocortina é produzida tanto no lobo anterior como no lobo intermediário da hipófise. Os fragmentos produzidos pelo processamento da POMC variam de acordo com a região da hipófise.

No lobo anterior da hipótese, a POMC é clivada em fragmentos amino terminal glicosilados (fragmento 16k), peptídeos de junção (J.P), ACTH e B-LPH. A B-LPH é processada dando origem à Y-LPH e à B-endorfina.

No lobo intermediário da hipófise, o ACTH é clivado a ALFA-MSH e CLIP (peptídeo tipo corticotrofina do lobo intermediário). A B-LPH é clivada em Y-LPH e B-endorfina. A Y-LPH é clivada em B-MSH.

No curso do processo de maturação da POMC a hidrólise enzimática se dá entre os pares de amino-ácidos básicos.

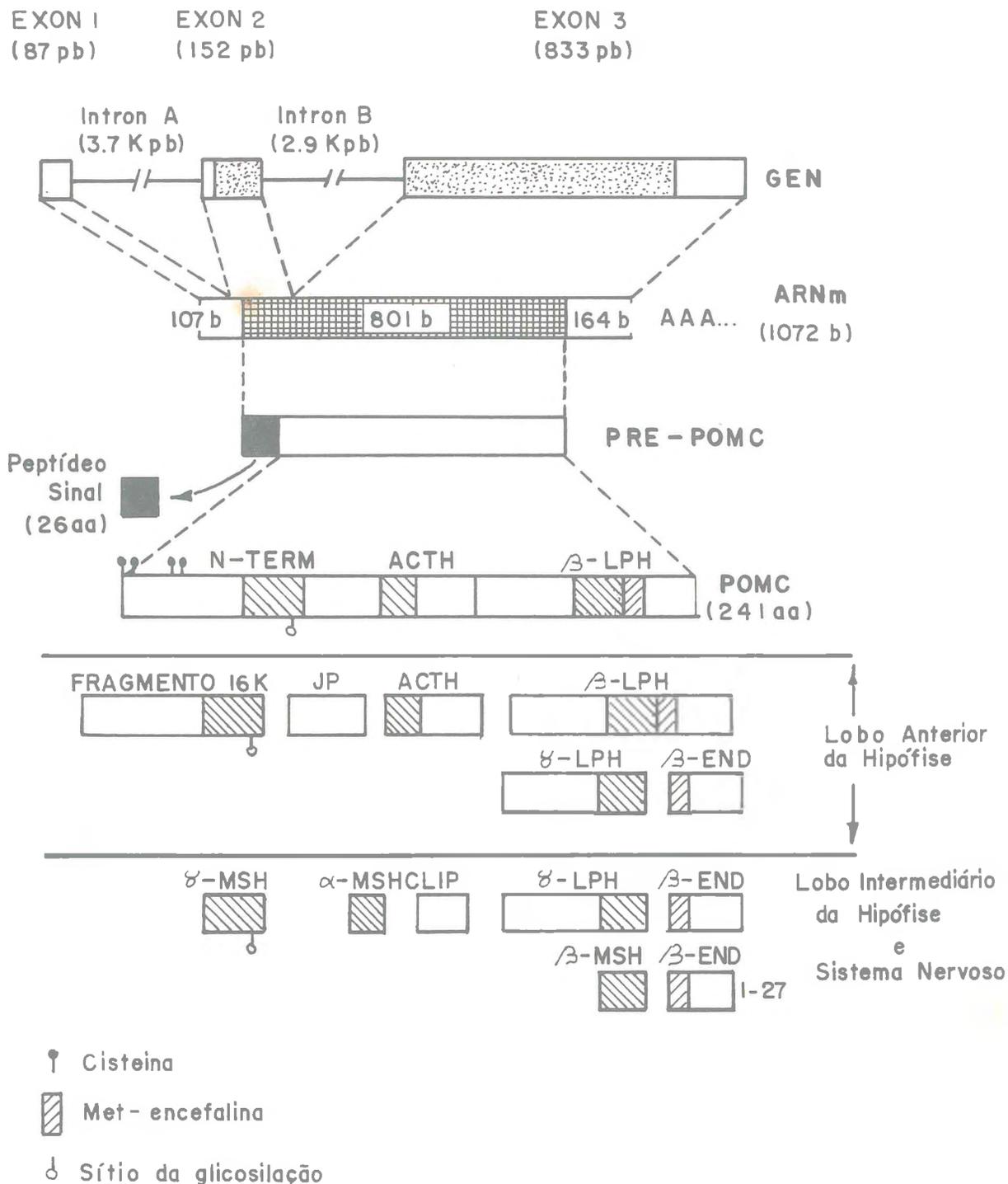
O esquema geral do processamento da POMC é mostrado na figura 1.

1.2.2 - PRODINORFINA ou PRO-ENCEFALINA B.

Em 1975, COX e cols. identificaram, na hipófise do porco, um peptídeo opióide distinto da B-endorfina. Através de técnicas bioquímicas clássicas, verificou-se que esse peptídeo continha 17 amino-ácidos com a seqüência TIR-GLI-GLI-PHE-LEU da LEU-encefalina, que toma a designação de dinorfina.

A obtenção de anti-corpos para a dinorfina permitiu uma purificação melhor; assim, determinou-se a seqüência de amino-ácidos

FIGURA - 1



da dinorfina, chamada posteriormente de dinorfina A (GOLDSTEIN e cols.-1981).

KARIDANI e cols., em 1982, conseguiram identificar a seqüência de amino-ácidos do precursor da dinorfina (pró-encefalina B), no cérebro do porco, através de técnicas do DNA recombinante.

A pró-encefalina B consiste de 234 amino-ácidos contendo, na extremidade amino terminal, grupamentos de cisteína, e, na extremidade carboxil terminal: a neo-endorfina, dinorfina A e dinorfina B (fig.2). As diferentes enzimas proteolíticas, nas diversas regiões do S.N.C., processam a prodinorfina em diferentes fragmentos contendo neo-dinorfina e dinorfina.

No lobo anterior da hipófise, a pró-dinorfina é processada, na extremidade carboxil terminal, em neo-dinorfina e em fragmentos de peso molecular de 6.000 Dalton, contendo em sua estrutura a dinorfina A (resíduo 1-17) e dinorfina B (rimorfina).

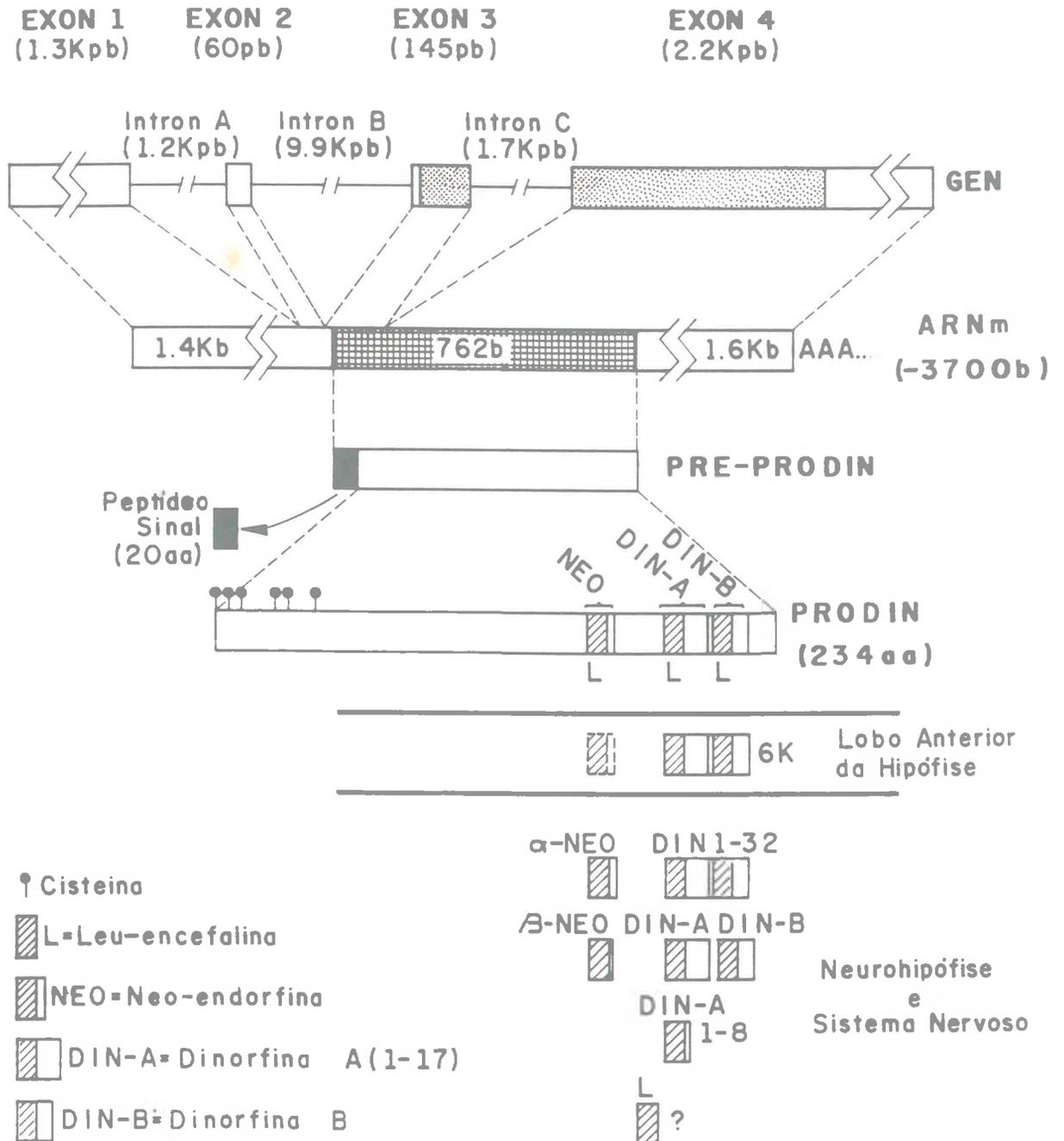
Na neurohipófise e no S.N.C., a pró-dinorfina é processada, dando como resultado a ALFA-neo-endorfina, B-neo-endorfina, dinorfina A e dinorfina B.

As regiões mais ricas de peptídeos opióides derivados da pró-dinorfina estão situadas na parte reticulada da substância negra, no hipocampo, globo pálido ventral, núcleos supra-óticos e trato solitário.

1.2.3 - FAMÍLIA DA PRÓ-ENCEFALINA A.

A glândula adrenal de algumas espécies é particularmente rica de encefalinas e peptídeos correlatos. Numerosos peptídeos

FIGURA 2



contendo encefalinas foram isolados da glândula supra-renal de boi. Por tal razão, o modelo adrenal tem sido usado para o estudo da síntese das encefalinas.

A completa seqüência de nucleotídeo da pró-encefalina A de boi foi elucidada por NODA e cols.-1982. A pró-encefalina A possui, na sua estrutura, uma seqüência de 263 amino-ácidos, incluindo o peptídeo sinal. A extremidade amino terminal contém 6 grupos de cisteína seguidos por 4 cópias de MET-encefalina, uma LEU-encefalina, um octopeptídeo MET-ENCEF-ARG-GLI-LEU (adrenorfina ou metorfamide), um heptapeptídeo MET-ENCEF-ARG-FEN, os quais se encontram na extremidade carboxil terminal. Todos esses peptídeos estão ligados, entre si, por pares de resíduos de amino-ácidos, e representam, aparentemente, o sítio de processamento proteolítico.

Outros peptídeos menores resultantes do processamento da pró-encefalina A foram isolados: fragmentos 23.3 K, 18.2 k, 12.6 K, 8.6 k, peptídeo F, peptídeo I, peptídeo E, peptídeo B, BAM 22p e BAM 12p.

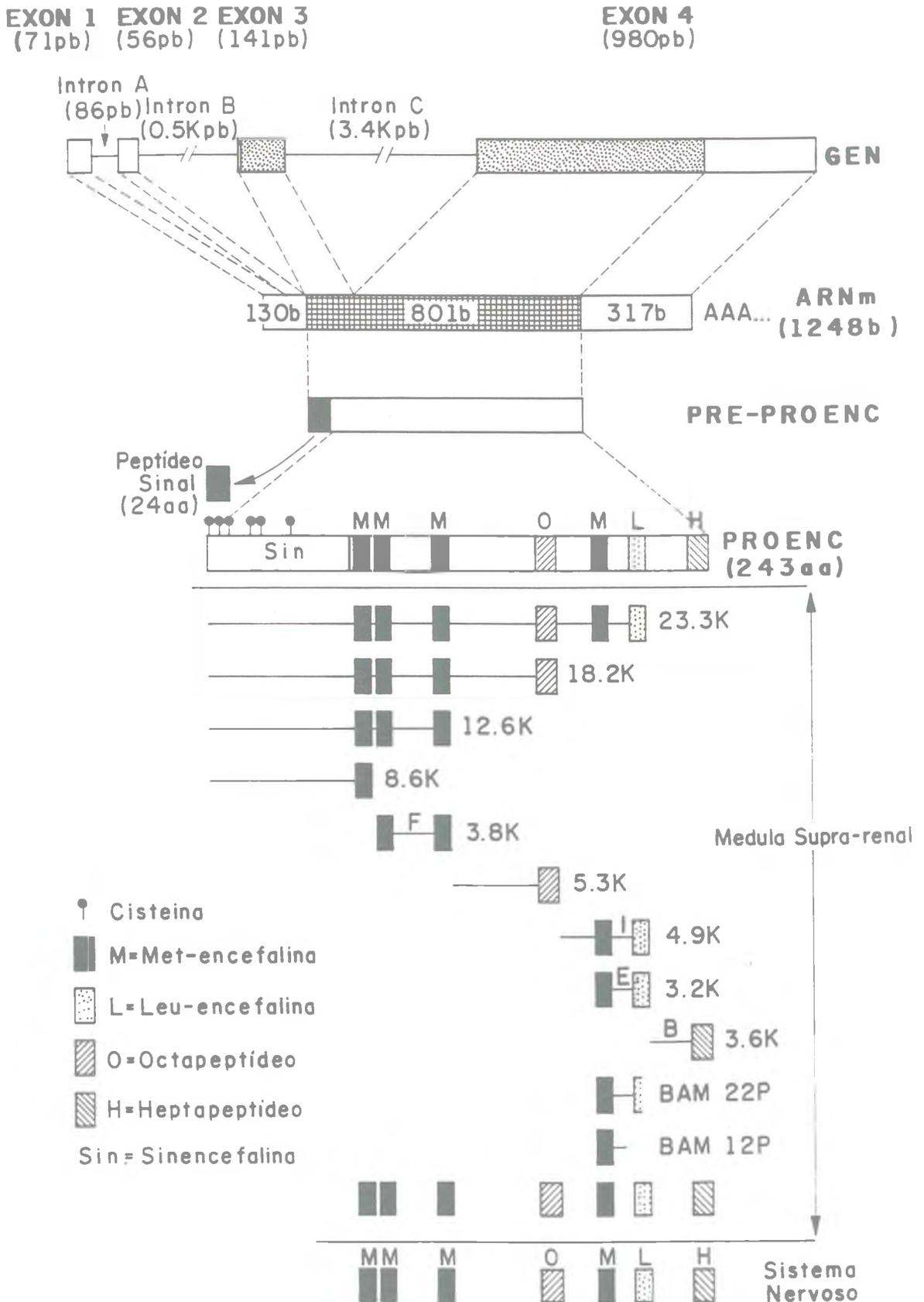
O esquema da biossíntese da pró-encefalina A, a nível de medula adrenal e sistema nervoso, é sugerido por PATEY e cols.-1986, como mostra figura 3.

1.3 - DISTRIBUIÇÃO de PEPTÍDEOS OPIÓIDES.

Os peptídeos opióides resultantes dos processamentos das três famílias, anteriormente vistos, não se encontram restritos apenas no S.N.C. : são distribuídos também no Sistema Nervoso Periférico e em tecidos não nervosos.

A nível de S.N.C., os peptídeos opióides estão distribuídos de forma bastante heterogênea, sendo encontrados em maior quantidade no núcleo caudado, núcleo lentiforme, nos núcleos

FIGURA 3



supra-ópticos e para-ventriculares do hipotálamo e na hipófise.

A nível de sistema nervoso simpático, os neurónes encefalinérgicos estão presentes entre os neurónes pré-ganglionários, os quais têm origem na medula espinhal.

A nível de sistema nervoso parassimpático, foi detectada a presença de encefalinas nas fibras do nervo vago.

No sistema nervoso entérico, as encefalinas foram constatadas nos neurónes intrínsecos, cujos corpos celulares estão localizados nos gânglios mesentéricos.

A nível de tecidos não nervosos, os peptídeos correlacionados com os opióides foram localizados em células endócrinas do trato gastroentestinal (LARSON - 1981), pâncreas (BRUNI e cols. -1979) gónadas do sistema reprodutivo macho e fêmea, sistema imunológico (linfócitos) e medula supra-renal.

1.4 - DEGRADAÇÃO DE PEPTÍDEOS OPIÓIDES ENDÓGENOS.

A biossíntese de precursores opióides é regulada tanto pelas taxas de DNA como de RNA. No entanto, as quantidades de fragmentos biologicamente ativos, dos precursores opióides, dependem de vários processamentos enzimáticos ativos. Pelo fato de que peptídeos opióides estão intimamente relacionados com hormônios da pituitária (HG, ACTH, gonadotrofinas, TSH, prolactina, e VIP) é de se esperar a grande importância das enzimas de degradação e liberação de encefalinas.

1.4.1 - ENZIMAS DE DEGRADAÇÃO DE ENCEFALINAS.

Três tipos bem definidos de peptidases ativas, no S.N.C., estão envolvidos na hidrólise das encefalinas. As peptidases

humano (PINTO DUARTE -1984).

A aminopeptidase possui peso molecular em torno de 100.000 Dalton (exceto aminopeptidase de striatum humano que é de 61.000 Dalton), pH ótimo, próximo da neutralidade. Contém em sua estrutura grupamentos tiol e metálicos, todavia, essa enzima é inibida pela puromicina, bestatin, amostatin e bacitracina.

b) DIPEPTIDILAMINOPEPTIDASE

Em 1978, CRAVES e cols. observaram a hidrólise da MET-encefalia na ligação GLI2-GLI3. GORESTEIN e SNYDER confirmaram esta observação em 1980 e tentaram purificar uma enzima, a encefalinase B que cliva a MET-encefalina GLI2-GLI3. No entanto, outros autores relataram que a encefalinase B poderia ser separada em duas encefalinases A1 e A2 (clivam GLI3-FEN4), porém estão associadas com aminopeptidase e E.C.A. durante a purificação.

LEE e SNYDER, 1982 isolaram de cérebro uma dipeptidilaminapeptidase III.

c) DIPEPTIDILCARBOXIPEPTIDASE (encefalinase A)

Extratos de cérebros, quando incubados com MET-encefalina ou LEU-encefalina, produzem tripeptídeo (TIR-GLI-GLI-) resultantes da clivagem da MET ou LEU-encefalina na ligação GLI3-FEN4 (SULLIVAN e cols., 1981; MALFROY e cols., 1978).

A encefalinase A não parece ser uma tiol-peptidase (MALFROY e cols. 1978; SULLIVAN e cols. 1981), pois sua atividade enzimática não é alterada por reagentes tióis (p-

cloromercuriofenilsulfamato). Evidências experimentais mostraram que a encefalinase contém íon Zn^{++} no sítio ativo, que pode ser quelado pelo EDTA e o-phenantrolina, resultando na inibição da atividade enzimática (J.P. SWERTS e cols.-1979). A presença de íon Zn^{++} , no sítio ativo da encefalinase, é compatível com uma metalopeptidase. Reagentes tipo di-isopropilfluorofosfato não alteram sua atividade, sugerindo ausência de resíduo de serina.

O pH ótimo da encefalinase extraída da membrana do cérebro de rato é entre 6.5 e 7 (SULLIVAN e cols., 1978 ; VOGEL e cols., 1981).

A encefalinase é inibida por tiorfan, fosfatos e o íon cloro (SWERTS e cols., 1979 ; GORENSTEIN e SNYDER, 1980)

d) ENZIMA CONVERSORA DE ANGIOTENSINA (ECA)

A enzima conversora de Angiotensina (ECA), conhecida também como cininase II, catalisa angiotensina I em angiotensina II, que é um potente vasoconstrictor. É uma glicoproteína com peso molecular de 140.000 Dalton e contém em sua estrutura um íon de Zn^{++} ; atividade dependente da concentração de íon de cloro e é inibida pelo captopril e teprotide (YANG and NEFF-1973; SWERTS e cols.-1979; ARREGUI e cols.-1979).

A enzima conversora de angiotensina está envolvida com a inativação da bradicinina que é nonapeptídeo com seqüência de aminoácidos de ARG-PRO-PRO-GLI-FEN-SER-PRO-FEN-ARG.

ERDOS e cols., 1978, demonstraram que E.C.A. purificada dos rins do porco, era capaz de clivar a ligação GLI³-PHE⁴ da MET ou LEU-encefalinas, liberando fragmentos TIR-GLI-GLI e PHE-MET ou PHE-

LEU. Tal demonstração admitiu a possibilidade de a E.C.A. estar envolvida na inativação fisiológica das encefalinas na fenda sináptica encefalinérgica. Em contraste, a E.C.A. não se encontra distribuída paralelamente a receptores opióides ou a encefalinas, no S.N.C., e apresenta uma baixa afinidade por encefalinas.

1.5 - ENZIMAS LIBERADORAS DE ENCEFALINAS.

A pró-insulina contém, na sua estrutura, pares de amino-ácidos básicos (ARG-LIS ou LIS-ARG) que estão situados nos pontos de clivagem, dando origem as insulinas B e A e ao peptídeo de conexão C. Esses pares de amino-ácidos básicos (LIS-ARG e ARG-LIS) têm sido encontrados na seqüência de amino-ácidos dos diferentes precursores dos neuropeptídeos. O fato de que os amino-ácidos básicos, acima citados, são pontos de clivagem e estão presentes tanto nos precursores da insulina como nos precursores dos neuropeptídeos, foi sugerido num modelo de biossíntese dos neuropeptídeos (PATEY e cols., 1986), a partir de um precursor protéico:



Na maturação dos precursores protéicos, ocorre uma seqüência de proteólise envolvendo três diferentes tipos de

proteases: 1) uma endopeptidase do tipo tripsina e uma aminopeptidase, as quais liberam fragmentos LIS ou ARG na extremidade amino terminal do precursor; 2) na extremidade carboxil-terminal, uma exopeptidase do tipo carboxilpeptidase B e uma endopeptidase do tipo tripsina que clivam ligações peptídicas LIS-X ou ARG-X.

As quatro enzimas, descritas acima, resultam na liberação do neuropeptídeo na sua forma ativa, como proposto por PATEY e cols., 1986.

Uma nova enzima proteolítica foi purificada no homogenato do cérebro do coelho por CARVALHO e CAMARGO (1981): é a designada de endo-oligopeptidase-A.

CAMARGO e cols. (1985, 1987) demonstraram que a endo-oligopeptidase-A, purificada do cérebro do boi, clivava ligações peptídicas de vários peptídeos opióides (8 a 16 resíduos), liberando MET-encefalina e LEU-encefalina. Essa liberação foi feita com apenas uma hidrólise, demonstrando um modelo alternativo para o modelo proposto por PATEY e cols., 1986.

CAMARÃO, em 1987, purificou e caracterizou a endo-oligopeptidase-A solúvel, do encéfalo humano, com as seguintes características: ponto isoelétrico 4,9; peso molecular em torno de 70.000 Dalton; inibição pelo p-mercúrio acetato, Cu^{++} , Zn^{++} , Ni^{++} e Co^{++} . Não foi inibida pelo EDTA, fosforamidon, bacracina e puromicina.

Em 1984, a endo-oligopeptidase-A foi catalogada pelo NOMENCLATURE COMMITTEE OF THE INTERNATIONAL UNION OF BIOCHEMISTRY como a E.C.3.4.19.22.

CARVALHO, em 1978, demonstrou a existência da endo-oligopeptidase-A em membranas de cérebro do coelho, mas realizou apenas um isolamento e caracterização parcial dessa enzima.

ORLOWSKI e cols. (1981 e 1983) isolaram uma endopeptidase neutra que, quando incubada com dinorfina, alfa-neodinorfina e B-neoendorfina, liberava LEU-encefalina. Essa enzima foi designada de metaloendopeptidase, por ter no sítio ativo um (1) átomo de Zn^{++} . Outros peptídeos foram clivados pela metaloendopeptidase, tais como: bradisinina (PHE-SER); neurotensin (ARG-ARG); luliberium (HIS²-TRP³ e TRI⁵-GLI⁶) e substância P (PRO⁴-GLI⁵, PHE⁷-PHE⁸ e PHE⁸-GLI⁹). Algumas propriedades foram determinadas: pH ótimo, próximo da neutralidade; peso molecular de 67.000 Dalton; inibição pelo EDTA, o-fenantrolina e reativação pelo Zn^{+2} , Co^{+2} e Mn^{+2} .

Todavia, TOFOLETTO e cols. (1988) demonstraram que a metaloendopeptidase (ORLOWSKI, 1981) e a endo-oligopeptidase-A (CARVALHO e CAMARGO, 1981) são duas enzimas distintas, como concluiremos na discussão.

1.6 - O B J E T I V O S .

1.6.1 - Purificar e caracterizar a endo-oligopeptidase-A de membranas do cérebro humano, num tempo "post-mortem" máximo de 6 horas.

1.6.2 - Determinar as possíveis diferenças entre a endo-oligopeptidase-A, de membranas, e a endo-oligopeptidase-A solúvel.

MATERIAL E METODOS.

2. - MATERIAL E MÉTODOS.

2.1 - MATERIAL.

2.1.1 - ORIGEM DA ENZIMA.

Cérebro humano congelado a -18 graus C., doado pelo Departamento de Morfologia da Universidade Federal do Ceará, após um tempo "post mortem" de 6 horas.

2.1.2 - PEPTIDEOS UTILIZADOS.

BAM 22 -Cambridge Research Biochemicals.

BAM 12 -Cambridge Research Biochemicals.

B-NEO-ENDORFINA -Cambridge Research Biochemicals.

LEU-ENKPHALIN-ARG -Seva.

LEU-ENKPHALIN -Calbio Chem.

MET-ENKPHALIN -Calbio Chem.

MET-ENKPHALIN-ARG-PHE. -Peninsula Synthetic.

MET-ENKEPHALIN-ARG-GLI-LEU-LIS -Peninsula Synthetic.

ALFA-NEO-ENDORFINA .. -Cambridge Research Biochemicals.

DIN 1-27 -Cambridge Research Biochemicals.

OCTOPEPTIDEO -Cambridge Research Biochemicals.

DINORFINA 1-8 -Cambridge Research Biochemicals.

DINORFINA-B -Cambridge Research Biochemicals.

2.1.3 - MATERIAIS DIVERSOS.

TRITON - X 100 -Beckman

BRIJ - 25 -Sigma, U.S.A.

DITHIOTREITOL (DDT)... -Calbio Chemicals, San Diego, Cali-
 B-MERCAPTOETANOL -E. Merck, Darnsdatt.
 GLICINA P A -E. Merck, Darnsdatt.
 MEMBRANA P/ DIALISE... -Union Carbide Corp. Illions, E.U.A.
 DEAG - CELULOSE -Whatman, Maidstone-Inglaterra.
 METAND P.A -Merck.
 HIDROXIDO DE SODIO .. -Reagen, Brasil.
 ACIDO CLORIDRICO - Merck, Brasil.
 ACRILAMIDA -Fluxa A.G. Buchs S.G.
 N-NMETILENO-BIS-ACRI-
 LAMIDA -Fluxa A.G. Buchs S.G.
 TMED - LOT 3683 -Canalco.
 GLICEROL -Carlo Erba, Brasil.
 ACIDO ACÉTICO P.A ... -E. Merck, Darnsdatt.
 COMASIE BLUE - Lote 18C-032, No. B1131 -Sigma.
 REAGENTE DE FOLIN ... -E. Merck, Darnsdatt.
 ATROPINA -Merck.
 ALBUMINA BOVINA -Miles Laboratories Inc., E.U.A.
 OVOALBUMINA -Pearce Chemical Co., Rockford,
 Illions, U.S.A.
 SEPHADEX-G.100 - FINE
 (40-120)..... -Pharmacia Fine Chemicals AB,
 Upala, Suecia.
 ANPHOLINE (pH 4-6) ..
 BLUE DEXTRAN -Pharmacia Fine Chemicals, Upala,
 Suecia.
 SULFATO FERROSO -Reagen.
 CLORETO DE CÁLCIO ... -Merck.
 EDTA -Carlo Erba.
 CLORETO DE COBALTO .. -Merck.

2.1.4 - A P A R E L H O S .

L I Q U I D I F I C A D O R

CENTRIFUGA REFRIGERA-

DA -Beckmann, modelo J-21C, rotores
JA-14.NA-20 -Beckmann Instru-
ments, Inc, California, E.U.A.

BOMBA PERISTÁLTICA .. -Technical Instruments Corpora-
tion - New York, E.U.A.

COLUNA DE VIDRO PARA CROMATOGRAFIA.

APARELHO PARA ELETROFORESE PREPARATIVA EM COLUNA DE
GEL POLIACRILAMIDA .. -Construido em nosso laboratório.

ESPECTROFOTÔMETRO

MOD.G-2.400 -Beckmann Instruments, Inc. Munchen,
Alemanha.

TRANSDUTOR - N.B.S. -Microbio-Systems Microcraph F-60.

REGISTRADOR ECD-MODELO RB 102-SÉRIE 486.-S.Paulo, Brasil.

COLUNA DE VIDRO PARA DETERMINAÇÃO DE PESO MOLECULAR.

POTENCIÔMETRO MV 85 . -Clamann & Grahmert, Dresden.

2.2 - M E T O D O S .

2.2.1 - EXTRAÇÃO ENZIMÁTICA.

O cérebro humano, com o peso médio de 1 kg.e 200 gramas, obtido em um tempo "post mortem" de 6 horas, foi homogeneizado em água (1:4 p/v) a 4 graus C, liquidificado durante 90 segundos, com palhetas girando cerca de 6.000 rotações por minuto sem carga.

O homogenato foi centrifugado em centrífuga refrigerada (0 graus C -4 graus C), usando 25.000 G, durante uma hora, resultando em 2 frações: o sobrenadante 1 e o precipitado 1.

O precipitado 1 foi novamente ressuspenso e centrifugado por duas vezes com água nas mesmas condições descritas acima. Em seguida, o precipitado 2 foi ressuspenso com Triton X-100 a 1% na proporção de 1:2 (P/V), durante 12 horas, com a finalidade de extrair enzimas de membranas dessa fração (ver a seguir a determinação do método de solubilização). A mistura (precipitado 2 + Triton X-100) foi centrifugada a 4 graus C, do que resultaram o precipitado 3, que foi descartado, e o sobrenadante 3, que foi utilizado para o processo de purificação. O processo de purificação enzimática foi todo realizado em câmara fria, a 4 graus C.

Após a segunda centrifugação, o sobrenadante 3 foi submetido a uma diálise, com duas trocas de tampões (1:10; V:V). Nos tampões da diálise foram acrescentados B-mercaptoetanol 10⁻³M e Triton X-100 0,01%.

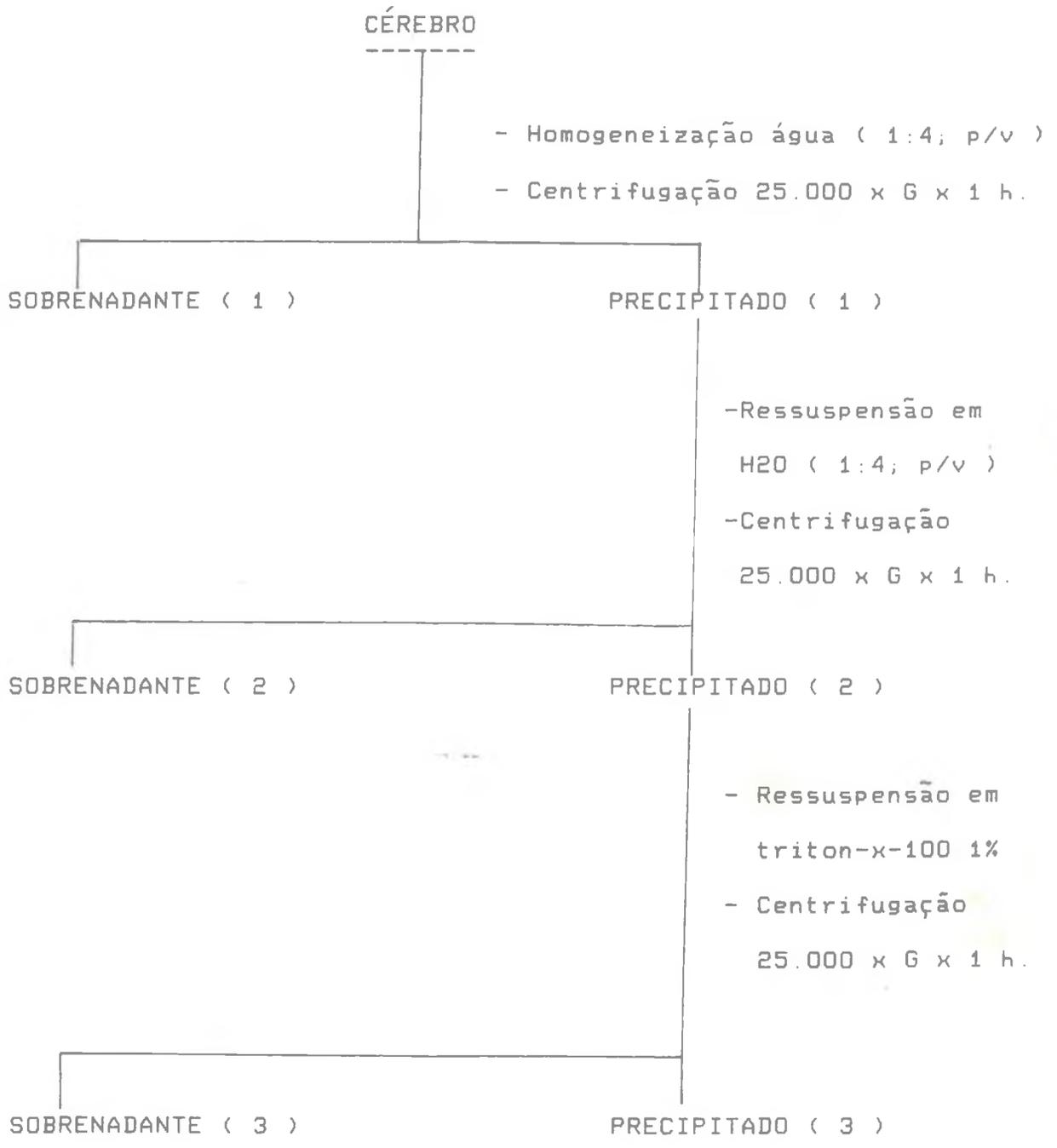
A figura 4 mostra todo o processo de extração enzimática utilizado.

2.2.2 - DETERMINAÇÃO DO MÉTODO IDEAL DE SOLUBILIZAÇÃO DA ENDO-OLIGOPEPTIDASE-A DE MEMBRANAS.

Um teste piloto foi realizado para definir qual o método de solubilização a ser utilizado na purificação. Seis tipos de experimentos preliminares foram efetuados, usando as seguintes soluções:

- a) Solução contendo TRIS-HCL 0,05M pH 7,5.
- b) Solução contendo TRIS-HCL 0,05M pH 7,5+Triton X-100 a 1%.
- c) Solução contendo TRIS-HCL 0,05M pH 7,5 + Brij-35 a 0,1%.
- d) Solução contendo TRIS-HCL 0,05M pH 9,0.
- e) Solução contendo TRIS-HCL 0,05M pH 9,0+Triton X-100 a 1%.

FIGURA — 4 Processo de extração enzimática



f) Solução contendo TRIS-HCL 0,05M pH 9,0 + Brij-35 a 0,1%.

O precipitado 2 foi ressuspenso com as soluções acima, na proporção de 1:4 (p/v), durante 12 horas a 4 graus centígrados e, em seguida, centrifugado a 25.000 G, por 60 minutos. Uma alíquota foi retirada e testada a atividade no íleo de cobaia.

2.2.3 - CROMATOGRAFIA EM COLUNA DEAE - CELULOSE.

A resina de DEAE-celulose foi reciclada com ácido sulfúrico 0,5N e hidróxido de sódio a 0,5N de acordo com o fabricante.

A Cromatografia DEAE-celulose foi realizada de acordo com os métodos de OLIVEIRA e cols. (1976), MARTINS (1977) e CARVALHO (1981).

A resina foi compactada, por gravidade, em uma coluna de vidro medindo 30 cm. de comprimento e 2,6 cm. de diâmetro. Após o empacotamento, a resina foi lavada com TRIS-HCL 0,05 M pH 7,5 até manter pH constante de 7,5.

A coluna DEAE-celulose foi acoplada a uma bomba peristáltica resultando um fluxo de 66 ml./h (90% do fluxo por gravidade).

O dialisado foi aplicado a coluna de DEAE-celulose e a seguir eluído com TRIS-HCL 0,05M pH 7,5 com B-mercaptoetanol 10^{-3} M de força iônica crescente, tais como: 0,05M; 0,07M; 0,1M; 0,15M e 0,3M de cloreto de sódio.

2.2.4 - CONCENTRAÇÃO DAS FRAÇÕES ENZIMÁTICAS POR ULTRA FILTRAÇÃO SOB PRESSÃO REDUZIDA.

Uma membrana de diálise, medindo em torno de 25 cm. de comprimento com um nó em uma das extremidades, foi adaptada a um funil de separação, o qual foi acoplado a um Kitasato. A amostra cromatografada foi aplicada no interior do funil de separação e o ar do interior do Kitasato foi aspirado por uma bomba a vácuo. A amostra foi concentrada até mais ou menos 2 ml. Todo esse processo ocorreu à temperatura de 4 graus centígrados.

2.2.5 - ELETROFORESE PREPARATIVA EM COLUNA DE GEL DE POLIACRILAMIDA.

A metodologia para eletroforese preparativa foi semelhante à utilizada por CARVALHO (1981), com algumas modificações.

O gel foi preparado em uma concentração final de 6% de poliacrilamida.

As soluções utilizadas nas preparações do gel foram guardadas em frascos escuros a 4 graus C e despejadas após 6 meses de seu preparo. Com exceção do persulfato de amônio que foi preparado na hora. As codificações das soluções abaixo são próprias do Laboratório.

Solução A: HCl 1.0N	48,0 ml.
TRIS	36,3 g.
TEMED	0,23 ml.
Água	100,00 ml.
(ajustar o pH para 8.9)	

Solução B:	HCl 1.0N	48,00 ml.
	TRIS	5,98 g.
	Água	100,00 ml.
	(ajustar o pH para 6.7)	
Solução C:	Acrilamida	19,20 g.
	Bis-acrilamida	0,64 g.
	Água	40,00 ml.
Solução G:	Persulfato de amônio	35,00 mg.
	Água	25,00 ml.
Solução H:	TRIS	1,50 g.
	Glicina	7,20 g.
	Água	100,00 ml.
Diluyente da amostra:	Glicerol	15,00 ml.
	Sol. B	5,00 ml.
	Água	10,00 ml.

O gel com $T^* = 10,34\%$ e $C^* = 3,22\%$ foi obtido da mistura de 7,9 ml. da solução A com 13,3 ml. da solução C e 0,5 ml. de água, deareada, adicionada a solução G (44,38 mg./1,7 ml. água) também deareada.

 Notações de HJERTEN (1962).

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

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

O aparelho para eletroforese preparativa é constituído de duas partes:

- 1 - Coluna de vidro - Na parte superior da coluna, existe uma cuba com a capacidade de 1,5 l. Na parte inferior da coluna, há uma câmara de eluição, composta de uma membrana de diálise e pérolas de vidro.
- 2 - Cuba inferior - Cuba com a capacidade de 1,5 l.

Após aplicação do gel de poliacrilamida, na coluna de vidro, a câmara de eluição foi feita com o auxílio de uma membrana e preenchida com TRIS-glicina pH 8.2. Na cuba superior foi adicionado 1,5 litro de TRIS-glicina pH 8.2, contendo B-mercaptoetanol 10⁻³M e colocado um eletrodo negativo em contacto com a solução.

Na cuba inferior, foi adicionado 1,5 litro de TRIS-glicina pH 8.2, contendo B-mercaptoetanol 10⁻³M e foi conectado um eletrodo positivo na borda dessa cuba. Os tampões TRIS-glicina pH 8,2 foram trocados duas vezes, ao dia, com a finalidade de manter o pH em torno 8,2.

O fluxo da bomba utilizado foi de 3,6 ml./h. (fração de 0,9 ml/tubo). Depois de uma pré-corrída de 6 horas com o corante azul de Bromofenol e com uma corrente de 30 mA., a amostra foi aplicada na parte superior do gel de Poliacrilamida.

No final da eletroforese, as frações que apresentaram atividades foram reunidas e concentradas até o volume de 2 ml.

2.2.6 - DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DA ENDO-OLIGO- PEPTIDASE - A.

A atividade foi verificada de duas maneiras:

- a) Atividade testada com relação à amplitude de contração do íleo de cobaia, induzida pela bradicinina.

A atividade da endo-oligopeptidase - A foi monitorizada por um ensaio biológico no íleo isolado de cobaia, que foi mantido a 37 graus centígrados em uma cuba contendo solução de Tyrode, atropina ($3,7 \times 10^{-8}M$) e benadril ($1,5 \times 10^{-6}M$). A atividade enzimática foi medida pela redução da amplitude da contração do íleo de cobaia produzido pela quantidade de bradicinina hidrolisada e comparada com a amplitude de contração do íleo, obtida por um controle contendo uma concentração conhecida de bradicinina e TRIS-HCL 0,05M pH 7,5 (CAMARGO & GRAEFF - 1969).

O meio de incubação foi preparado com 5 ul. de bradicinina (1mg./ml.), 1000 ul. de TRIS-HCL pH 7,5 e uma alíquota de enzima não superior a 200 ul.

A quantidade de enzima utilizada foi aquela para se obter de 40% a 50% de hidrólise de bradicinina, no período de 15 a 30 minutos de incubação.

- b) Atividade medida em relação com os produtos de hidrólise de bradicinina.

A atividade da endo-oligopeptidase - A pode ser determinada pelo produto de hidrólise da

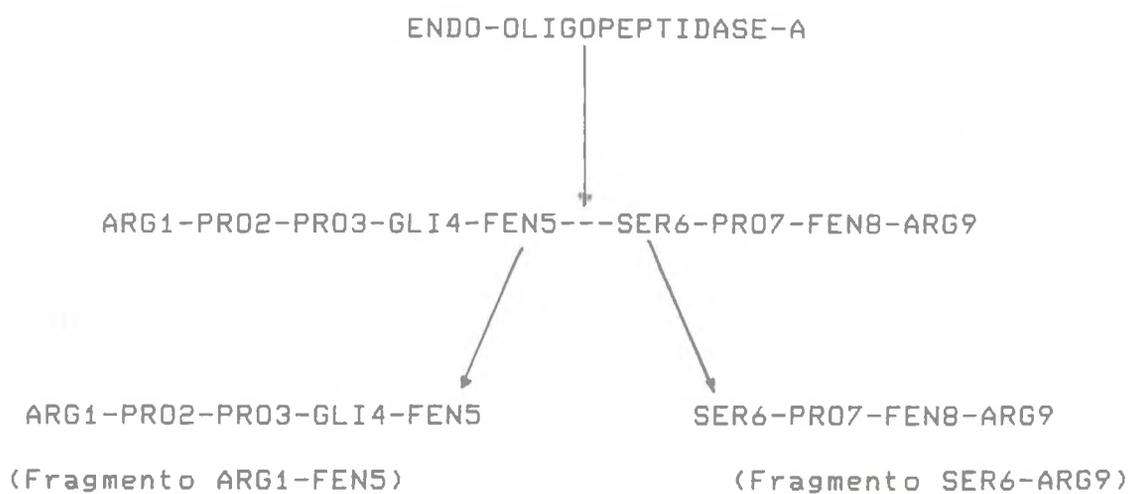
bradicinina, o qual foi determinado pelo analisador de amino-ácidos. A figura 5 mostra o sítio de hidrólise da bradicinina pela endo-oligopeptidase - A de cérebro humano e de cérebro de coelho (CAMARGO e cols. - 1973; OLIVEIRA e cols. - 1976; MARTINS -1977; CARVALHO-1978; CARVALHO e CAMARGO-1981; e CAMARÃO-1987.

O micro-analisador de amino-ácidos (ALONZO e HIRS - 1968), com modificações introduzidas por CARVALHO, foi utilizado para determinar os produtos de hidrólise da bradicinina. Esse método baseia-se na separação de peptídeos por cromatografia de troca iônica e posterior quantificação do efluente da coluna por um processo fotométrico, fundamentado na cor originada da reação de Ninidrina com os grupamento -NH₂ dos peptídeos.

Um registrador foi utilizado para as quantificações de absorção feitas em 570 nm., em que a concentração do peptídeo é diretamente proporcional a área do pico obtido no resgistro cromatográfico. Os peptídeos padrões usados foram os seguintes:

ARG - PRO - PRO - GLI - FEN;
ARG-PRO-PRO-GLI-FEN-SER-PRO;
ARG-PRO-PRO-GLI-FEN-SER-PRO-FEN;
GLI-FEN-SER-PRO-FEN-ARG;
FEN - SER - PRO - FEN - ARG;
SER - PRO - FEN - ARG;
FEN - ARG e ARG.

FIGURA- 5- Hidrólise da bradicinina pela endo-oligopeptidase-A membranas do cérebro humano.



A quantificação e a identificação dos produtos de hidrólise da bradicinina foram realizados, comparando-se o cromatograma da amostra com o cromatograma padrão apresentado na figura 06.

Uma alíquota da enzima em TRIS-HCL 0,05M pH 7,5 foi incubada por um tempo pré-estabelecido, com o substrato bradicinina. Após a incubação foi adicionado 100 ul. de polietilenoglicol, tampão citrato de sódio (0,2M - pH 2,2) e ácido clorídrico concentrado, nas proporções 30:69:1. A seguir, esse material foi aplicado no micro-analisador de peptídeos para a identificação dos produtos de hidrólise de bradicinina.

2.2.7 - FOCALIZAÇÃO ISOELÉTRICA EM PLACA SEPHADEX G-25.

A metodologia utilizada foi a descrita por RIGHETTI & DRAYSDAL (1970) modificado.

A focalização isoelétrica consiste na separação de proteínas pelos diferentes pontos isoelétricos, a qual é conseguida por um gradiente de pH em uma matriz, onde se faz migrarem as diferentes proteínas, quando se aplica uma diferença de potencial elétrico. A matriz utilizada foi o Sephadex-G-25, contendo 400 ul de uma substância anfótera (ampholine pH 4-6), glicerol a 10% e 500 ul. de enzima. Essa matriz foi distribuída, uniformemente, em uma placa de vidro, com uma escavação única e uma outra placa de vidro plana foi superposta. Nas duas extremidades da placa escavada

FIGURA 6 - Cromatografia de ARG-ARG1-FEN5; ARG1-PRO7, GLI4-ARG9,
FEN5-ARG9, SER6-ARG9 e FEN-ARG em uma coluna de aminex
A-5 acoplada ao micro analisador de peptídeos.

A coluna de aminex A-5, com dimensão de 0,2 x 50 cm foi equilibrada e desenvolvida a 80 graus C, utilizando-se um fluxo de 0,15 ml/min., com um tampão de citrato de sódio 0,65 M, pH 4,2, após 87 minutos o tampão eluente foi trocado para citrato de sódio 0,388 M, pH 7,5. O fluxo de ninidrina foi de 0,15 ml/min. A amostra continha : 6,7 nmoles de ARG, 32,0 nmoles de ARG-PRO-PRO-GLI-FEN , 25,6 nmoles ARG-PRO-PRO-GLI-FEN-SER-PRO, 12,0 nmoles de GLI-FEN-SER-PRO-FEN-ARG, 9,3 nmoles de FEN-SER-PRO-FEN-ARG, 7,0 nmoles de SER-PRO-FEN-ARG e 6,7 nmoles de FEN-ARG.

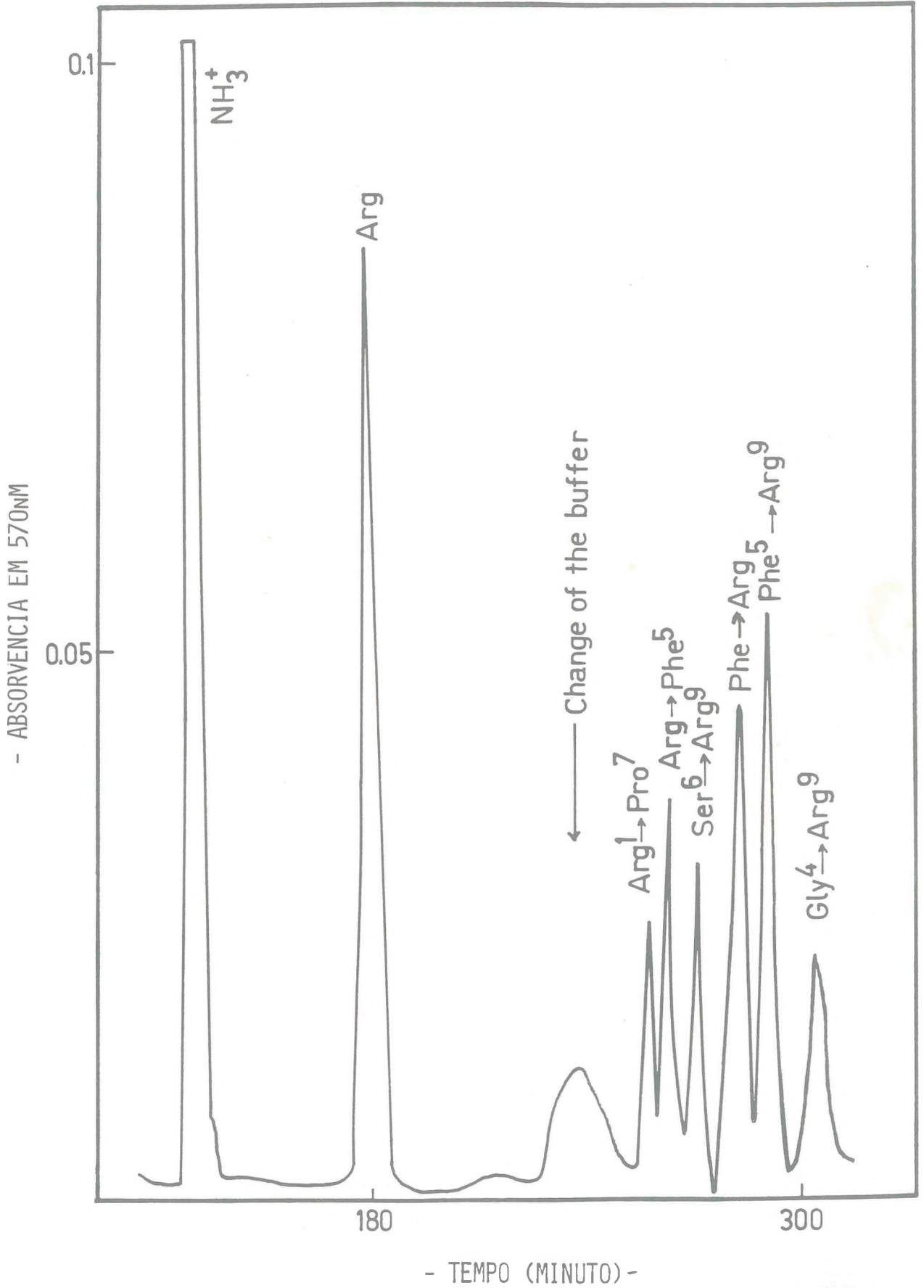
O pico NH₃⁺ ultrapassou o limite da capacidade do registrador .

FIGURA 6 - Cromatografia de ARG-ARG1-FEN5; ARG1-PRO7, GLI4-ARG9,
FEN5-ARG9, SER6-ARG9 e FEN-ARG em uma coluna de aminex
A-5 acoplada ao micro analisador de peptídeos.

A coluna de aminex A-5, com dimensão de 0,2 x 50 cm foi equilibrada e desenvolvida a 80 graus C, utilizando-se um fluxo de 0,15 ml/min., com um tampão de citrato de sódio 0,65 M, pH 4,2, após 87 minutos o tampão eluente foi trocado para citrato de sódio 0,388 M, pH 7,5. O fluxo de ninidrina foi de 0,15 ml/min. A amostra continha : 6,7 nmoles de ARG, 32,0 nmoles de ARG-PRO-PRO-GLI-FEN , 25,6 nmoles ARG-PRO-PRO-GLI-FEN-SER-PRO, 12,0 nmoles de GLI-FEN-SER-PRO-FEN-ARG, 9,3 nmoles de FEN-SER-PRO-FEN-ARG, 7,0 nmoles de SER-PRO-FEN-ARG e 6,7 nmoles de FEN-ARG.

O pico NH₃⁺ ultrapassou o limite da capacidade do registrador .

FIGURA 6



foi colocada duas esponjas embebidas com ácido sulfúrico 1M e hidróxido de sódio 1M, com a finalidade de manter os eletrodos em contacto com a matriz.

Todo o processo de focalização foi realizado com uma voltagem em torno de 530 volts e uma corrente de 4 mA. A medida que ocorria a focalização a mA. caia, gradativamente, enquanto a voltagem permanecia constante.

Após 24 horas de focalização, a matriz de sephadex -G-25 foi cortada em pequenos poços, utilizando-se um pente de metal. Cada porção contida nos poços foi retirada e colocada em um filtro de teflon e lavada com 1 ml. de água bidestilada, gelada e deaerada. O filtrado foi colhido em tubo e medido o pH. Depois da medição do pH, foram adicionados 100 ul. de TRIS-HCL 0,05M pH 7,5, com o intuito de neutralizar a solução e determinar a atividade enzimática.

2.2.8 - CROMATOGRAFIA EM COLUNA SEPHADEX - G-100.

A cromatografia, em coluna sephadex-G-100, foi realizada de acordo com a metodologia descrita por ANDREWS (1970), FISCHER (1971) e CARVALHO (1981).

Sua finalidade foi para calcular o peso molecular da enzima purificada.

O sephadex-G-100 foi colocado em água deionizada e aquecido a 100 graus centígrados, durante 5 horas, com o intuito de entumescer o gel. Após o resfriamento do gel, foram decantada as partículas ultra-finas que ficaram no sobrenadante. A resina foi lavada várias vezes com água deionizada. A seguir, a

resina foi lavada, excessivamente, com TRIS-HCL 0,05M pH 7,5, contendo B-mercaptoetanol a $10^{-3}M$.

O sephadex-G-100 foi compactado, lentamente, em uma coluna de vidro de 1,6 metros de comprimento e 1,9 cm. de diâmetro. Durante o empacotamento, manteve-se uma coluna de líquido a qual não ultrapassou a 25 cm. acima do nível de escoamento. Isto para não hiperempacotar a resina.

A coluna de sephadex-G-100 foi lavada com TRIS-HCL 0,05M pH 7,5, com B-mercaptoetanol $10^{-3}M$ com um fluxo de 12 ml./h. (cerca de 90% do fluxo de empacotamento da coluna) e com o auxílio de uma bomba peristáltica.

Antes que a amostra fosse aplicada na coluna de sephadex-G-100, foi adicionado, lentamente no topo do gel, 1 ml. de blue-Dextran 0,2%, com o objetivo de verificar alguma imperfeição na compactação da resina.

Após a corrida do blue-Dextran, foi aplicado um "pool" de proteínas, com peso molecular e concentração conhecidas. As proteínas utilizadas foram: ovoalbumina (p.m. 45.000); albumina bovina (p.m. 68.000) e gama-globulina (p.m. 150.000). A quantidade de cada proteína aplicada foi de 15 mg./3 ml.

A seguir, da cromatografia das proteínas padrões, uma amostra foi aplicada na coluna de sephadex-G-100 e eluída com tampão TRIS-HCL 0,05M pH 7,5, contendo B-mercaptoetanol a $10^{-3}M$.

Os volumes da eluição, obtidos para cada proteína, foram plotados em gráfico (ver figura 11).

2.2.9 - ELETROFORESE EM PLACA DE GEL DE POLIACRI- LAMIDA SEM S.D.S.

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

O gel utilizado para eletroforese, em placa, foi o mesmo da eletroforese preparativa: 7,5 ml. da solução A; 3,3 ml. da solução C; solução G (44,38 mg./31,7 ml. de H₂O) e 10,5 ml. de água deaerada.

O aparelho da eletroforese em placa é constituído de duas placas de vidro plano. Nos três lados das placas de vidro foram colocadas, com silicone, 3 tiras de acrílico e, na parte superior de cada placa, foi adaptado um pente de acrílico, com a finalidade de formar poços. As duas placas foram superpostas, vedadas com silicone, e acopladas por garras de metal em todos os lados.

Após ter sido feita a mistura do gel, essa mistura foi escoada, lentamente, entre as duas placas até cobrir totalmente o pente de metal, na porção superior das placas. Com a polimerização do gel, o pente foi retirado, deixando poços feitos. A placa foi conectada as duas cubas contendo TRIS-glicina pH 8,2. O processo da eletroforese ocorreu dentro da câmara fria (0 e 4 graus centígrados), com uma corrente de 12 mA.

O corante azul de bromofenol foi aplicado no primeiro poço (da esquerda para a direita) e nos poços seguintes foi aplicada a amostra vinda da eletroforese preparativa. A eletroforese foi cessada, quando o corante estava a 5mm. do término do gel.

O gel foi retirado da placa e colocado numa placa de PETRE, para ser fixado e corado por 12 horas, a temperatura ambiente, com Commassie B. Blue a 0,25% (P/V) em ácido acético (9,2%), metanol (45%) e água. A seguir o gel foi descorado com uma solução contendo ácido acético (7,5%), metanol (5%) e água.

2.2.10- DETERMINAÇÃO DAS ENCEFALINAS LIBERADAS DOS PEPTÍDEOS OPIÓIDES PELA ENDO-OLIGOPEPTIDASE-A DE MEMBRANAS DO CEREBRO HUMANO.

A liberação de encefalinas dos peptídeos opióides foi identificada pela cromatografia líquida de alta performance, utilizando-se uma coluna de fase reversa com grupamentos C-18 (u - Bondaback). Os peptídeos opióides foram incubados a 37 graus centígrados, em intervalo de tempo pré-estabelecido. A seguir, a reação de incubação foi interrompida com ácido fosfórico concentrado e a amostra aplicada no cromatógrafo, mantendo-se um fluxo de 1 ml./min.

A cromatografia transcorreu em duas etapas: A primeira, com gradiente isocrático de ácido fosfórico a 0,1%, por dez minutos seguidos de metanol a 30%, por mais dez minutos.

2.2.11- DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNAS NAS FRAÇÕES ENZIMÁTICAS.

O teor de proteína, nas frações enzimáticas, foi determinado pelo método de LOWRY (1951), utilizando-se a albumina bovina (1mg./ml.) como padrão.

Durante a cromatografia e a eletroforese preparativa foi traçado o perfil de proteínas, através da absorção de luz ultra-violeta, no comprimento de onda 280 nm., pelas frações obtidas.

RESULTADOS .

3. - R E S U L T A D O S.

3.1 - DETERMINAÇÃO DO MÉTODO IDEAL PARA SOLUBILIZAÇÃO DA ENDO-OLIGOPEPTIDASE - A DE MEMBRANAS.

Os testes pilotos, realizados para definirem qual o método solubilização a ser utilizado, apresentaram os seguintes resultados:

- | | |
|---|--------------------------|
| 1) Solução contendo TRIS-HCL 0,05M pH 7,5 | - Nenhuma solubilização. |
| 2) Solução contendo TRIS-HCL 0,05M pH 9,0+
+Brij -35 a 0,1% | - 36% de solubilização |
| 3) Solução contendo TRIS-HCL pH 9,0+T R I-
T O N-X-100 a 1% | - 65% de solubilização. |
| 4) Solução contendo TRIS-HCL 0,05M pH 9,0. | - 59% de solubilização. |
| 5) Solução contendo TRIS-HCL 0,05M pH 7,5+
+Brij -35 a 0,1% | - 65% de solubilização. |
| 6) Solução contendo TRIS-HCL 0,05M pH 7,5+
TRITON-X-100 a 1% | - 90% de solubilização. |

De acordo com os resultados apresentados acima, observa-se que o método, utilizando TRIS-HCL 0,05M pH 7,5 + TRITON-X-100 A 1%, apresentou-se mais eficiente para a solubilização da enzima, isto é, cerca de 90% da enzima foram

extraídas do precipitado.

3.2 - CROMATOGRAFIA EM COLUNA DEAE-CELULOSE DA FRAÇÃO SOLUBILIZADA DO PRECIPITADO DO HOMOGENATO DO CEREBRO HUMANO.

A figura 07 mostra o perfil da cromatografia de DEAE-celulose da fração solubilizada do precipitado, realizada com um discreto aumento da força iônica do eluente.

Na figura sete, observa-se dois tipos de gráficos:

- a) O gráfico com linhas cheias representa a leitura de ----- proteínas no espectrofotômetro em 280 nm. O pico I representa a eluição de proteínas que não foram adsorvidas pela resina. Os picos II e III de proteínas foram eluídos com TRIS-HCL 0,05 pH 7,5 contendo 50 mM. e 70 mM. de NaCl, respectivamente.
- b) O gráfico com linhas pontilhadas representa a atividade ----- cininásica que foi monitorizada pelo íleo de cobaia. Observa-se que, nas frações eluídas antes do aumento discreto da força iônica, não existia nenhuma atividade cininásica. No entanto, os picos "a" e "b" apresentaram atividade cininásica, correspondente aos tampões TRIS-HCL 0,05M pH 7,5 contendo 50 mM. e 70 mM. de cloreto de sódio, isto é, a endo-oligopeptidase - A foi eluída da resina com 50 mM e 70 mM de NaCl.

As frações com atividade cininásica foram reunidas e concentradas sob pressão reduzida. Em seguida foi adicionado, no concentrado, glicerol a 20%.

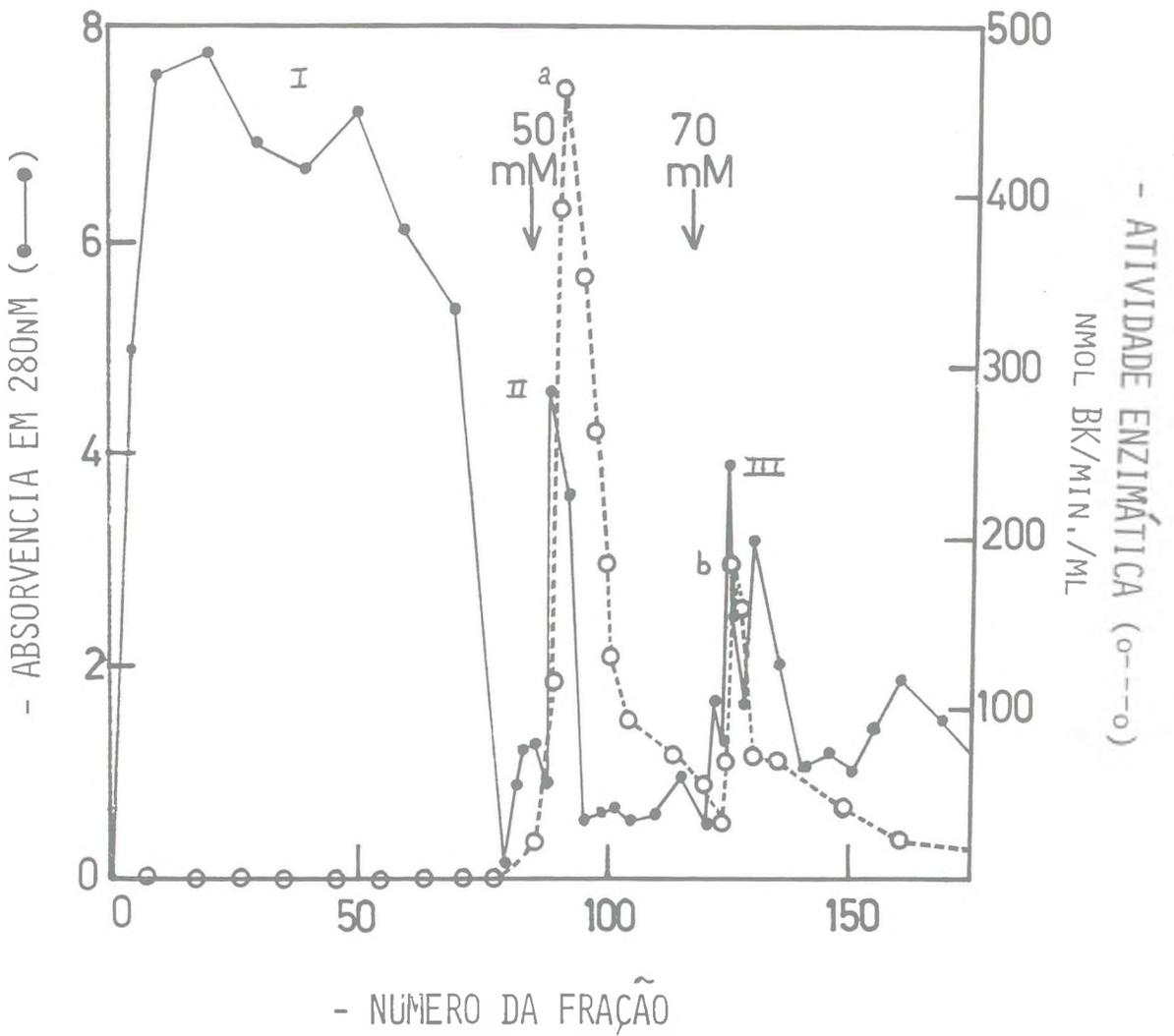
FIGURA 7 - Cromatografia em DEAE - celulose .A coluna (30cm x 2,6cm) foi equilibrada com TRIS-HCL 0,05M pH 7,5 e B-mercaptoetanol 10-3M.O fluxo da bomba de 66 ml./h (fração 10 ml). O tampão TRIS-HCL 0,05M pH 7,5 foi utilizado como eluente com força iônica crescente (0,05M; 0,07M; 0,1M; 0,15M e 0,3M de cloreto de sódio). A leitura de proteínas em 280 nm (●—●) apresentou 3 picos de proteínas:

- pico I representando as proteínas não adsorvidas a resina;
- pico II representa proteínas eluídas com TRIS-HCL 50 mM de cloreto de sódio;
- pico III representa proteínas eluídas com TRIS-HCL 70 mM de cloreto de sódio.

A atividade cininásica (o---o) apresentou 2 picos:

- a) pico "a" representa atividade cininásica eluída com TRIS-HCL 50 mM de NaCl.
- b) pico "b" representa atividade cininásica eluída com TRIS-HCL 70 mM de NaCl.

FIGURA 7



- ABSORVÊNCIA EM 280 NM - (● — ●)

- ATIVIDADE ENZIMÁTICA - (○ --- ○)
(nmol .BK/min. /ml)

Aliquotas dos concentrados foram incubados com bradicinina a 37 graus centígrados em TRIS-HCL 0,05M pH 7,5 até a hidrólise de 100% de substrato (bradicinina) e monitorizado pelo íleo de cobaia. Essas alíquotas foram diluídas em citrato de sódio 0,2M pH 2,2 contendo 15% de PEG (polietilenoglicol) na proporção de 1:1 (V/V) e aplicadas no micro-analisador de aminoácidos. Os fragmentos ARG1-FEN5 e SER-ARG foram observados e quantificados - figura 08.

3.3 - ELETROFORESE PREPARATIVA EM COLUNA DE GEL DE POLIACRILAMIDA DOS "POOLS" DA CROMATOGRAFIA EM DEAE-CELULOSE.

A figura 09 mostra o perfil da eletroforese preparativa do "pool" da cromatografia. Essa figura apresenta dois tipos de gráficos:

- a) O gráfico com linhas e círculos cheios representa a leitura das proteínas no espectrofotômetro em 280 nm. Observa-se a existência de, pelo menos, dois picos de proteínas (pico I e pico II). Detecta-se, também, uma coincidência do pico de proteínas (pico II) com o pico de atividade (pico "a").
- b) O gráfico com linhas contínuas e círculos não cheios representa a atividade cininásica.

Na eletroforese preparativa, as proteínas sem atividade cininásica foram separadas das proteína, com atividade cininásica.

FIGURA 8 - Quantificação dos produtos de hidrólise da bradicinina pela endo-oligopeptidase-A de membranas do cérebro humano em coluna de Aminex A-5 acoplada ao micro analisador de peptídeos.

A coluna de Aminex A-5, com dimensões de 0,2 x 50 cm., foi equilibrada e desenvolvida a 80 graus C, utilizando-se um fluxo de 0,15 ml/min., com um tampão citrato de sódio 0,65 M pH 4,2; após 87 minutos o tampão eluente foi trocado para citrato de sódio 0,388 M, pH 7,5. O fluxo de ninidrina foi de 0,15 ml/min. A amostra continha aliquotas dos " pools " das frações com atividade endopeptidásica eluídas com 50 a 70 mM de cloreto de sódio resultantes da cromatografia em DEAE-celulose incubados com bradicinina a 37 graus C em tampão TRIS-HCL 0,05 M, pH 7,5, até a hidrólise de 100% do substrato acompanhada pela atividade biológica no íleo isolado de cobaia. Essa fração foi diluída com tampão de citrato de sódio 0,2 N pH 2,2 contendo 15% de polietilenoglicol na proporção de 1:1 (v/v) e aplicado no micro analisador de amino-ácidos.

FIGURA-8

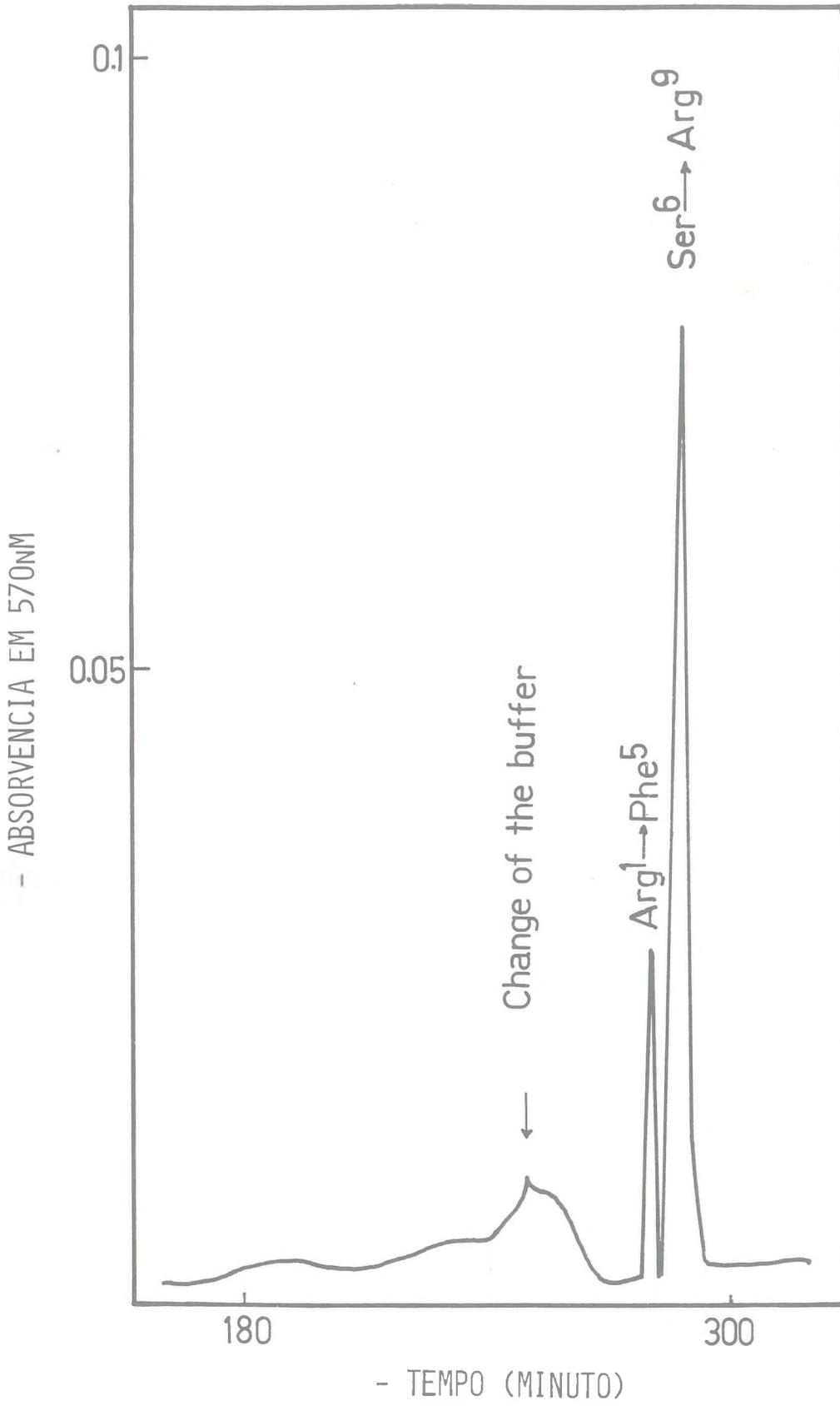
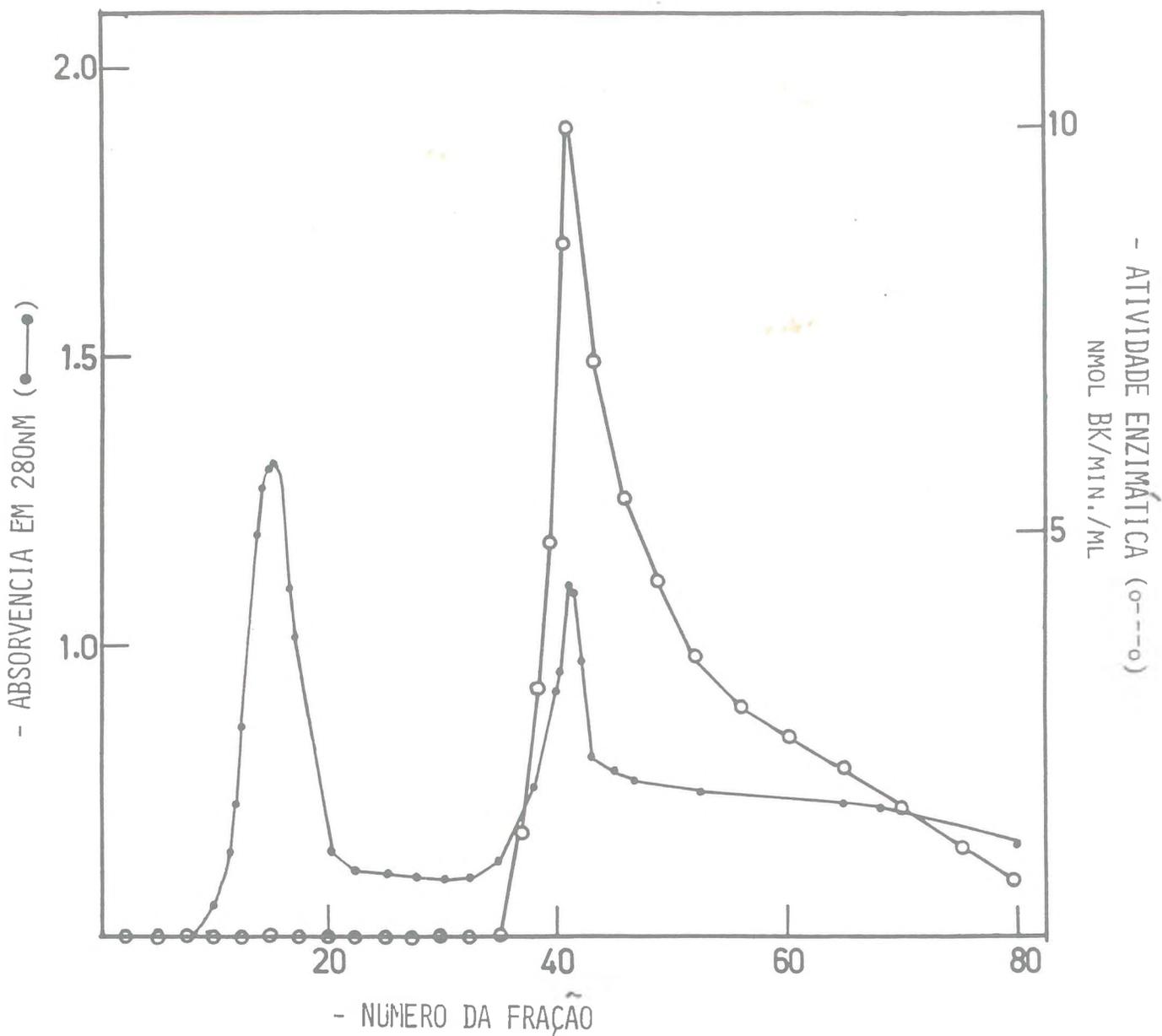


FIGURA 9 - Eletroforese preparativa em gel de poliacrilamida 6%

O tampão TRIS-glicina pH 8,2 foi utilizado como eluente. O fluxo da bomba foi de 3,6 ml./h (fração de 0,9 ml). A corrente utilizada foi de 30 mA. A leitura de proteínas foi lida em 280 nm (●—●) apresentando 2 picos (I e II). Atividade cininásica (o—o). Nos tampões foi adicionado B-mercaptoetanol 10^{-3} M .

FIGURA-9



- ABSORVÊNCIA EM 280 NM - (● — ●)

- ATIVIDADE ENZIMÁTICA - (○ — ○)
(nmol . BK / min . / ml)

A endo-oligopeptidase-A de membranas foi purificada bem próximo da homogeneidade (figura 17). A enzima apresentou uma alta instabilidade, mesmo congelada a -25 graus centígrados, 20% de glicerol, perdendo praticamente toda a atividade em torno de 30 dias. As causas desse fenômeno são desconhecidas e estudos futuros deverão ser realizados para o esclarecimento dessa instabilidade.

3.4 - DETERMINAÇÃO DO PESO MOLECULAR DA ENDO-OLIGOPEPTIDASE - A PURIFICADA.

A figura 10 mostra o perfil da cromatografia em sephadex G-100. O peso molecular da endo-oligopeptidase - A de membranas, determinado em coluna de sephadex G-100, foi em torno de 70.000 Dalton (ver figura 11).

3.5 - FOCALIZAÇÃO ISOELÉTRICA DA ENDO-OLIGOPEPTIDASE - A DE MEMBRANAS.

A figura 12 mostra o perfil da focalização isoelétrica em placa com sephadex G-25. Apenas um pico de atividade enzimática foi detectado nas frações com pH de 5,36.

3.6 - EFEITOS DE CATIONS DIVALENTES E SUBSTÂNCIAS INIBIDORAS E ATIVADORAS SOBRE A ENDO-OLIGOPEPTIDASE - A DE MEMBRANAS.

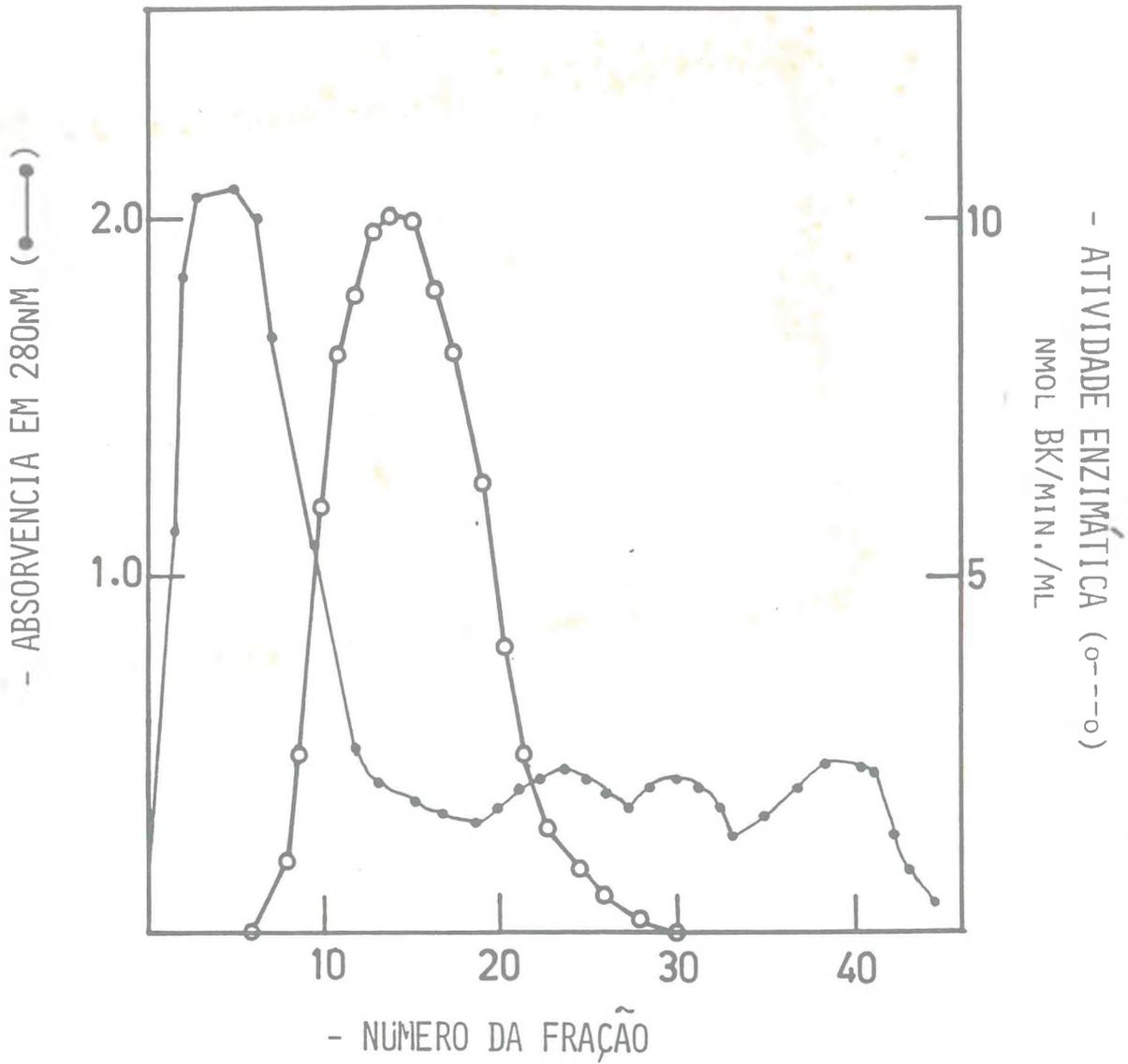
A figura 13 mostra os efeitos dos cátions divalentes e substâncias inibidoras e ativadoras sobre a endo-oligopeptidase - A de membranas. Observamos que os íons Cu^{++} , Zn^{++} , Ni^{++} e Co^{++} inibiram a atividade enzimática na

FIGURA 10 - Cromatografia em Sephadex G-100.

O Sephadex G-100 foi empacotado em uma coluna cilíndrica de vidro com altura de 1,6m e diâmetro de 1,9cm.

A coluna foi equilibrada com TRIS-HCL 0,05M pH 7,5 contendo B-mercaptoetanol. O fluxo da coluna, por gravidade, foi de 12 ml./h. O eluente usada foi TRIS-HCL 0,05M pH 7,5 contendo B-mercaptoetanol 10⁻³M. Leitura de proteínas foi lida em 280 nM (●—●). A atividade cininásica e representada pelo gráfico (o—o).

FIGURA-10



- ABSORVÊNCIA EM 280 NM - (● — ●)
- ATIVIDADE ENZIMÁTICA - (○ — ○)
(nmol.BK/min./ml)

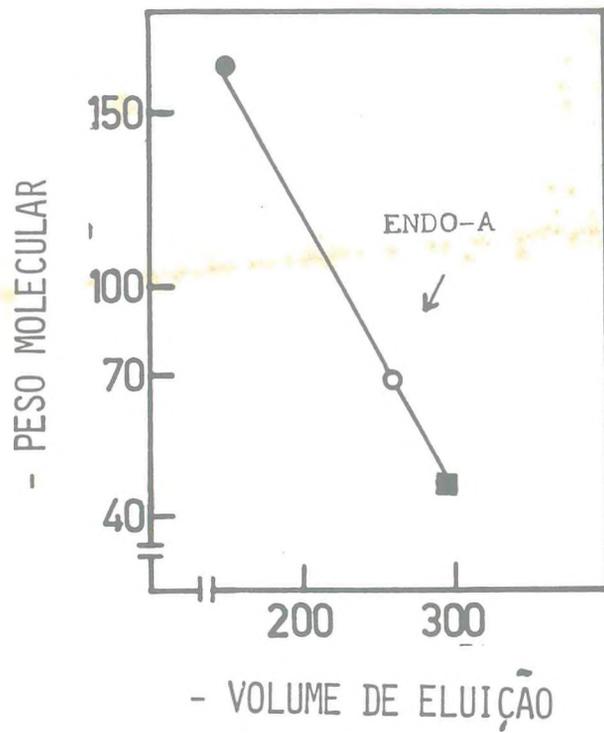


FIGURA 11 - Determinação do peso molecular da enzima em coluna

de Sephadex G-100.

As proteínas padrões utilizadas foram a ovalbumina (45.000), albumina (68.000) e gama-globulina (150.000). A quantidade de cada proteína aplicada foi de 15 mg./3 ml.

FIGURA 11



- - GAMA-GLOBULINA
- - ALBUMINA
- - OVALBUMINA

FIGURA 12 - Determinação do ponto isoelétrico da enzima purificada por focalização isoelétrica em Sephadex G-25.

O meio de reação utilizado para a determinação da atividade endopeptidásica das frações, apresentou um volume final de 1 ml ; uma alíquota de cada fração e $5 \times 10^{-6}M$ de bradicinina em TRIS-HCL 0,05M pH 7,5.

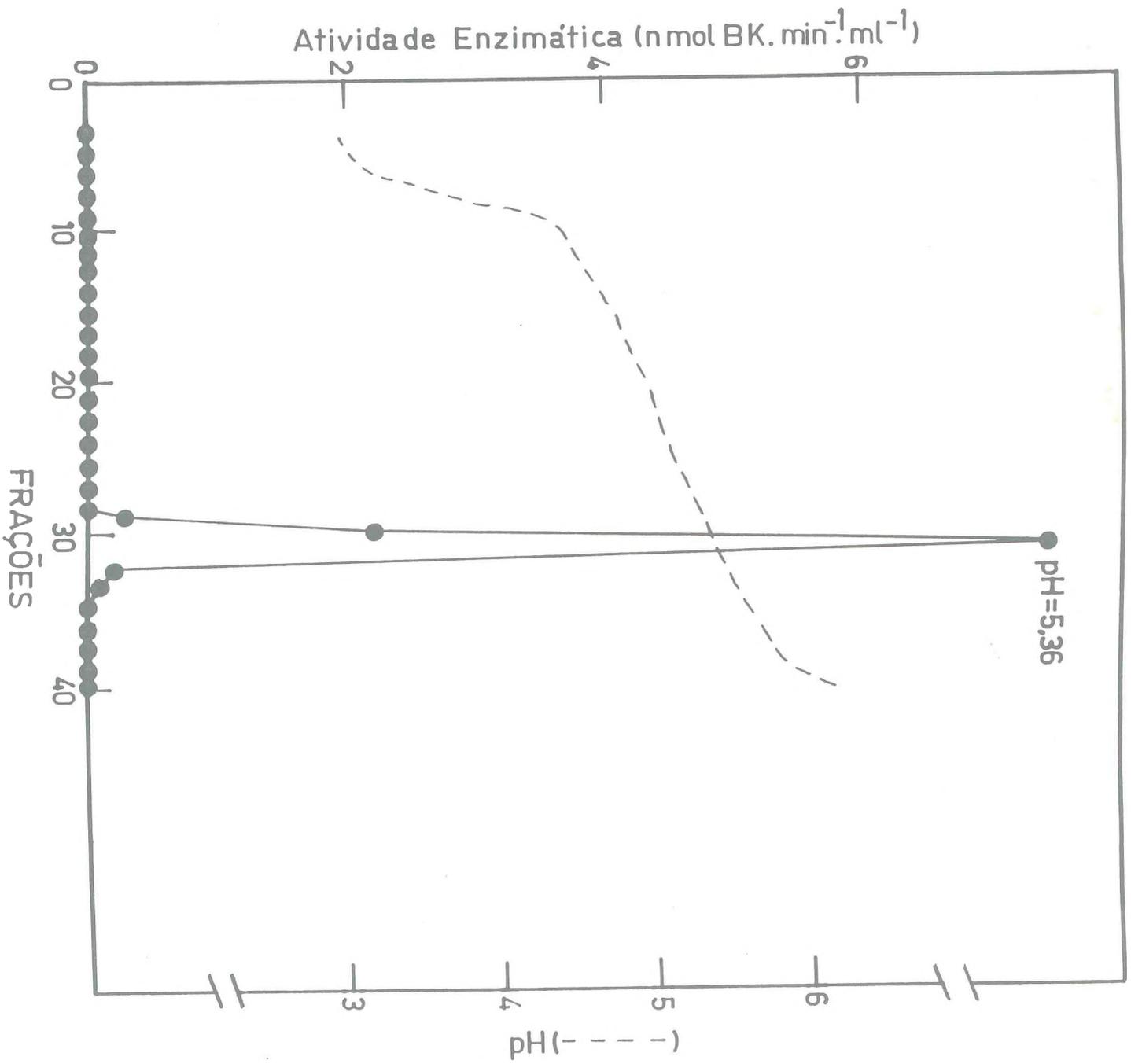


FIGURA-12

FIGURA 13 - Efeitos dos cátions divalentes, inibidores enzimáticos e substância ativadora sobre a endo-oligopeptidase-A de membranas do cérebro humano.

O meio de reação utilizada :

- a) cátions divalentes - 5 ul de enzima, $2,5 \times 10^{-6}$ M de Bk e 10^{-3} M e 10^{-4} M de cátions divalentes ;
- b) inibidores enzimáticos - 5 ul de enzima, $2,5 \times 10^{-6}$ M de Bk e 10^{-3} M e 10^{-4} M de inibidor enzimático;
- c) substância ativadora - 5 ul enzima, $2,5 \times 10^{-6}$ M de Bk e 10^{-3} M de substância ativadora (B-mercaptoetanol).

FIGURA-13

COMPOSTO	CONCENTRAÇÃO (M.MOL)	EFEITO % ENDO-A DE MEMBRANAS
Nenhum	-	100
Cu ⁺⁺	0,1	7
Zn ⁺⁺	0,1	14
Ni ⁺⁺	0,1	64
Co ⁺⁺	0,1	95
Ca ⁺⁺	1,0	64
Fe ⁺⁺	1,0	65
EDTA	0,1	100
Ortofenantrolina	0,1	100
PMAC	1,0	79
PMSF	1,0	75
Proctolin	0,01	100
Bestatin	0,01	81
Puromicina	1,0	94
Bacitracina	1,0	58
B-mercaptoetanol	0,1	161

concentração 10⁻⁴M com as seguintes percentagens de inibição: 93%,86%,36% e 5%,repectivamente. Os íons Ca⁺⁺ e o Fe⁺⁺ causaram na concentração 10⁻³M uma inibição com as seguintes percentagens:36% e 38%,respectivamente. As substâncias PMAC e PMSF apresentaram,na concentração de 10⁻³M, inibições com as seguintes percentagens: 21% e 15%,respectivamente. O bestatin e o proctolin,na concentração de 10⁻⁵M, não causaram nenhuma inibição significativa de endo-oligopeptidase - A de membranas. A ortofenantrolina a 10⁻¹M não causou inibição da endo-oligopeptidase - A de membranas. No entanto,o EDTA causou uma inibição de 31% ,mas não devido a quelação,e sim por uma inibição inespecífica,pois, quando a mistura de EDTA e enzima foi diluída, houve uma ativação enzimática.

3.7 - LIBERAÇÃO DE ENCEFALINAS PRESENTES EM PEPTÍDEOS OPIÓIDES,QUANDO INCUBADOS COM A ENDO-OLIGOPEPTIDASE - A DE MEMBRANAS DO CÉREBRO HUMANO.

A figura 14 mostra o sítio de clivagem dos peptídeos opióides,quando são incubados com a endo-oligopeptidase-A de membranas purificadas do cérebro humano.Observamos que:

- a) peptídeos opióides com o número de amino-ácidos <= 7,não ocorre liberação de encefalinas;
- b) peptídeos opióides com o número de amino-ácidos => 17, não ocorre liberação de encefalinas;
- c) peptídeos opióides com o número de amino-ácidos entre 8 e 16,ocorre liberação de encefalinas.

As figuras 15 e 16 representam a cinética

FIGURA 14 - Estruturas e sítios de clivagem dos peptídeos opióides utilizados como substrato pela endo-oligopeptidase-A de membranas do cérebro humano.

O meio de reação continha : 20 ul da enzima pura, 20 nmoles de cada peptídeo em um volume de 200 ul. Após 20 minutos de incubação a 37 graus C, a reação foi detida com adição de 5 ul de ácido fosfórico concentrado em uma alíquota de 50 ul e aplicada no cromatógrafo líquido de alta performance.

As setas indicam o local de hidrólise nos substratos.

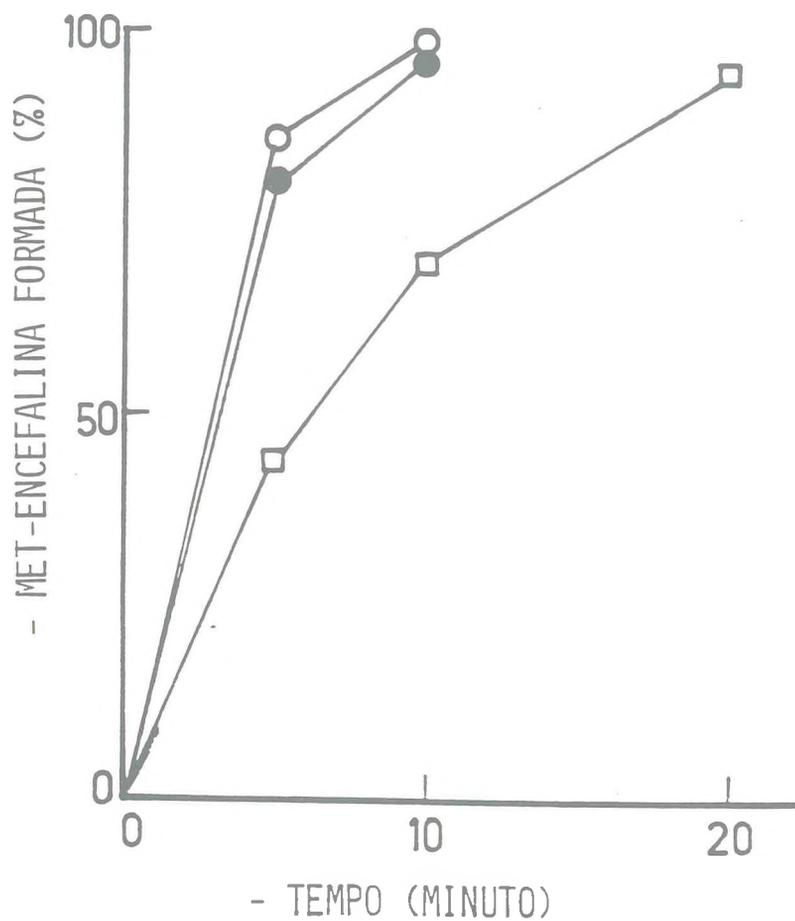
FIGURA—14

PEPTÍDEOS	ESTRUTURA E SÍTIO DE CLIVAGEM
MET-encefalina	TIR-GLI-GLI-FEN-MET
LEU-ENCEFALINA	TIR-GLI-GLI-FEN-LEU
LEU-ENC.-ARG	TIR-GLI-GLI-FEN-LEU-ARG
HEPTAPEPTIDEO	TIR-GLI-GLI-FEN-MET-ARG-FEN
OCTOPEPTIDEO	TIR-GLI-GLI-FEN-MET--ARG-GLI-LEU
MET-enc.-GLI-LEU-LIS	TIR-GLI-GLI-FEN-MET--ARG-GLI-LIS
DINORFINA 1-8	TIR-GLI-GLI-FEN-LEU--ARG-ARG-ILE
B-neo-endorfina	TIR-GLI-GLI-FEN-LEU--ARG-LIS-TIR-PRO
ALFA-neo-endorfina	TIR-GLI-GLI-FEN-LEU--ARG-LIS-TIR-PRO-LIS
BAM-12	TIR-GLI-GLI-FEN-MET--ARG-ARG-VAL-GLI-ARG-PRO-GLU
Dinorfina-B	TIR-GLI-GLI-FEN-LEU--ARG-ARG-GLN-FEN-LIS-VAL-VAL-THR
Dinorfina 1-17	TIR-GLI-GLI-FEN-LEU-ARG-ARG-ILEU-ARG-PRO-LIS-LEU-LIS-TR-ASP-ASP-GLN
BAM-22	TIR-GLI-GLI-FEN-MET-ARG-ARG-VAL-GLI-ARG-PRO-GLU-TRP-TRP-MET-ASP-TIR-GLN-LIS-ARG-TIR-GLI

FIGURA 15 - Cinética de liberação da MET-encefalina por hidrólise enzimática MET-encefalina-ARG-GLI-LEU-LIS (O) octopeptídeo (●) e BAM-12 (□) pela endo-oligopeptidase-A de membranas purificadas do cérebro humano.

O meio de reação continha : 20 ul da enzima purificada; 20 nmoles do substrato em um volume de 200 ul. A reação ocorreu a 37 graus e foram retirados do meio de incubação alíquotas de 50 ul aos tempos respectivos de 5, 10 e 20 minutos, misturadas, cada amostra, com 5 ul. de ácido fosfórico concentrado e aplicadas no cromatógrafo líquida de alta performance.

FIGURA-15



□ - BAM - 12

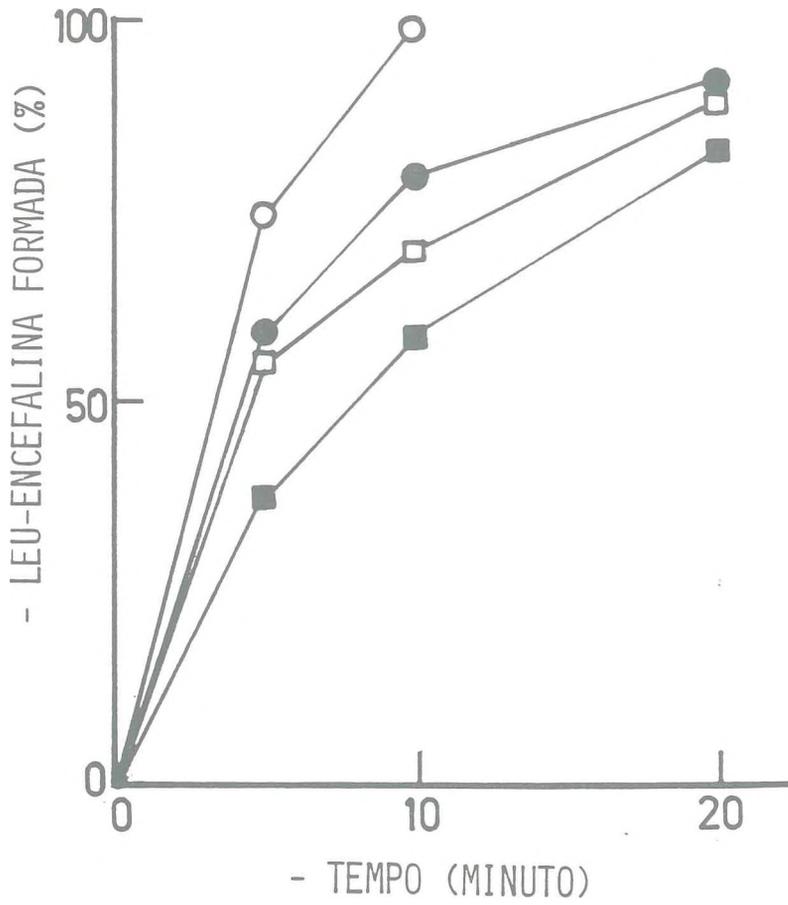
● - OCTOPEPTÍDEO

○ - MET-ENCEFALINA-ARG-GLI-LEU-LIS

FIGURA 16 - Cinética de liberação da LEU-encefalina por hidrólise enzimática de dinorfina 1-8 (O), B-neo-dinorfina (●), alfa-neo-dinorfina (□) e dinorfina-B (■) pela endo-oligopeptidase-A de membranas purificadas do cérebro humano.

O meio de reação continha : 20 ul da enzima purificada; 20 nmoles do substrato em um volume de 200 ul. A reação ocorreu a 37 graus e foram retirados do meio de incubação alíquotas de 50 ul aos tempos respectivos de 5, 10 e 20 minutos, misturadas, cada amostra, com 5 ul. de ácido fosfórico concentrado e aplicadas no cromatógrafo líquida de alta performance.

FIGURA-16



- O - DINORFINA 1-8
- - B-NEO-ENDORFINA
- - ALFA-NEO-ENDORFINA
- - DINORFINA-B

Figura 17 - Eletroforese em placa de gel de poliacrilamida sem

S.D.S., da endo-oligopeptidase-A de membranas

purificadas do cérebro humano.

A amostra utilizada apresentou um volume de 150 ul,
contendo 165 ug. de proteínas.

FIGURA - 17

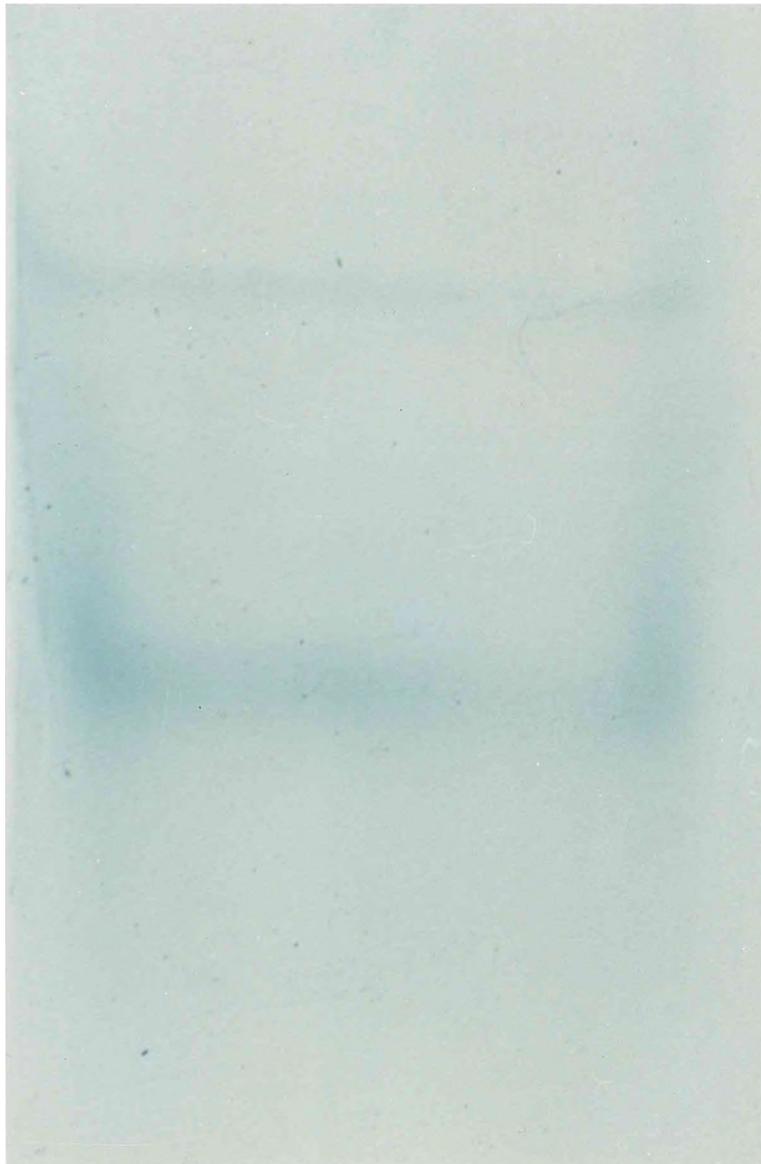


FIGURA 18 - Propriedades da endo-oligopeptidase-A de membranas

e endo-oligopeptidase-A solúvel do cérebro humano.

FIGURA - 18

PROPRIEDADES -----	ENDO-A MEMBRANAS -----	ENDO-A SOLÚVEL -----
Peso molecular	70.000	70.000
Ponto isoeletrico	5,3	4,9
pH otimo	7,0 - 7,5	7,0
Eluicao do DEAE- celulose	50-70 MM de NaCl	50-70 MM de NaCl

FIGURA 19 - Efeitos dos cátions divalentes (conc. de $10^{-3}M$ e $10^{-4}M$)

e dos inibidores enzimáticos (conc. de $10^{-3}M$ e $10^{-4}M$)

sobre as endo-oligopeptidase-A de membranas e da fra-

ção solúvel do cérebro humano.

FIGURA -19

COMPOSTO	CONCENTRAÇÃO (M.MOL)	EFEITO %	
		endo-A de membranas	endo-A solúvel
Nenhum	-	100	100
Cu ++	0,1	7	8
Zn ++	0,1	14	6
Ni ++	0,1	64	75
Co ++	0,1	95	92
Ca ++	1,0	64	76
Fe ++	1,0	65	72
EDTA	0,1	100	100
PMAC	1,0	79	17
PMSF	1,0	75	75
Proctolin	0,01	100	100
Bestatin	0,01	81	87
Puromicina	1,0	94	100
Bacitracina	1,0	58	48

* ENDO-A = ENDO-OLIGOPEPTIDASE-A

de liberação de MET-encefalina e LEU-encefalina dos seguintes peptídeos: MET-encefalina-ARG-GLI-LEU-LIS, octopeptídeo, BAM 12, dinorfina 1-8, B-neo-endorfina, Alfa neo-endorfina e dinorfina B.

DISCUSSÃO .

4 - D I S C U S S Ã O.

4.1 - METODOLOGIA DE SOLUBILIZAÇÃO E PURIFICAÇÃO.

4.1.1 - Solubilização da endo-oligopeptidase - A de membranas do cérebro humano.

Realizamos experimentos preliminares de solubilização, para definir qual dos métodos a ser utilizado na extração enzimática. Das seis soluções usadas para extração enzimática, apenas a solução TRIS-HCL 0,005M pH 7,5 mais TRITON X-100 A 1% apresentou uma eficiência de 90% na solubilização da atividade enzimática da endo-oligopeptidase - A, ligada a membranas, uma vez que a extração controle sem triton X-100 não solubilizou praticamente nenhuma atividade enzimática. As demais condições utilizadas não foram tão eficientes quanto o trinton X-100 a 1%.

A solução TRIS-HCL 0,05M pH 9,0 solubilizou a endo-oligopeptidase-A de membranas, de forma parcial. Este resultado também foi encontrado por CARVALHO, em 1978.

4.1.2 - Purificação da endo-oligopeptidase-A de membranas do cérebro humano.

A metodologia de purificação utilizada foi basicamente a empregada por CAMARÃO, 1987, na purificação da endo-oligopeptidase-A da fração solúvel do cérebro humano.

A endo-oligopeptidase-A foi isolada da fração do precipitado do homogenato do cérebro humano, de forma quase homogênea, apresentando um leve contaminante (figura 17).

A homogeneidade da enzima foi demonstrada pela eletroforese em placa sem S.D.S.

A endo-oligopeptidase-A de membranas apresentou uma alta instabilidade, mesmo congelada a -25 graus centígrados, com 20% de glicerol. As causas desse fenômeno são desconhecidas.

4.2 - CARACTERIZAÇÃO DA ENDO-OLIGOPEPTIDASE - A DE MEMBRANAS DO CÉREBRO HUMANO E COMPARAÇÃO COM A ENDO-OLIGOPEPTIDASE-A SOLÚVEL.

Após a purificação e demonstração da forma quase homogênea da endo-oligopeptidase -A, de membranas, realizamos experimentos para elucidar algumas propriedades da endo-oligopeptidase -A, de membranas, as quais foram semelhantes as propriedades da endo-oligopeptidase -A da fração solúvel do cérebro humano (CAMARÃO, 1987), do cérebro de boi e do de coelho (CARVALHO, 1981; CAMARGO, 1987) e do coração de coelho (CICILINI e cols., 1988) - Figuras 18 e 19. As propriedades foram as seguintes: peso molecular de 70.000 Dalton; pH ótimo próximo da neutralidade; eluição na cromatografia de DEAE-celulose com TRIS-HCl 0,05M pH 7,5, com 50mM e 70mM de cloreto de sódio; ativação pelo DTT, B-mercaptoetanol; inibição pelo Cu^{++} , Zn^{++} , Ni^{++} , Co^{++} e PMSF; degradação da bradicinina a fragmentos ARG1-FEN5 e SER6-ARG9, em quantidades estequiométricas. Não houve inibição pelo EDTA; liberação de LEU-encefalina de peptídeos opióides tais como a DIN-A 1-8, DIN-B, ALFA-NEO-ENDORFINA e B-NEO-ENDORFINA; liberação de MET-encefalina de peptídeos opióides, tais como octopeptídeos TIR-GLI-GLI-FEN-MET-ARG-GLI-LEU, BAM-12 e MET-encefalina-ARG-GLI-LEU-LIS.

No entanto, a endo-oligopeptidase-A, de membranas, e a endo-oligopeptidase-A solúvel apresentaram pequenas diferenças em relação ao ponto isoelétrico e a inibição pelo ferro e PMAC. (figuras 18 e 19). O ponto isoelétrico da endo-oligopeptidase-A de membranas foi ligeiramente maior do que da endo-oligopeptidase-A solúvel. A inibição da endo-oligopeptidase-A de membranas induzida pelo Fe^{++} , foi ligeiramente maior do que a endo-oligopeptidase-A solúvel. O PMAC inibiu a endo-oligopeptidase-A de membranas menos do que a endo-oligopeptidase-A solúvel.

De acordo com as propriedades das endopeptidases, acima relatadas vimos que existem várias semelhanças e leves diferenças em relação a suas propriedades, o que nos leva a crer que essas endopeptidases podem ser isoenzimas.

SUPATTONI e cols. (1988) caracterizaram, em grânulos, médula supra-renal bovina, uma endopeptidase neutra com peso molecular e com pH ótimo semelhante ao da endo-oligopeptidase-A solúvel, do cérebro de rato (Carvalho e Camargo - 1981).

4.3 - ENDO-OLIGOPEPTIDASE-A DE MEMBRANAS E DIFERENTE DA METALOPEPTIDASE (EC.3.4.24.15)?

ORLOWSKI e cols. (1981, 1983 e 1989) isolaram uma metaloendopeptidase (EC.3.4.24.15) da fração solúvel do cérebro e testículo de rato com as seguintes propriedades: peso molecular de 67000 Daltons; pH ótimo próximo da neutralidade; forte inibição pelo EDTA e ortofenantrolina; reativação pelo Zn^{+2} , Co^{+2} e Mn^{+2} ; inibição específica pelo inibidor sintético BZ-GLI-ALA-ALA-FEN-PAB;

degradação da bradicinina, neurotensina, luliberium e substância P.; liberação de encefalinas de peptídeos opióides tais como a dinorfina-A 1-8, B-neo-endorfina, metorfamide e MET-encefalina-ARG-GLI-LEU.

TOFFOLETTO e CAMARGO (1988 e 1989) demonstraram que a endo-oligopeptidase-A solúvel e a metalopeptidase (EC.3.4.24.15) solúvel são enzimas distintas pelos seguintes fatos: 1) somente a endo-oligopeptidase-A liberar encefalina da metorfamide e dinorfina-A1-8; 2) somente a endo-oligopeptidase-A ser precipitada pelo anti-soro endo-oligopeptidase-A; 3) O substrato sintético BZ-GLI-ALA-ALA-FEN-PAB não ser hidrolizado pela endo-oligopeptidase-A.

Como vimos, a endo-oligopeptidase-A de membranas é quase idêntica a endo-oligopeptidase-A da fração solúvel, ou seja, provavelmente são isoenzimas. Com a contestação de TOFFOLETTO e CAMARGO (1988) de que a endo-oligopeptidase-A solúvel e a metalopeptidase (EC.3.4.24.15) são enzimas distintas, podemos concluir, por extrapolação, que a endo-oligopeptidase-A de membranas e a metalopeptidase (EC.3.4.24.15) são peptidases diferentes.

4.4 - ENVOLVIMENTO DA ENDO-OLIGOPEPTIDASE-A DE MEMBRANAS NA LIBERAÇÃO DE ENCEFALINA A PARTIR DE PEPTÍDEOS INTERMEDIÁRIOS CONTENDO ENCEFALINA.

Desde a descoberta da pró-opiomelanocortina (NAKANISHI e col. 1989), evidências mostraram que peptídeos biologicamente ativos são originados de grandes proteínas

precursoras, nas quais pares de amino-ácidos básicos são reconhecidos como sinais para a clivagem proteolítica. Esse fato levou a hipótese de um modelo proteolítico para a liberação de peptídeo biologicamente ativo a partir de um precursor maior. Nesse modelo duas etapas de reação estariam envolvidas: a primeira etapa envolvendo uma endopeptidase tipo tripisina e os seguintes passos envolvendo uma carboxipeptidase e uma aminopeptidase (STEINER e cols.1980).

No entanto, em estudos recentes (CAMARGO e cols.1987; CAMARÃO e cols.1987 e TOFFOLETTO e cols.1988.) foram demonstrados que peptídeos opióides derivados da pró-dinorfina e pró-encefalina foram clivados pela endo-oligopeptidase-A, dando origem a LEU-encefalina e MET-encefalina, respectivamente em apenas uma etapa de reação. Esse fato nos surge que essa enzima pode estar envolvida na liberação de encefalina a partir de peptídeos intermediários contendo encefalina.

A endo-oligopeptidase-A de membrana liberou encefalina de peptídeos opióides intermediários derivados da pró-dinorfina (DIN1-B; DIN-B; alfa-NED e B-NED) e da pró-encefalina (octopeptídeo, nonapeptídeo e BAM-12). Esses resultados mostram que a endo-oligopeptidase-A de membranas pode estar envolvida com a liberação de encefalinas a partir de peptídeos opióides intermediários (8 a 16 resíduos).

O fato da endo-oligopeptidase-A de membranas liberar encefalinas a partir de peptídeos opióides intermediários, nos incentivou a elaborar modelos hipotéticos de como essa liberação poderia ocorrer. Os modelos hipotéticos são: 1) A endo-

oligopeptidase-A de membranas poderia estar situada na membrana sináptica, voltada para sinapse, sendo assim capaz de liberar encefalinas a partir de peptídeos opióides intermediários existentes na sinapse; 2) A endo-oligopeptidase-A de membranas poderia estar na membrana do Complexo de Golgi voltada para o lado de dentro, onde clivaria peptídeos opióides intermediários no interior do Complexo de Golgi a encefalina e esta seria liberada para o citoplasma celular; 3) A endo-oligopeptidase-A de membranas poderia estar na membrana do Complexo de Golgi voltada para o lado de fora, onde clivararia peptídeos opióides intermediários, presentes no citoplasma, a encefalinas; 4) A endo-oligopeptidase-A de membranas poderia estar nas membranas das vesículas voltada para o lado do citoplasma celular e clivaria peptídeos opióides intermediários a encefalina.

As hipóteses, acima propostas, podem ser averiguadas com a produção de anti-corpos para endo-oligopeptidase-A de membranas sendo assim possível o mapeamento dessa enzima.

4.5 - A ENDO-OLIGOPEPTIDASE-A DE MEMBRANAS PODE ESTAR ENVOLVIDA COM A FISIOLOGIA DA DOR ?

A localização de receptores opióides (KUHAR e cols.,1973) e neurônios contendo encefalinas no tálamo, substância cinzenta periaqueductal e substância gelatinosa da medula espinhal sugere um envolvimento dos peptídeos opióides endógenos com a modulação da dor nesses três níveis (HOKFELT e cols.,1977;SIMANTOV e cols,1977).

A estimulação elétrica da substância cinzenta

periaqueductal no mesencéfalo produz analgesia em animais, mimetizando a ação da morfina, quando injetada nesse local.

Essa analgesia é parcialmente revertida pelo naloxone e é efetiva a presença de peptídeos opióides endógenos e receptores opióides (AKIL e cols., 1976).

GOODMAN e cols., 1980, detectaram receptores opióides na medula espinhal.

BOTTICELLI e cols., 1981, demonstraram a presença de dinorfina na medula espinhal de mamíferos a níveis compatíveis com o hipotálamo anterior.

Agonistas opióides tais como a B-endorfina (OYAMA e cols., 1980) e D-ALA2-D-LEU5-encefalina (ONOFRIO e YAKSH, 1983) foram usadas por via intratectal, para aliviarem dores crônicas intratáveis.

A endo-oligopeptidase-A solúvel (primeiramente isolada por CARVALHO e cols., 1981) e a endo-oligopeptidase-A de membranas, por nos isolada, tiveram a propriedade de liberar MET e LEU-encefalinas de peptídeos opióides intermediários. Esse resultado sugere um possível envolvimento da endo-oligopeptidase-A com a fisiologia da dor.

Quando um tecido é injuriado há uma liberação de mediadores que estimulam receptores específicos nos neurônios sensoriais nociceptivos. A bradicinina - um nonapeptídeo (ARG-PRO-PRO-GLI-PHE-SER-PRO-PHE-ARG) - é considerada um mediador químico nos processos inflamatórios, devido a:

- 1) Haver um aumento da concentração de bradicinina, quando um tecido é injuriado (GARCIA LEME, 1978).

- 2) A bradicinina possui um potente efeito algíco (ARMSTRONG,1970; CLARCK,1979).

STERANKA e cols.,1988, utilizando bradicinina triciada demonstraram a presença de receptores específicos da bradicinina na substância gelatinosa,raiz dorsal, em pequenas células do gânglio trigeminal e nas fibras aferentes da coronária e do miocárdio. A localização de receptores específicos de bradicinina,em áreas ricas de neurônios sensoriais nociceptivos, suporta a idéia de que a bradicinina seja um mediador fisiológico da dor.

A bradicinina é um excelente substrato para a endo-oligopeptidase-A solúvel (CARVALHO,1981 e CAMARÃO,1987) e a de membranas (CARVALHO,1978).Essas duas enzimas clivam a bradicinina na ligação FEN5-SER6 resultando na inativação da bradicinina. Tal constatação sugere a possibilidade de a endo-oligopeptidase-A estar envolvida no processo de degradação fisiológica da bradicinina.

Concluindo,pode-se lançar a hipótese geral de que a endo-oligopeptidase-A pode estar correlacionada com a fisiologia da dor em dois aspectos que resultaram em uma ação sinérgica de liberação de encefalinas,a partir de peptídeos opióides intermediários,causando analgesia e inativando a bradicinina - substância algésica.

Os estudos futuros com anticorpos e inibidores enzimáticos poderão esclarecer em definitivo o papel fisiológico da endo-oligopeptidase-A.

CONCLUSIONS .

5.0 - C O N C L U S Õ E S.

5.1 - A endo-oligopeptidase-A de membranas do cérebro humano foi purificada, apresentando um leve contaminante, utilizando-se os seguintes passos de purificação:

- a) Homogeneização em água na proporção de 1:4 (p/v), centrifugação a 25.000 G, durante 1 h, cromatografia de troca iônica, em coluna de DEAE-celulose, eletroforese preparativa em coluna de gel de poliacrilamida.
- b) Na eletroforese em placa de gel de poliacrilamida, sem S.D.S., apresentou um leve contaminante.
- c) A endo-oligopeptidase-A de membranas e endopeptidase-A da fração solúvel parecem ser isoenzimas.
- d) A endo-oligopeptidase - A de membranas e a metalopeptidase E.C.3.4.24.15 são enzimas diferentes.
- e) A endo-oligopeptidase-A de membranas purificada liberou MET e LEU-encefalinas de peptídeos opióides (em concentrações fisiológicas), tais como MET-encefalina-ARG-GLI-LEU-LIS, octopeptídeo, BAM 12, DIN 1-8, B-NEO-END., ALFA-NEO-END. e B-DIN. No entanto, peptídeos opióides com número de amino-ácidos ≤ 7 ou ≥ 17 não liberaram encefalinas.
- f) A endo-oligopeptidase-A de membranas do cérebro humano pode estar correlacionada com a fisiologia da dor, por causa de suas ações sinérgicas de hidrolisar a bradiceína e liberar encefalinas.

h) A endo-oligopeptidase-A de membranas do cérebro humano pode estar envolvida com a liberação fisiológica de encefalina.

BIBLIOGRAFIA

- 01 - AKIL, H.; MAYER, D.J.; LIEBESKIND, J.C. Antagonism of stimulation produced analgesia by naloxone, a narcotic antagonist. *Science*, 191; 961-2, 1976.
- 02 - ARMSTRONG, D. apud STERANKA, L.R.; MANNING, D.C.; DEHAAS, C.J.; FERKANY, J.W.; BRODSKY, S.A.; CONNOR, J.R.; VAURER, R.J.; STEWART, J.M.; SNYDER, S.H. in Bradykinin, a pain mediator: receptors are localized to sensory neurons, and antagonists have analgesic actions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85: 3245-9, 1988.
- 03 - ARREGUI, A.; BENNETT, J.P.; BIRD, E.D.; YAMAMURA, H.Y.; IVERSEN, L.L.; SNYDER, S.H. apud SWARTZ, J.C.; MALFROY, B.; DE LA BAUME, S. Biological Inactivation of enkephalins and the role of enkephalin-dipeptidyl-carboxypeptidase (enkephalinase) as neuropeptidase. *Life Sci.*, 29: 1715 - 40, 1981.
- 04 - BOTTICELLI, L.J.; COX, B.M.; GOLDSTEIN, A. Immunoreactive dynorphin in mammalian spinal cord and dorsal root ganglia. *Proc. Acad. Natl. Sci. USA*, 78; 7783 - 6, 1981.
- 05 - BRUNI, J.F.; WATKINS, W.B.; YEN, S.S.C. B-endorphin in the human pancreas. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 49; 649-51, 1979.
- 06 - CAMARAO, G.C. Liberação de encefalinas a partir de precursores pela endo-oligopeptidase A purificada de encéfalo humano. Fortaleza, 1987. Tese (Mestrado)-Universidade Federal do Ceará, Departamento de Fisiologia e Farmacologia.
- 07 - CAMARGO, A.C.M. & GRAEFF, F.G. Subcellular distribution and properties of the bradykinin inactivation system in rabbit

- brain homogenates. Biochem. Pharmacol. 18: 548, 1969.
- 08 - CAMARGO, A.C.M.; CARVALHO, M.J.V.; SCHWARTZ, W. Conversion and inactivation of opioid peptides by rabbit brain endo-oligopeptidase A. Biochem. Biophys. Res. Commun. 130:932-8, 1985.
- 09 - CAMARGO, A.C.M.; OLIVEIRA, B.F.; TOFOLETTI, D.; METTER, M.K.; ROSSIER, J. Brain endo-oligopeptidase A, a putative enkephalin converting enzyme. J. Neurochem., 48:1258-63, 1987.
- 10 - CARVALHO, K.M. Isolamento e caracterização parcial da endopeptidase A da fração particulada de cérebro de coelho. Ribeirão Preto, 1978. Tese (Mestrado) Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto.
- 11 - CARVALHO, K.M. & CAMARGO, A.C.M. Purification of rabbit brain endo-oligopeptidases and preparation of anti-enzyme antibodies. Biochemistry, 20: 7082, 1981.
- 12 - CICILINI, M.A.; RIBEIRO, M.J.F.; OLIVEIRA, E.B.; MORTARA, R.A.; CAMARGO, A.C.M. - Endopeptidase A activity in rabbit heart: generation of enkephalin from enkephalin containing peptides. Peptides, 9: 945 - 955, 1988.
- 13 - CLARK, W.G. apud STERANKA, L.R.; MANNING, D.C.; DEHAAS, C.J.; FERKANY, J. W.; BROSKY, S. A.; CONNOR, J.R.; VAURER, R.J.; STEWART, J.M.; SNYDER, S.H. Bradykinin as a pain mediator: receptors are localized to sensory neurons, and antagonists have analgesic actions. Proc. Nati. Acad. Sci. USA, 85:3245-49, 1988.

- 14 - COMB, M.; SEEBURG, P. H.; ADELMAN, J.; EIDEN, L.; HERBERT, E. Primary structure of the human (met) and (leu) enkephalin precursor and its mRNA. *Nature*, 295: 663-6, 1982.

- 15 - COX, B. M.; OPHEIM, K. E.; TESCHEMACHER, H.; GOLDSTEIN, A. - A peptide-like substance from pituitary that acts like morphine: purification and proteins. *Life Sci.*, 16: 1777-82, 1975.

- 16 - CRAVES, F. B.; LAW, P. Y.; HUNT, C. A.; LOH, H. H. - The metabolic disposition of radiolabeled enkephalins in vitro and situ. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 206: 492-506, 1978.

- 17 - DAVIS, B. J. Disk electrophoresis II. Method and application to human serum proteins. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 121(2): 404-27, 1964.

- 18 - DUARTE, G. I. P. Encefalinase de encéfalo humano: purificação e caracterização. Fortaleza, 1984. Tese (Mestrado) Universidade Federal do Ceará. Departamento de Fisiologia e Farmacologia.

- 19 - ERDOS, E. G.; JOHNSON, A. R.; BORDEN, N. T. Hydrolysis of enkephalin by cultured human endothelial cells and by purified peptidyl dipeptidase. *Biochem Pharmacol.*, 27: 843-8, 1978.
- 20 - FISHER, L. *Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology*. Edts. Work, T. W. and Work, E. Amsterdam, 1971. V. 1, cap. 5, p. 221.
- 21 - GARCIA LEME, J. apud STERANKA, L. R.; MANNING, D. C.; DEHAAS, C. J.; FERRANY, J. W.; BOROSKY, S. A.; CONNOR, J. R.; VAURER, R. J.; STEWART, J. M.; SNYDER, S. H. Bradykinin as a pain mediator: receptors are localized to sensory neurons, and

- antagonists have analgesic actions. Proc. Nati. Acad. Sci. USA,
85: 3245 - 9, 1988.
- 22 - GENT, J.P.; WOLSTENCROFT, J.H. apud HORM, A.S.; ROGERS, J.R. -
Review: the enkephalins and opiates-structure-activity
relations. J. Pharmacol., 29: 257 - 65, 1977.
- 23 - GOLDSTEIN, A.; FISCHLI, W.; LOWNY, L.I.; HUNKAPILLER, M.; HOOD, I.
Porcine pituitary dynorphin: complete amino acid sequence
of the biologically active heptadecapeptide. Proc. Nati.
Acad. Sci. USA, 78: 7219-23, 1981.
- 24 - GOODMAN, R.R.; SNYDER, S.H.; KUCHAR, M.J.; YOUNG, W.S.; -
Differentiation of DELTA and "u" opiate receptor localiza-
tions by light microscope autoradiography. Proc. Nati. Acad.
Sci. USA, 77: 6239-43, 1980.
- 25 - GORESTEIN, C. & SNYDER, S.H. Two distinct enkephali-
nases: solubilization partial purification and separation
from angiotensin-convertin enzyme. Life Sci., 25: 2065,
1979.
- 26 - HAYASHI, M. Monkey brain arylamidase (II): further
characterization and studies on mode of hidrolysis of
physiologically active peptides. J. Biochem., 84: 1363, 1978.
- 27 - HERSH, L.B. & MCKELVY, J.P. An aminopeptidase from bovine
brain which catalyses the hidrolysis of enkephalin.-
J. Neurochem. 36: 171, 1981.
- 28 - HOKFELT, T.; LJUNGDAHL, A.; TERENIUS, L.; ELDE, R.; NILSSON G.
Immunohistochemical analysis of peptide pathways possibly
related to pain and analgesia: enkephalin and substance P.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74: 3081 - 5, 1977.

- 29 - 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*, 258: 577, 1975.
- 30 - KARIDANI, H.; FURUTANI, Y.; TARAHASHI, H.; NODA, M.; MORIMOTO, Y.; HIROSE, T.; ASAI, M.; INAYAMA, S.; NARANISHI, S.; NUMA, S. Cloning and sequence analysis of CNDA for porcine B-Neo-endorphin/dynorphin precursor. *NATURE*, 298: 245-9, 1982.
- 31 - KUHAR, M.J.; PERT, C.B.; SNYDER, S.H. Regional distribution of opiate receptor binding in monkey and human brain. *Nature*, 245: 447 - 50, 1973.
- 32 - LARSSON, L. I. Adreno corticotropin - like and ALFA-Melanotrocin - like peptides in a subpopulation of human gastrin cell granules: bioassay, immunoassay and immunocytochemical evidence. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 78; 2990-4, 1981.
- 33 - LEE, C.M. & SNYDER, S.H.; apud DUA, A.K.; PINSKY, C.; LABELLA, F.S. Peptidases that terminate the action of enkephalins. Consideration of physiological importance for amino-, carboxy-, endo-, and pseudo enkephalinase. *Life Sci.*, 37: 985 - 92, 1985.
- 34 - LI, C.H. & CHUNG, D. Isolation and structure of an untriantapeptide with opiate activity from camel pituitary glands. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 73: 1145-8, 1976.
- 35 - MAINS, R.G.; EIPPER, B.A.; LING, M. Common precursor to corticotropins and endorphins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 74: 3014 - 18, 1977.

- 36 - MAIZEL Jr., J.V. Acrylamide gel electroforese of proteins and nucleic acids; in: HABEL, K. & SALZMAN, N.P. - eds. Fundamental Techniques of Virology. New York, Academic Press, 121; 334 - 62, 1965.
- 37 - 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.
- 38 - MARTINS, A.R. Metabolismo de hormônio-peptídeos no sistema nervoso central. Isolamento e caracterização de peptidases do sistema proteolítico do tecido nervoso. Ribeirão Preto, 1977. Tese (Doutorado) Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto.
- 39 - NAKANISHI, S.; INONE, A.; KITA, T.; NAKAMURA, M.; CHANG, A.C.Y.; COHEN, S.N.; NUMA, S. Nucleotide sequence of cloned cDNA for bovine corticotropin-B - lipotropin precursor. *Nature*, 268: 423 - 7, 1979.
- 40 - NODA, M.; FURUTANI, Y.; TAKAHASHI, H.; TOYOSTO, M.; HIROZE, T.; INAVAMA, S.; NAKANISHI, S.; NUMA, S. Cloning and sequence analysis of cDNA for bovine adrenal proenkephalin. *Nature*, 295: 202-6, 1982.
- 41 - OLIVEIRA, E.B.; MARTINS, A.R.; CAMARGO, A.C.M. Isolation of brain endopeptidases: influence of size and sequence of substrates structurally related to bradykinin. *Biochemistry*, 15: 1967-74, 1976.
- 42 - ONOFRID, B.M. & YAKSH T.L. Intrathecal ALFA-receptor ligand produces analgesia in man. *Lancet*, 1: 1386 - 7, 1983.

- 43 - ORLOWSKI, M. & WILK, S. Purification and specificity of a membrane bound metalloendopeptidase from bovine pituitaries. *Biochemistry*, 20: 4942 - 49, 1981.
- 44 - ORLOWSKI, M.; MICHAUD, C.; CHU, G. A soluble metalloendopeptidase from rat brain. *Eur. J. Biochem.*, 135: 81 - 8, 1983.
- 45 - ORLOWSKI, M.; REZNIK, S.; AYALA, J.; PIEROTTI, A.R. Endopeptidase 24.15 from rat testis. *Biochem. J.*, 261: 951 - 8, 1989.
- 46 - PATEY, G. & ROSSIER, J. Decouverte anatomie et biosynthese des differentes familles de peptides opioïdes endogenes. *Ann. Endocrinol.*, 47: 71 - 87, 1986.
- 47 - PERT, C.B. & SNYDER, S.H. Opiate receptor: its demonstration in nervous tissue. *Science*, 179: 1011, 1973.
- 48 - RICETTI, P. & DRYSDALE, J.W. Isoelectric focusing in polyacrilamide gels. *Biochem., Biophys. Acta*, 236: 17, 1971.
- 49 - ROBERTS, J.L. & HERBERT, E. Characterization of a common precursor to corticotropin and B-lipotropin: cell-free synthesis of the precursor and identification of corticotropin peptide in the molecule. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 74: 4826 - 30, 1977.
- 50 - SCHNEBLI, H.P.; PHILLIPS, M.A.; BARCLAY, R. Isolation and characterization of an enkephalin degrading amino peptidase from rat brain. *Biochem., Biophys. Acta.*, 569: 89, 1979.
- 51 - SIMON, E.J.; HILLE, J.M.; EDELMAN, I. Stereospecific binding of the potent narcotic analgesic H3 etorphin to rat brain homogenate. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 70: 1947, 1973.
- 52 - SMANOTOV, R.; KUCHAR, M.J.; UHL, G.R.; SNYDER, S.H. Opioid peptide enkephalin: immunohisto mapping in rat central ner-

- vous system. Proc.Natl.Acad.Sci.USA.,74:2167 - 71,1977.

- 53 - STEINER,D.F.; QUIMN,D.S.; CHAN,S.J.; MARSH,J.; TAGER, H.S.
Processing mechanisms in the biosynthesis of proteins.
Ann. NY. Acad.Sci., 343: 1-16, 1980.

- 54 - STERANKA,L.R.; MANNING,D.C.; DEHAAS,C.J.; FERKANY,J.W.; BOROSKY,
S.A.; CONNOR,J.R.; VAURER,R.J.; STEWART,J.M.; SNYDER,S.H.
Bradykinin as a pain mediator: receptors are localized to
sensory neurons,and antagonists have analgesic
actions. Proc.Natl.Acad.Sci.USA.,85: 3245 - 49, 1988.

- 55 - SULLIVAN,S.; AKIL,H.; BACHAS,J.D. In vitro degradation of
enkephalin: evidence for cleavage at the gly-phe
bond. Commun. Psychopharmac.,2: 525-31, 1978.

- 56 - SULLIVAN,S.; AKIL,H.; BLACKER,D.; BARCHAS,J.D. apud SCHWARTZ,
J.C.; MALFROY,B.; DE LA BAUME,S. Biological inactivation
of enkephalins and the role of enkephalin-dipeptidyl-
carboxypeptidase ("enkephalinase") as neuropeptidase. Life
Sci., 29: 1715-40, 1981.

- 57 - SUPATTAPONE ,S; STRITTMALTER,S.M.; RICHER,L.D.; SNYDER,S.H.
Characterization of a neutral divalent cation-sensitive
endopeptidase: a possible role in neuropeptide processing.
Molecular Brain Research,3; 173 - 82, 1988.

- 58 - SWERTS,J.P.; PERDRISOT,R.; PATEY,G.; BAUME,S.; SCHWARTZ,J.C.
"Enkephalinase" is distinct from brain angiotensin-
converting enzyme. Eur.J.Pharmacol, 57: 279, 1979.

- 59 - TEREINIUS,L. Characteristic of the "receptor" for narcotic
analgesics in synaptic plasma membrane fraction from rat

brain. *Acta Pharmacol.Toxicol.*, 33: 377-84, 1973.

- 60 - TOFFOLETTO, O.; METTER, K.M.; OLIVEIRA, E.B.; CAMARGO, A.C.M.; ROSSIER, J. Liberation of enkephalins from enkephalin containing peptides by brain endo-oligopeptidase A. *Biochemic*, 70: 47-56, 1988.
- 61 - ----- Enkephalin is liberated from metorphamide and dynorphin A (1-8) by endo-oligopeptidase A, but not by metalloendopeptidase. EC.3,4,24,15, *Biochem. J.* 252: 35-8, 1988.
- 62 - 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.
- 63 - VOGEL, Z. & ALTSTEIN, M. apud SCHWARTZ, J.C.; MALFROY, B.; DE LA BAUME, S. Biological inactivation of enkephalins and the role of enkephalin-dipeptidyl-carboxipeptidase ("enkephalinase") as neuropeptidase. *Life Sci.*, 29: 1715-40, 1981.
- 64 - WAGNER, G.W.; TAVIANINI, M.A.; HERRMANN, K.M.; DIXO, J.E. Purification of an enkephalin aminopeptidase from rat brain. *Biochemistry*, 20: 733, 1981.
- 65 - YANG, H.Y.T & NEFF, N.H. apud SCHWARTZ, J.C.; MALFROY, B.; DE LA BAUME, S. Biological inactivation of enkephalins and the role of enkephalin-dipeptidyl-carboxipeptidase (enkephalinase) as neuropeptidase. *Life Sci.*, 29: 1715 - 40, 1981.