NATÁLIA MAZINI RIBEIRO

**AGH É UM NOVO FRAGMENTO DA
CADEIA ALFA DA HEMOGLOBINA COM
ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em
Biologia Celular e Tecidual do Instituto de Ciências
Biomédicas da Universidade de São Paulo, para
obtenção do Título de Doutor em Ciências.

São Paulo
2013

NATÁLIA MAZINI RIBEIRO

**AGH É UM NOVO FRAGMENTO DA
CADEIA ALFA DA HEMOGLOBINA COM
ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em
Biologia Celular e Tecidual do Instituto de Ciências
Biomédicas da Universidade de São Paulo, para
obtenção do Título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Biologia Celular e Tecidual

Orientador: Prof. Dr. Emer Suavinho Ferro

Co-orientadora: Profa. Dra. Vanessa Rioli

Versão corrigida. A versão original eletrônica
encontra-se disponível tanto na Biblioteca do ICB
quanto na Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da
USP (BDTD).

São Paulo
2013

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

© reprodução parcial

Ribeiro, Natália Mazini.

AGH é um novo fragmento da cadeia alfa da hemoglobina com atividade antinociceptiva / Natália Mazini Ribeiro. -- São Paulo, 2013.

Orientador: Prof. Dr. Emer Suavinho Ferro.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Biologia Celular e do Desenvolvimento. Área de concentração: Biologia Celular e Tecidual. Linha de pesquisa: Metabolismo de peptídeos.

Versão do título para o inglês: AGH is a new hemoglobin alpha-chain fragment with antinociceptive activity.

1. Peptídeos 2. Espectrometria de massas 3. Dor
4. Thimet-oligopeptidase 5. Hemopressina 6. Hemorfinas I. Ferro, Prof. Dr. Emer Suavinho II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Tecidual III. Título.

ICB/SBIB040/2013

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Natália Mazini Ribeiro.

Título da Tese: AGH é um novo fragmento da cadeia alfa da hemoglobina com atividade antinociceptiva.

Orientador(a): Prof. Dr. Emer Suavinho Ferro.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a/...../....., considerou

☐ **Aprovado(a)**

☐ **Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS**

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 - CEP. 05508-000 São Paulo, SP - Brasil
Telefone : (55) (011) 3091.7733 - e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob nº **43** nas fls. **86** do livro **02** para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade do Prof(a) Dr(a) Emer Suavinho Ferro, Coordenador(a) da Linha de pesquisa **Uso das oligopeptidases ep 24.15 e ep 24.16 inativas para identificação de novos peptídeos endógenos com potencial terapêutico** do qual participou(aram) o(s) **Natália Mazini Ribeiro e o pesquisador Leandro Mantovani de Castro**, está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pela Sociedade Brasileira de Ciência de Animais de Laboratório (SBCAL) e foi aprovado pela **COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA)** em **20.04.2010**, com validade de 3 anos.

São Paulo, 20 de abril de 2010.

Prof. Dr. WOTHAN TAVARES DE LIMA
Coordenador
CEEA - ICB/USP

Profa. Dra. PATRÍCIA GAMA
Secretária
CEEA - ICB/USP

*Aos meus pais Rubens Domínico Ribeiro e
Nádia Leite Mazini Ribeiro e ao meu amor
João Paulo Penelupi Melo por sempre
acreditarem em mim e me apoiarem nos
momentos em que mais precisei.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao meu orientador Prof. Emer Suavinho Ferro pela oportunidade, orientação e paciência durante esses três anos de desenvolvimento desse trabalho de doutorado tão importantes para a minha formação profissional.

À minha co-orientadora Profa. Vanessa Rioli por sempre ser atenciosa e complementar de forma harmoniosa a minha orientação.

À Profa. Camila Squarzoni Dale pela valiosa ajuda com os experimentos de atividade farmacológica.

Ao Prof. Milton Beltrame Jr., que gentilmente cedeu seu laboratório para a síntese dos marcadores isotópicos. Ao Prof. Lloyd Fricker, pelos marcadores cedidos para testes e por todas as valiosas discussões de resultados.

Ao Prof. Fábio Gozzo e à Alana dos Reis Figueiredo pela parceria em todos os experimentos envolvendo espectrometria de massas, em especial os de ligação cruzada.

Ao Prof. Vitor Marcelo Silveira Bueno Brandão de Oliveira, pela ajuda com os experimentos de dicroísmo circular.

Às Profas. Lakshmi A. Devi, Ivone Gomes e Achla Gupta pelo carinho com que me receberam no laboratório e pelas as preciosas discussões e reuniões de laboratório também.

Aos grandes amigos que fiz no laboratório (em ordem alfabética) Cecília Café Mendes, Christiane Bezerra de Araujo, Diogo Manuel Lopes de Paiva Cavalcanti, Elisabete Rodrigues do Monte Silva, Leandro Mantovani de Castro, Lilian Cristina Russo e Lilian Cruz. Às nossas agregadas Kelly Cristina Saito, Marley Januário da Silva e Priscila Sayami Akamine.

Aos meus irmãos Paulo Rubens Mazini Ribeiro e Ana Paula Ribeiro Guerra Fernandes.

Aos meus tios Marcelo Hugo Ribeiro, Diva Marli Ribeiro e Maria Aparecida Ribeiro.

A todos os colegas do departamento que fizeram os dias pelos corredores e pela copa mais leves e divertidos. Às secretárias do Departamento de Biologia Celular e do Desenvolvimento Celiana, Ana Lúcia, Eloíse e Regina. Ao pessoal da Biblioteca, especialmente à Monica da Silva Amaral, pelo auxílio na revisão e formatação.

A todas as pessoas que participaram de alguma forma dessa conquista.

Às agências FAPESP, CAPES, CNPq e à Pró-reitoria de pesquisa da USP (projetos NAPNA e NAPPS) pelo suporte financeiro, indispensável para realização deste trabalho.

RESUMO

RIBEIRO, N. M. **AGH é um novo fragmento da cadeia alfa da hemoglobina com atividade antinociceptiva.** 2013. 88 f. Tese (Doutorado em Biologia Celular e Tecidual) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

A proteólise limitada de certas proteínas leva à liberação de peptídeos opióides endógenos. As hemorfinas, derivadas da hemoglobina, pertencem a este grupo e têm várias atividades biológicas, como efeitos sobre a aprendizagem espacial, hipotensão transitória, inflamação e analgesia. Vários relatos apontam que os peptídeos derivados da hemoglobina como hemorfinas e hemopressinas têm um efeito antinociceptivo, pela atividade de modulação de receptores acoplados a proteínas G (GPCRs). No presente estudo, um ensaio de captura do substrato (ECS) foi combinado com a marcação isotópica e LC-MS/MS para identificar e caracterizar um novo fragmento bioativo da hemoglobina que se liga à thimet-oligopeptidase (E.C. 3.4.24.15; EP24.15). O peptídeo AGH (AGHLDDLPGASAL), identificado neste trabalho, inibe as respostas de hipernocicepção periféricas, preferencialmente através de receptores opióides do tipo μ (MOR). A presença do peptídeo AGH no tecido nervoso perfundido, associada à existência de uma família de peptídeos de sequência similar, sugere uma relevância fisiológica. Embora o AGH seja derivado de hemoglobina e tenha atividade opióide, falta-lhe a sequência chave das hemorfinas (YPWT), indicando que ele pode pertencer a uma nova classe de peptídeos opióides derivados da hemoglobina com diferentes propriedades a serem estudadas. Adicionalmente, o peptídeo AGH modula as interações entre as proteínas 14-3-3 ϵ e EP24.15 *in vitro*, podendo estar relacionado com a secreção não convencional da EP24.15, entre outros.

Palavras-chave: Thimet-oligopeptidase (E.C. 3.4.24.15; EP24.15). Peptídeos. Hemopressina. Hemorfinas. Hemoglobina. Espectrometria de massas. Receptores opióides do tipo μ . Dor. Nocicepção.

ABSTRACT

RIBEIRO, N. M. **AGH is a new hemoglobin alpha-chain fragment with antinociceptive activity**. 2013. 88 p. Ph. D. thesis (Cell and Tissue Biology) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

Limited proteolysis of certain proteins leads to the release of endogenous opioid peptides. Hemorphins derived from hemoglobin are members of this group and have several biological activities, including effects on spatial learning, transient hypotension, inflammation and analgesia. Several reports have shown that hemoglobin-derived peptides such as hemorphins and hemopressins have an antinociceptive effect by modulating GPCR activity. In the present study, a substrate capture assay (SCA) was combined with isotopic labeling and LC-MS/MS to identify and characterize a new bioactive hemoglobin fragment that binds to thimet-oligopeptidase (E.C. 3.4.24.15; EP24.15). AGH (AGHLDDLPGASAL), a new bioactive peptide identified in this work, inhibits peripheral hyperalgesic responses, preferably through μ opioid receptors (MOR). The presence of AGH peptide in perfused nervous tissue, associated with the existence of a family of peptides of similar sequence, suggests its physiological relevance. Although AGH is derived from hemoglobin and it is a peptide with opioid activity, it lacks the key sequence of hemorphins (YPWT), indicating that it is part of a new class of opioid peptides derived from hemoglobin with different properties to be studied. Additionally, the AGH peptide modulates interactions between 14-3-3 ϵ and EP24.15 proteins in vitro and may be related to the unconventional EP24.15 secretion, among other possible activities.

Key words: Thimet-oligopeptidase (E.C. 3.4.24.15; EP24.15). Peptides. Hemopressin. Hemorphins. Hemoglobin. Mass spectrometry. μ opioid receptors. Pain. Nociception.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Estrutura cristalográfica da EP24.15.	18
Figura 2 - Espectros de MS representativos dos experimentos testes dos novos marcadores isotópicos.....	49
Figura 3 - Espectros de MS representativos dos ensaios de captura de substrato utilizando a EP24.15 inativa.	51
Figura 4 - Sequenciamento do peptídeo AGH a partir da análise do espectro de MS/MS.	52
Figura 5 - Efeito do peptídeo AGH na atividade enzimática da EP24.15 ou da EP24.16 avaliado por ensaio de competição com o substrato FRET Abz-GGFLRRV-EDDnp.	53
Figura 6 - Ressonância plasmônica de superfície.....	54
Figura 7 - Espectro de massas deconvoluído das espécies intactas formadas pela incubação da 14-3-3ε com o peptídeo AGH, após a adição de suberato de N-N-disuccinimidila (DSS).....	55
Figura 8 - Região de ancoragem do peptídeo AGH (N-terminal) na superfície da proteína 14-3-3ε.	56
Figura 9 - Espectro de dicroísmo circular da proteína 14-3-3ε subtraído do espectro do complexo 14-3-3ε/AGH.....	57
Figura 10 - Efeito do AGH na hipernocicepção induzida por carragenina.	59
Figura 11 - Hipernocicepção mecânica avaliada pelo teste de pressão na pata 14 dias após a cirurgia de constrição do nervo isquiático (CCI) e tratamento com AGH.	60
Figura 12 - Efeito do AGH e de outras sequências similares na ativação da proteína G induzida pela ligação de um agonista.	62
Figura 13 - Espectros de MS do peptídeo AGH identificado em tecidos perfundidos de hipocampo e cerebelo de camundongos.	64

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Peptídeos sintéticos utilizados nos experimentos teste de marcação isotópica.....	38
Tabela 2 - Análise das curvas de peptídeo.....	50
Tabela 3 - Hidrólise do AGH e da bradicinina pela EP24.15 ou pela EP24.16	53
Tabela 4 - Peptídeos da 14-3-3ε encontrados ligados ao peptídeo AGH	55

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

[³⁵S]GTPγS – guanosina 5'-[γ-tio]trifosfato marcado com enxofre [³⁵S]
14-3-3ε – isoforma ε da proteína 14-3-3
Abz – o-aminobenzoil
ALC – agente de ligação cruzada
BCA – ácido bicinconínico
BSA – albumina do soro bovino
Ca²⁺-CaM – cálcio-calmodulina
CaM I – calmodulina I
AMPC – adenosina monofosfato cíclico
CB1 – receptores canabinóides do tipo 1
CCI – constrição crônica (*chronic constriction injury*)
cDNA – ácido desoxirribonucleico complementar
Cg – carragenina
CGRP – peptídeo relacionado ao gene da calcitocina
CTOP – D-Trp-Orn-Thr-Pen-Thr-NH₂
D₀-TMAB – 4-trimetil-amônio-butilil sem átomos de deutério
D₃-TMAB – 4-trimetil-amônio-butilil com 3 átomos de deutério
D₆-TMAB – 4-trimetil-amônio-butilil com 6 átomos de deutério
D₉-TMAB – 4-trimetil-amônio-butilil com 9 átomos de deutério
DAMGO – [D-Ala²,N-Met-Phe⁴,Gly(ol)⁵]-encefalina
DCC – diciclohexilcarbodiimida
DDA – dados dependentes de aquisição
DMSO – dimetilsulfóxido
DOR – receptores opióides do tipo δ
DRG – gânglio da raiz dorsal (*dorsal root ganglion*)
DSS – suberato de N-N-disuccinimidila
DTT – ditioneitol
ECA – enzima conversora de angiotensina
ECS – ensaio de captura de substrato
EDDnp – N-(2,4-dinitrofenil)-etilenodiamina
EGTA – ácido etileno glicol tetracético
EP24.15 – thimet-oligopeptidase (endopeptidase 24.15) (EC3.4.24.15)

EP24.16 – neurolisina (endopeptidase 24.16) (EC 3.4.24.16)

EPM – erro padrão da média

ESI – ionização em *electrospray*

FRET – transferência de energia de ressonância de fluorescência (*fluorescence resonance energy transfer*)

GABA – ácido γ -aminobutírico

GDP – guanosina-5-difosfato

GPCRs – receptores acoplados a proteínas G

GTP – guanosina-5-trifosfato

HPLC – cromatografia líquida de alta eficiência

HU-210 – (6aR,10aR)- 9-(Hidroximetil)- 6,6-dimetil- 3-(2-metiloctan-2-il)- 6a,7,10,10a-tetrahidrobenzo[c]cromen-1-ol

ICI 174,864 – N,N-dialil-Tyr-Aib-Aib-Phe-Leu

IL-1 β – interleucina 1 beta

IL6 – interleucina 6

IL8 – interleucina 8

IPTG – isopropil- β -D-tiogalactopiranosídeo

KOR – receptores opióides do tipo κ

LB – Lennox L broth base

LB-agar – Lennox L broth base ágar

LC-MS/MS – cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas

MAPK – MAP quinases

MOR – receptores opióides do tipo μ

MS – espectrometria de massas (*mass spectrometry*)

NGF – fator de crescimento neural

NHS – N-hidroxissuccinimida

NK1 – Receptor taquicinérgico do tipo 1

NK2 – Receptor taquicinérgico do tipo 2

NKA – neurocinina A

NMDA – N-metil-D-aspartato

NO – óxido nítrico

nor-BNI – cloridrato de nor-binaltorfimina

NOS – óxido nítrico síntase

PBS – tampão fosfato-salina

pGEX4T-2 – vetor plasmidial contendo o gene de interesse fusionado a glutathione S-transferase

PKA – proteína quinase A

PKC – proteína quinase C

RPS – ressonância plasmônica de superfície

SDS-PAGE – dodecil sulfato de sódio – eletroforese em gel de poliacrilamida

SNC – sistema nervoso central

SP – substância P

TBS – tampão tris-salina

TFA – ácido trifluoracético

THF – tetra-hidrofurano

TMAB – 4-trimetil-amônio-butiril

TMAB-NHS – cloreto de [3-(2,5-dioxo-pirrolidina-1-iloxicarbonil)-propil] trimetilamônio

TNF- α – fator de necrose tumoral-alfa

UAF – unidades arbitrárias de fluorescência

VFD-7 – peptídeo VFDVELL

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
1.1 Objetivos	16
<i>1.1.1 Objetivos específicos</i>	16
2 REVISÃO DE LITERATURA	18
2.1 Endopeptidase EP24.15 e os peptídeos intracelulares	18
2.2 Receptores opióides	21
2.3 Ligantes de receptores opióides	23
<i>2.3.1 Ligantes atípicos de receptores opióides</i>	23
2.4 Dor	25
<i>2.4.1 Nocicepção</i>	26
<i>2.4.2 Hipernocicepção aguda</i>	29
<i>2.4.3 Hipernocicepção crônica</i>	30
3 MATERIAIS E MÉTODOS	33
3.1 Animais	33
3.2 Isolamento de peptídeos de tecido cerebral de camundongos	33
3.3 Dosagem de peptídeos	34
3.4 Expressão das proteínas recombinantes	34
3.5 Síntese dos marcadores isotópicos TMABs (4-trimetil-amônio-butilil)	35
3.6 Ensaio de captura de substrato (ECS)	39
3.7 Marcação isotópica	39
3.8 Cromatografia Líquida Acoplada à Espectrometria de Massas (LC-MS/MS)	40
3.9 Análises dos dados de LC-MS/MS	41
3.10 Ensaios de competição entre AGH e o peptídeo FRET (transferência de energia de ressonância de fluorescência) Abz-GGFLRRV-EDDnp na presença da EP24.15 ou EP24.16	41
3.11 Hidrólise do peptídeo com EP24.15 ou EP24.16	42
3.12 Interação proteína-proteína e peptídeo-proteína	43
3.13 Experimentos de ligação cruzada - interação entre a proteína 14-3-3ϵ e o peptídeo AGH	43
3.14 Dicroísmo circular	44
3.15 Atividade farmacológica	44

3.15.1 Tratamentos farmacológicos	44
3.15.2 Hipernocicepção mecânica do membro posterior	44
3.15.3 Hipernocicepção inflamatória.....	45
3.15.4 Indução da hipernocicepção neuropática	45
3.15.5 Procedimento para tratamento intratecal	46
3.16 Ensaios de ligação de [³⁵S]GTPγS estimuladas por agonista.....	46
3.16.1 Preparação das membranas de estriado de rato	46
3.16.2 Ensaios de ligação de [³⁵ S]GTPγS estimuladas por agonista.....	46
3.17 Identificação do peptídeo AGH em tecidos perfundidos	47
3.18 Forma de análise dos resultados	47
4 RESULTADOS	48
4.1 Síntese dos marcadores isotópicos TMABs (4-trimetil-amônio-butiril).....	48
4.2 Identificação do peptídeo AGH	50
4.3 Ensaios de competição entre AGH e o substrato FRET Abz-GGFLRRV-EDDnp na presença da EP24.15 ou EP24.16	52
4.4 Análise da hidrólise do peptídeo AGH pela EP24.15 ou EP24.16.....	53
4.5 Interação proteína-proteína e peptídeo-proteína	54
4.6 Ligação cruzada (cross-linking) - interação entre 14-3-3ε e AGH.....	55
4.7 Dicroísmo circular	56
4.8 Hipernocicepção inflamatória	57
4.9 Hipernocicepção neuropática	59
4.10 Efeito do AGH na ligação de [³⁵ S]GTPγS estimulada por agonista.....	60
4.11 Identificação do peptídeo AGH em tecidos perfundidos	63
5 DISCUSSÃO	65
6 CONCLUSÕES.....	71
REFERÊNCIAS	72

1 INTRODUÇÃO

A thimet-oligopeptidase (E.C. 3.4.24.15; EP24.15) de 687 resíduos de aminoácidos e 78 kDa é uma metaloendopeptidase com um motivo característico de ligação com zinco *HEXXH*, que pertence à família M3 das metalopeptidases (CUMMINS et al., 1999; MCKIE et al., 1993; RAWLINGS; BARRETT, 1995). Apesar de ter um papel descrito como uma enzima secretada com função de metabolização de neuropeptídeos (FERRO et al., 1999), foi demonstrado que a EP24.15 localiza-se predominantemente no citoplasma e no núcleo das células neuronais (FONTENELE-NETO et al., 2001) e desempenha um papel importante na degradação de peptídeos intracelulares produzidos pelo proteossoma 26S (BERTI et al., 2009; KESSLER et al., 2011; RUSSO et al., 2012b; SILVA et al., 1999).

Nosso grupo demonstrou a viabilidade do uso da EP24.15 mutante cataliticamente inativa (E474A) em um ensaio de captura de substrato (ECS) para identificar novos peptídeos bioativos. O primeiro peptídeo bioativo encontrado usando o ECS foi a hemopressina (PVNFKFLSH) (RIOLI et al., 2003). Este agonista inverso de receptores canabinóides do tipo 1 (CB1), foi a primeira sequência de uma nova classe de peptídeos canabinóides derivados da hemoglobina: as hemopressinas. Estes peptídeos são derivados da cadeia alfa (hemopressina, RVD-hemopressina- α e VD-hemopressina- α) ou beta da hemoglobina (VD-hemopressina- β). Uma vez que os ligantes endógenos de receptores CB1 anteriormente identificados são derivados de lipídios (anandamida e 2-araquidonoilglicerol), a hemopressina representa o primeiro peptídeo que antagoniza (agonista inverso) seletivamente os receptores CB1 (GOMES et al., 2009; HEIMANN et al., 2007) tendo várias funções biológicas: diminui a pressão sanguínea (RIOLI et al., 2003), inibe respostas de hipernocicepção periférica (DALE et al., 2005; HEIMANN et al., 2007) e funciona oralmente como supressor do apetite (DODD et al., 2010).

1.1 Objetivos

O objetivo deste trabalho foi identificar e caracterizar novos peptídeos endógenos que se ligam a EP24.15, e investigar sua possível atividade antinociceptiva.

1.1.1 Objetivos específicos

- Isolar novos peptídeos ligantes da EP24.15 combinando a metodologia de captura de substrato descrita por Rioli e colaboradores (2003) acrescida do uso de marcadores isotópicos

para análise semi-quantitativa dos peptídeos (CHE; FRICKER, 2002; MORANO; ZHANG; FRICKER, 2008).

- Avaliar um possível efeito antinociceptivo dos peptídeos isolados, por meio de teste de pressão na pata de ratos (RANDALL; SELITTO, 1957).

- Realizar testes sobre suas possíveis atividades na modulação de interações proteína-proteína por meio de ressonância plasmônica de superfície (RPS).

- Mapear a região de interação do complexo peptídeo-proteína (14-3-3 ϵ /AGH) por meio de ensaios de ligação cruzada e espectrometria de massas.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Endopeptidase EP24.15 e os peptídeos intracelulares

A EP24.15 pertencente à família M3 das metalopeptidases, foi inicialmente isolada à partir das frações solúveis de glândula pituitária bovina (HORSTHEMKE; BAUER, 1980) e cérebro de ratos (ORLOWSKI; MICHAUD; CHU, 1983), e está amplamente distribuída nos órgãos de mamíferos, embora a sua maior concentração ocorra no cérebro e tecido reprodutivo (PIEROTTI et al., 1991; SHRIMPTON; SMITH; LEW, 2002).

Essa enzima possui restrição por substratos peptídicos contendo de 5 a 17 resíduos de aminoácidos, não sendo capaz de hidrolisar proteínas (BERTI et al., 2009; CAMARGO et al., 1997; OLIVEIRA et al., 2001).

A estrutura cristalográfica da EP24.15 foi determinada por difração de raios-X (BROWN et al., 2001; RAY et al., 2004), apresentando domínios compostos predominantemente por estruturas α -hélice, sendo que entre esses dois domínios forma-se um canal profundo onde fica localizado o sítio ativo (Figura 1). Através de mutações sítio dirigidas, foi elucidado quais eram os resíduos responsáveis pela coordenação do zinco no sítio ativo ($H^{473}ExxH^{477}$), mostrando ainda que, além das histidinas, há um terceiro ligante do zinco, o ácido glutâmico 502 (E502). A observação deste terceiro ligante de zinco a aproximadamente 25 resíduos de aminoácido do motivo *HEXXH* é uma característica dessa família de metalopeptidases (CUMMINS et al., 1999).

Figura 1 - Estrutura cristalográfica da EP24.15.

Endopeptidase que hidrolisa apenas oligopeptídeos contendo entre 5 e 17 resíduos de aminoácidos. Possui um íon metálico Zn^{2+} no sítio ativo
Fonte: (RAY et al., 2004).

A EP24.15 pode ser ativada devido a sua sensibilidade a compostos tióis. A adição de ditionitriol (0,5 mM) ativa a enzima por romper pontes dissulfeto intermoleculares (SHRIMPSON et al., 1997), mas não pela participação de cisteínas na catálise, como sugerido anteriormente (GOMES et al., 1993). A ruptura destas interações intermoleculares permite que a enzima permaneça na forma monomérica tendo o substrato livre acesso ao centro catalítico (SHRIMPSON et al., 1997). Uma vez que inibidores naturais da enzima não foram descobertos, a diferença entre o potencial redox do meio extracelular e intracelular pode ser o modo pelo qual a atividade da EP24.15 é regulada (SHRIMPSON; SMITH; LEW, 2002).

Foi demonstrado ainda que a EP24.15 de mamíferos sofre naturalmente o processo de S-glutatioilação, tanto *in vitro* quanto *in vivo*, e que essa modificação controla sua auto oligomerização (DEMASI et al., 2008), fato que pode ter consequências funcionais para o metabolismo de peptídeos intracelulares, já a enzima oligomerizada tem sua atividade catalítica reduzida (SHRIMPSON et al., 1997; SIGMAN et al., 2003).

Embora a EP24.15 seja secretada, sua presença em vesículas secretórias contendo o marcador β -endorfina não foi observada, bem como o *time-course* de sua secreção foi demonstrado ser distinto daquele descrito para os neuropeptídeos (FERRO et al., 1999). Mostrou-se então que a secreção da EP24.15 ocorre por um mecanismo secretório alternativo, mas que depende da integridade da via secretória convencional (FERRO et al., 1999; GARRIDO et al., 1999). Foi demonstrado ainda que a EP24.15 interage fisicamente com as proteínas 14-3-3 ϵ e calmodulina I (CaM I), fato que está relacionado com a sua secreção não convencional (RUSSO et al., 2009). É possível que o aumento na co-localização da EP24.15 com a 14-3-3 ϵ e a CaM I facilite a secreção da enzima por posicioná-la mais próxima à membrana plasmática e, possivelmente, melhor dentro da maquinaria responsável pela secreção não convencional de proteínas (CARRENO et al., 2005; RUSSO et al., 2009).

A função da EP24.15 no degradoma vem sendo implicada no metabolismo de uma série de neuropeptídeos e como consequência, envolvida em vários processos fisiológicos. A EP24.15 tem sido relacionada com a percepção de dor (GOMEZ et al., 2011; KEST; ORLOWSKI; BODNAR, 1992; KEST et al., 1991; MOLINEAUX; AYALA, 1990), a homeostase cardiovascular e renal (CARDOZO; ORLOWSKI, 1993; ORLOWSKI; MICHAUD; CHU, 1983; TELFORD et al., 1995) e a reprodução (LEW et al., 1997; PIEROTTI et al., 1991; WU; PAGANO; MANI, 2009). As funções intracelulares da EP24.15 estão relacionadas com a apresentação de antígenos via MHC-I (KIM et al., 2003; PORTARO et al., 1999; SILVA et al., 1999; YORK et al., 2003) e degradação e geração de peptídeos

biologicamente ativos (BERTI et al., 2009; CUNHA et al., 2008; RIOLI et al., 2003; RUSSO et al., 2012a).

As evidências experimentais acumuladas ao longo dos últimos anos pelo nosso laboratório apontam que, apesar de ser secretada (CARRENO et al., 2005; RUSSO et al., 2009) e ter um importante papel na metabolização de neuropeptídeos (FERRO et al., 1999), a maior parte de EP24.15 está presente no meio celular interno (FONTENELE-NETO et al., 2001). Desta forma, procurou-se investigar a função da EP24.15 no metabolismo intracelular de peptídeos.

A superexpressão da EP24.15 nas células CHO-S e HEK293 foi suficiente para reduzir a ativação de luciferase desencadeada por isoproterenol ou angiotensina II, agonistas específicos de GPCRs (CUNHA et al., 2008). Além disso, num estudo recente, a EP24.15 foi inibida em células HEK293, utilizando-se uma sequência de RNA de interferência. Esta inibição modulou níveis de peptídeos intracelulares específicos e potencializou a ativação do gene repórter luciferase pelo isoproterenol (RUSSO et al., 2012b).

Muitos dos peptídeos intracelulares naturais podem estar envolvidos na interação proteína-proteína, alguns deles foram investigados como moduladores de interações entre Ca^{2+} -calmodulina (CaM) e 14-3-3 ϵ , que estão relacionados com a organização espacial da transdução de sinal em células (FERRO; HYSLOP; CAMARGO, 2004; RUSSO et al., 2012a). O peptídeo VFDVELL (VFD-7), produto do proteassoma, identificado pela primeira vez em células HEK293 (BERTI et al., 2009), presente também em células MCF-7 e SHSY5Y (GELMAN et al., 2011), aumenta a concentração de Ca^{2+} citosólico de forma dose dependente, mas apenas se for introduzido em células HEK293, o que sugere uma função biológica intracelular desse peptídeo (RUSSO et al., 2012a).

A ferramenta para identificação de substratos e inibidores naturais da EP24.15, que foi utilizada neste trabalho, foi desenvolvida por Rioli e colaboradores (2003). Foram geradas mutações pontuais que levaram à inativação catalítica das enzimas EP24.15 e EP24.16 (RIOLI et al., 2003), que tem aproximadamente 60% de homologia entre si (DAUCH; VINCENT; CHECLER, 1995). No trabalho desenvolvido por Rioli e colaboradores (2003), o uso dessas formas cataliticamente inativas das enzimas permitiu o isolamento e identificação de vários peptídeos naturais anteriormente desconhecidos. A atividade enzimática das enzimas EP24.15 e EP24.16 foi inativada por mutação pontual sítio dirigida dos resíduos de aminoácidos no motivo *HEXXH*, sem perturbar a estrutura secundária ou capacidade de ligação a substratos. Quinze dos peptídeos isolados foram sequenciados por espectrometria de massas, e três destes peptídeos (VVYPWTQRY, LVVYPWTQRY e PVNFKFLSH,) foram

sintetizados e mostraram interagir com a EP24.15, com a EP24.16 e com a enzima conversora de angiotensina (ECA). Os dois primeiros correspondem a VV-hemorфина-7 e LVV-hemorфина-7, peptídeos opióides já descritos, derivados da cadeia beta da hemoglobina (PIOT et al., 1992). O terceiro corresponde a um fragmento da cadeia alfa da hemoglobina, a hemopressina (RIOLI et al., 2003), cuja descoberta abriu caminho para inúmeros trabalhos que comprovaram sua relevância científica (DALE et al., 2005; DODD et al., 2010; HEIMANN et al., 2007).

2.2 Receptores opióides

Três diferentes tipos de receptores opióides têm sido descritos: receptores opióides do tipo μ (MOR), κ (KOR) e δ (DOR) (MOUSA et al., 2007; PUEHLER et al., 2006; PUEHLER et al., 2004). Os diferentes tipos de receptores opióides são divididos em subtipos, essa classificação tem sido feita com base na capacidade de antagonistas específicos de bloquear um receptor e não outro (HARRISON; KASTIN; ZADINA, 1998; NARITA et al., 2001). Assim, os receptores opióides do tipo μ foram divididos em $\mu 1$ e $\mu 2$ e os do tipo δ em $\delta 1$ e $\delta 2$ (NARITA et al., 2001; TRAYNOR; ELLIOTT, 1993). Vários grupos diferentes têm sugerido que os receptores opióides do tipo κ se dividem nos subtipos $\kappa 1$, $\kappa 2$ e $\kappa 3$ (ROTHMAN et al., 1989). As evidências da existência de receptores opióides do tipo κ vieram quase inteiramente a partir de ensaios de ligação de radioligantes usando ligantes seletivos e o resultado é uma literatura muito mais complexa do que para os outros receptores opióides (TRAYNOR, 1989). Para demonstrar sítios κ opióides específicos no cérebro foi necessário suprimir a ligação de ligantes em sítios μ e δ , por incubação com ligantes não marcados que se ligam seletivamente a estes locais (KOSTERLITZ; PATERSON; ROBSON, 1981).

Os receptores opióides do tipo μ são responsáveis pela maioria dos efeitos analgésicos dos opióides, bem como os principais efeitos colaterais, como depressão respiratória, euforia, dependência, sedação e diminuição da motilidade gastrointestinal (BROWNSTEIN, 1993; JONGKAMONWIWAT et al., 2003; PAN et al., 2008; PRZEWLOCKI; PRZEWLOCKA, 2001).

Os receptores opióides apresentam sete domínios transmembrânicos acoplados à proteína G heterotrimérica (PAN et al., 2008; PRZEWLOCKI; PRZEWLOCKA, 2001). Esses receptores tem a característica de se apresentarem também em formas de dímeros homômeros ou heterômeros com propriedades farmacológicas particulares (BUSHLIN; ROZENFELD; DEVI, 2010; VAN RIJN; WHISTLER; WALDHOER, 2010).

A ação analgésica dos receptores opióides envolve vários mecanismos moleculares. Após a ligação do agonista no receptor, a proteína G dissocia-se nas subunidades G_α e $G_{\beta\gamma}$, inibindo o sistema adenilato ciclase e diminuindo a produção de adenosina monofosfato cíclico (AMPc) (SCHULTZ; GROSS, 2001). Ocorre a abertura de canais de potássio, com consequente hiperpolarização de membrana, impedindo a abertura de canais de cálcio. A redução do influxo de cálcio nas fibras nervosas leva a inibição da liberação de neurotransmissores, contribuindo para a diminuição da transmissão do impulso nervoso (DICKENSON; SULLIVAN, 1987). Foi observada ainda a ativação de cascatas das MAPK (MAP quinases) (FUKUDA et al., 1996; GUTSTEIN et al., 1997; POLAKIEWICZ et al., 1998). Sugere-se também que a ativação da via L-arginina-óxido nítrico-GMPc (monofosfato de guanosina cíclica) seja responsável pela analgesia periférica induzida por opióides (AMARANTE; DUARTE, 2002; FERREIRA; DUARTE; LORENZETTI, 1991; GRANADOS-SOTO et al., 1997), uma vez que inibidores da óxido nítrico síntase (NOS) ou da guanilato ciclase reverterem o efeito de opióides em modelos de hipernocicepção inflamatória aguda (AMARANTE; DUARTE, 2002; DUARTE; LORENZETTI; FERREIRA, 1990; FERREIRA; LORENZETTI, 1994; GRANADOS-SOTO et al., 1997), ou crônica (SACHS; CUNHA; FERREIRA, 2004).

Evidências experimentais e clínicas apontam que fármacos opióides apresentam efeito potencializado em casos de processos inflamatórios ou lesão tecidual (PHIPPS; STEIN; ROPER, 1991; STEIN; GRAMSCH; HERZ, 1990; STEIN; ZOLLNER, 2009). Isto se deve ao aumento da síntese de receptores opióides, tanto na periferia quanto centralmente, aumento do transporte axonal desses receptores e seu acúmulo no tecido inflamado (BINDER; CARMODY; WALKER, 2000; HASSAN et al., 1993), além do incremento na exposição de receptores opióides na fibra nervosa sensitiva, decorrentes de alterações na barreira perineural desses neurônios ocasionadas pela lesão ou inflamação (OLSSON, 1990; RECHTHAND; RAPOPORT, 1987). No entanto, essas alterações dependem do tipo de lesão ou inflamação, do tipo de receptor envolvido e ainda de sua localização (central ou periférica). De forma que em alguns casos de dor neuropática pode haver diminuição da efetividade de alguns fármacos opióides (KOHNO et al., 2005; ZHANG et al., 1998).

2.3 Ligantes de receptores opióides

Opióide é um termo geral usado para identificar qualquer substância, natural ou sintética, cuja ação analgésica, semelhante aos efeitos da morfina, seja bloqueada pelo antagonista naloxona (REISINE et al., 1996).

A morfina é o protótipo dos fármacos opióides e tem sido utilizada medicinalmente durante séculos. O ópio é um extrato da planta da papoula, *Papaver somniferum*. Em 1806, o químico alemão Serturner isolou os alcalóides do ópio, sendo um deles a morfina, que recebeu esse nome em homenagem a Morfeu, o deus grego dos sonhos (WALDHOER; BARTLETT; WHISTLER, 2004).

A descoberta de sítios de ligação opióide estereoespecíficos no cérebro dos mamíferos (PERT; SNYDER, 1973; SIMON, 1988; TERENIUS, 1973) deu início a uma série de estudos envolvendo seus ligantes naturais. Os primeiros peptídeos opióides endógenos descritos foram Met-enkefalina e Leu-enkefalina (HUGHES et al., 1975). Em seguida, vários estudos revelaram a existência de novas classes inteiras destes peptídeos. A ligação do agonista nos receptores opióides específicos leva a uma analgesia potente (YAKSH, 1999) dando uma grande importância para os estudos destes compostos.

O grupo clássico de peptídeos opióides endógenos inclui as encefalinas (HUGHES et al., 1975), dinorfinas (FISCHLI et al., 1982; GOLDSTEIN et al., 1981; GOLDSTEIN et al., 1979) e β -endorfina (BRADBURY et al., 1976; LI; CHUNG, 1976), liberadas após a clivagem de proencefalina (NODA et al., 1982), prodinorfina (KAKIDANI et al., 1982) e proopiomelanocortina (NAKANISHI et al., 1979; NYBERG; SANDERSON; GLAMSTA, 1997), respectivamente. As encefalinas têm maior afinidade com MOR, dinorfinas com KOR, enquanto β -endorfina tem maior afinidade com MOR (NYBERG; SANDERSON; GLAMSTA, 1997).

2.3.1 Ligantes atípicos de receptores opióides

A proteólise limitada de certas proteínas leva à liberação de outro grupo de peptídeos opióides endógenos. Casomorfina, citocrofinas e hemorfinas, derivadas de caseína, citocromo b mitocondrial e hemoglobina, respectivamente, pertencem a este grupo. Esses compostos tiveram sua atividade opióide inicialmente caracterizada pelo potencial de inibição de contrações estimuladas eletricamente em íleo isolado de cobaia (BRANTL et al., 1985; BRANTL et al., 1986; BRANTL et al., 1979; IVANOV et al., 1997).

As casomorfina são obtidas a partir da β -caseína (β -casomorfina) e α_{s1} -caseína (α -casomorfina). A morfictina (YPFP), pertencente ao grupo das β -casomorfina, é o peptídeo dessa classe com maior potencial opióide. Estudos tem demonstrado que as casomorfina são responsáveis por efeitos como analgesia, aumento do tempo de trânsito intestinal, efeitos antidiarréicos, aumento na absorção de aminoácidos e eletrólitos e estímulo da secreção de insulina e somatostatina (KORHONEN et al., 1998; MEISEL; FRISTER; SCHLIMME, 1989; SCHANBACHER et al., 1998).

Foi demonstrado que a citocrofina-4 (YPFT), um tetrapeptídeo com atividade opióide, produto da decomposição do citocromo b mitocondrial (BRANTL et al., 1985), está envolvida com o desenvolvimento de amnésia reversível por naloxona em pintinhos (FREEMAN; YOUNG, 2000).

As hemorfina podem ter de 4 a 10 aminoácidos e são liberadas durante a degradação proteolítica fisiológica ou fisiopatológica da hemoglobina humana (DUETHMAN; DEWAN; CONLON, 2000; GLAMSTA et al., 1991; GLAMSTA et al., 1993; MAKINEN; SEWON; MAKINEN, 1996). O primeiro peptídeo identificado como opióide derivado da hemoglobina foi a hemorfina-4 (YPWT). Uma amostra de sangue bovino foi tratada com uma mistura de enzimas gastrointestinais e a hemorfina-4 foi isolada pela primeira vez a partir deste material. Por busca em banco de dados, esse peptídeo foi identificado como um fragmento da cadeia β da hemoglobina bovina (34-37) e em seguida foi encontrado também nas cadeias β , κ , δ e ϵ da hemoglobina humana (35-38) (BRANTL et al., 1986).

Em seguida, uma série de peptídeos contendo a sequência do tetrapeptídeo foram identificados como hemorfina-4 a -7, e LVV-hemorfina-4, -6 e -7 (DAGOUASSAT et al., 1996; MOISAN et al., 1998; PIOT et al., 1992).

Esses peptídeos ocorrem naturalmente no cérebro (BARKHUDARYAN et al., 1993; BRENT; PANG, 1995; CHANG et al., 1980; ERCHEGYI et al., 1992; GLAMSTA et al., 1991; KARELIN et al., 1994), plasma (GLAMSTA et al., 1993), fluido cerebrospinal (GLAMSTA et al., 1992) e medula espinhal (NISHIMURA; HAZATO, 1993). Hemorfina tem várias atividades biológicas, como efeitos sobre a aprendizagem espacial (LEE et al., 2004), hipotensão transitória (BARKHUDARYAN et al., 1992), inflamação (SANDERSON; NYBERG; KHALIL, 1998) e analgesia (CHENG et al., 2012; DAVIS; GILLESPIE; PORRECA, 1989).

A hemoglobina pode ser clivada *in vitro* por inúmeras enzimas que levam à geração de hemorfina: pepsina (PIOT et al., 1992), proteases macrofágicas (DAGOUASSAT et al., 1996) e lisossomais, especialmente catepsina D (FRUITIER et al., 1999; FRUITIER;

GARREAU; PIOT, 1998). Além disso, um estudo recente mostrou que a inibição do proteassoma intraeritrocítico retarda a geração de hemorfinas, sugerindo que o proteassoma 20S também está envolvido no processamento de hemoglobina e produção de hemorfinas (SONG et al., 2012).

2.4 Dor

A dor foi conceituada, em 1986, pela Associação Internacional para o Estudo da Dor (IASP) como “uma experiência sensorial e emocional desagradável que está associada com lesões reais ou potenciais ou descrita em termos de tais lesões”. A dor pode ser descrita também como uma experiência complexa que envolve não apenas a transdução de estímulo nocivo ambiental, mas também processamento cognitivo e emocional pelo encéfalo (JULIUS; BASBAUM, 2001).

O papel fisiológico da dor é funcionar como um alarme para proteger o organismo ativando reações e induzindo comportamentos de precaução, que podem diminuir o que estiver causando a dor e, como resultado, limitar os danos (MARKENSON, 1996; MILLAN, 1999; WOOLF, 2000). Uma das funções vitais do sistema nervoso é informar sobre a ocorrência de perigo ou injúria. A sensação de dor contribui para essa função (RIEDEL; NEECK, 2001) e está, portanto, relacionada com comportamentos de fuga e esquiva (PEDERSEN; SCHEEL-KRUGER; BLACKBURN-MUNRO, 2007).

Assim que o mecanismo de alerta é estabelecido, a ameaça de dor pode provocar uma resposta comportamental generalizada, respostas endócrinas (secreção de corticosterona) e ativação simpática (levando a elevações de pressão sanguínea e batimentos cardíacos), que, juntos com uma antinocicepção transitória, auxiliam o melhoramento do desempenho dos repertórios comportamentais, permitindo o afastamento de situações de risco com mais sucesso (MILLAN, 1999).

Essas funções de alerta estão relacionadas à dor aguda, que se segue à lesão tecidual, desaparecendo com a resolução do processo patológico. A dor aguda pode tornar-se crônica, que persiste além do tempo de cura da lesão ou está associada a um processo patológico crônico que causa dor contínua ou recorrente. Ao contrário da dor aguda, a dor crônica não tem função de alerta e pode ocorrer devido a fatores ambientais ou psicopatológicos (TEIXEIRA; PIMENTA, 1994).

As manifestações de dor possuem aspectos sensoriais e afetivos: enquanto o sistema sensorial, perceptor, permite a localização espaço-temporal, a qualificação física e a

intensidade do estímulo nocivo, o componente cognitivo-afetivo atribui emoções à experiência, sendo responsável pelas respostas comportamentais à dor. Assim, a dor tem uma conotação individual e sofre a influência de experiências anteriores. De forma que, o termo nocicepção é usado para definir os processos neurais de codificação e processamento do estímulo nocivo, enquanto a dor envolve, além da nocicepção, o componente emocional desagradável (ALMEIDA; ROIZENBLATT; TUFIK, 2004).

No que se refere ao emprego de animais como modelos experimentais de dor, é mais adequada a utilização do termo nocicepção, visto que estes animais são incapazes de verbalizar os componentes subjetivos da experiência dolorosa. Assim, tem sido proposto que termos como dor e analgesia sejam mais apropriadamente empregados para seres humanos, enquanto nocicepção e antinocicepção sejam mais adequados para animais (PARADA et al., 2003).

2.4.1 Nocicepção

A nocicepção é uma forma especializada de sinalização sensorial, que converte informação sobre lesões teciduais (BARANAUSKAS; NISTRI, 1998). A transmissão da sensação da dor está associada à atividade elétrica das fibras nervosas aferentes primárias livres nos tecidos periféricos, os nociceptores (CAILLIET, 1993; RANG; DALE; RITTER, 1997). Essas fibras apresentam-se amplamente distribuídas na pele, vasos, músculos, articulações e vísceras (JULIUS; BASBAUM, 2001). Estudos eletrofisiológicos mostraram a existência desses neurônios sensoriais primários que podem ser excitados por calor nocivo, pressão intensa ou irritantes químicos, mas não por estímulos inócuos como um leve toque (BURGESS; PERL, 1967). Quando são ativados pelos três tipos de estímulos são chamados nociceptores polimodais (BASBAUM et al., 2009).

Há ainda os chamados nociceptores silenciosos (*silent*) os quais existem em pequena proporção nas fibras aferentes primárias e não respondem normalmente a estímulos. No entanto, quando são estimulados por mediadores inflamatórios ou após a administração de agentes flogísticos (pró-inflamatórios), estes nociceptores apresentam atividade espontânea ou tornam-se sensibilizados e passam a responder a estímulos sensoriais (JULIUS; BASBAUM, 2001).

Os neurônios que constituem as fibras aferentes primárias envolvidas no processo nociceptivo são pseudounipolares, contendo um axônio dirigido à periferia, um corpo celular presente no gânglio da raiz dorsal da medula espinhal (DRG - *dorsal root ganglion*) e um

axônio dirigido à medula espinhal, onde ocorre a primeira sinapse do sistema de transmissão da nocicepção (BASBAUM et al., 2009). As funções dos neurônios aferentes primários no processo de nocicepção são: detecção do estímulo nocivo, condução do estímulo da periferia para a medula espinhal e transferência desses impulsos para neurônios secundários e interneurônios das lâminas específicas da coluna posterior da medula espinhal (PERL, 1963). Da medula espinhal, as informações nociceptivas são conduzidas ao tronco cerebral, tálamo e córtex cerebral, onde ocorre a percepção da dor (SCHAIBLE; RICHTER, 2004; WOOLF, 2004b).

As fibras aferentes de primeira ordem são classificadas em termos de estrutura, diâmetro e velocidade de condução. As fibras A β são mielinizadas, com diâmetro maior que 10 μ m e velocidade de condução de 30 - 100 m/s. As fibras aferentes A δ são pouco mielinizadas, variando em seu diâmetro entre 2,0 - 6,0 μ m e têm velocidade de transmissão de 12 - 30 m/s. Fibras não mielinizadas do tipo C possuem diâmetro entre 0,4 - 1,2 μ m e mostram uma velocidade de 0,5 - 2,0 m/s (ALMEIDA; ROIZENBLATT; TUFIK, 2004; COSTIGAN; WOOLF, 2000). As fibras A β , mielinizadas e de grande diâmetro, respondem a estímulos inócuos aplicados à pele, músculos e juntas. Elas contribuem para a percepção normal da qualidade dos estímulos, mas mesmo que não respondam diretamente a estímulos nocivos, a atividade dessas fibras não só modifica a percepção da dor, como também pode modulá-la (ANDREW; GREENSPAN, 1999; MATSUMOTO et al., 2008). Já os corpos celulares de pequeno e médio diâmetro dão origem à maioria dos nociceptores, incluindo fibras C e do tipo A δ , atuando diretamente sobre na percepção e condução dos estímulos nociceptivos (COSTIGAN; WOOLF, 2000).

Estímulos nocivos que resultam em uma sensação de dor rápida e bem localizada em geral refletem a ativação de fibras A δ (que conduzem a dor primária, com estrita correlação com o estímulo e precisa localização espacial) e a nocicepção difusa e lenta, em queimação, é conduzida por fibras C (dor secundária, dor que continua mesmo após o estímulo nocivo ter cessado, dor de difícil localização e relacionada ao sofrimento). A dor visceral frequentemente é pouco localizada, profunda e lenta. A lesão tecidual não é fundamental para que a dor visceral exista; ela pode resultar de uma distensão excessiva (JULIUS; BASBAUM, 2001).

O processamento neural dos sinais nocivos que levam à experiência da dor ocorre em muitos passos. O primeiro deles é a transdução, processo em que os nociceptores fazem a conversão dos estímulos nociceptivos químicos, mecânicos ou térmicos em atividade elétrica nos terminais nervosos periféricos. Esse processo envolve ainda a condução, que é a

passagem dos potenciais de ação que são transmitidos das fibras nervosas periféricas para o SNC (BESSOU; PERL, 1969).

O segundo estágio de processamento do sinal nociceptivo é a transmissão. As aferências das fibras nociceptivas terminam nas camadas superficiais da coluna posterior da medula espinhal, lá elas transmitem o sinal gerado na periferia através da liberação de neurotransmissores específicos. O principal neurotransmissor excitatório neste sítio medular é o glutamato, que pode interagir com receptores de aminoácidos excitatórios do tipo NMDA (N-metil-D-asparto) e não NMDA. Além deste, outros neuropeptídeos, como substância P (SP), neurocinina A (NKA), o peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP), têm papel importante no processo da neuromodulação nociceptiva (KIDD; URBAN, 2001; SCHAIBLE; RICHTER, 2004).

A modulação é o terceiro passo do processamento do estímulo nociceptivo. Este evento representa alterações que ocorrem no sistema nervoso em resposta a estímulos nocivos. A transmissão do sinal da dor é modulada por tratos descendentes inibitórios e excitatórios, que podem atuar em fibras aferentes primárias ou ter ação em fibras pós-sinápticas ou em interneurônios presentes na coluna posterior da medula espinhal. Os tratos descendentes inibitórios se originam de núcleos presentes no tronco cerebral e são modulados por neurotransmissores como serotonina, noradrenalina, acetilcolina, ácido γ -aminobutírico (GABA), glicina e opióides (JULIUS; BASBAUM, 2001; MILLAN, 2002; REN; DUBNER, 2002).

Além dos estímulos elétricos e da liberação de neurotransmissores no processo nociceptivo, a lesão tecidual que ocasionou a sensibilização leva à síntese e liberação de substâncias que induzem a inflamação, a formação de edema, a vasodilatação e a migração de células como parte da resposta inflamatória e do processo de recuperação. Estes mediadores também ativam e sensibilizam os nociceptores e recrutam outros para exacerbar o sinal de dor. Tais mediadores químicos incluem aminoácidos excitatórios, óxido nítrico (NO), bradicinina, prostaglandinas, histamina, substância P e fator de crescimento neural (NGF) (WINKELSTEIN, 2004). Os mediadores inflamatórios contribuem para mudanças na permeabilidade vascular, resultando em edema e eritema (rubor) (ITO; OKUDA-ASHITAKA; MINAMI, 2001). A sensibilização dos nociceptores diminui o limiar de ativação e aumenta a probabilidade de que estes disparem com estímulos de menor intensidade levando a hipernocicepção, o sintoma mais importante de um processo inflamatório (DWORKIN et al., 2003; HOLDEN; PIZZI, 2003; KIDD; URBAN, 2001).

A classificação do processo doloroso é diversificada e depende do critério adotado. A hipernocicepção pode ser caracterizada segundo critérios temporais em transitória, aguda ou crônica. Na hipernocicepção transitória ocorre ativação dos nociceptores independente da existência de dano tecidual, sendo responsável pela proteção do organismo frente a danos físicos (LOESER; MELZACK, 1999). A nocicepção aguda ocorre a partir da estimulação nociceptiva excessiva, originando sensação intensa e desagradável envolvendo, lesão tecidual. Por outro lado, a nocicepção crônica geralmente ultrapassa o tempo de recuperação do organismo, ou seja, esse tipo de dor pode não desaparecer mesmo quando a lesão inicial foi resolvida, persistindo por meses ou anos, comprometendo a qualidade de vida do indivíduo (BRENNAN; CARR; COUSINS, 2007; COSTIGAN; SCHOLZ; WOOLF, 2009).

Dependendo da intensidade e duração do estímulo doloroso, podem ainda ocorrer alterações adaptativas (neuroplasticidade, sensibilização, perda do controle inibitório da dor e reorganização do circuito neuronal da coluna posterior) e de facilitação e inibição descendente da dor (BESSON, 1999; WOOLF; SALTER, 2000). Após a ocorrência de um dano tecidual significativo, observa-se aumento na sensibilidade de nociceptores aferentes primários no sítio da lesão, com consequente aumento na excitabilidade dos neurônios da coluna posterior da medula espinhal. Os mediadores químicos produzidos na inflamação são responsáveis pelos eventos que ocorrem durante este processo, incluindo a hiperalgesia, alterações no fenótipo celular, e a expressão de neurotransmissores, enzimas, canais iônicos e receptores em todo sistema nervoso (KIDD; URBAN, 2001).

2.4.2 Hipernocicepção aguda

Frequentemente o processo inflamatório está presente tanto na dor aguda quanto na dor crônica, sendo este, resultado da lesão tecidual, reatividade imune anormal ou lesão nervosa (STEIN; SCHAFER; MACHELSKA, 2003).

Modificações funcionais da excitabilidade neuronal são induzidas por mediadores inflamatórios liberados diretamente pelas células danificadas ou pelo reconhecimento de um elemento estranho ao organismo por células residentes. Dessa forma, quando se refere aos nociceptores, não apenas refere-se às suas extremidades periféricas, mas sim à fibra neuronal inteira, pois a hipernocicepção é um fenômeno que envolve todo o neurônio sensorial (FERREIRA, 2002).

Os mediadores inflamatórios liberados durante a resposta imune inata podem ser divididos em dois grupos: os mediadores hiperalgésicos intermediários e os mediadores

hiperalgésicos finais. Os primeiros são liberados no início e durante a inflamação, sendo responsáveis pela liberação de outros mediadores intermediários. Já os mediadores hiperalgésicos finais interagem com seus receptores específicos nos neurônios aferentes primários, promovendo as modificações moleculares responsáveis por sua sensibilização. Estes (entre os quais se encontram as prostaglandinas e as aminas simpáticas) atuam em receptores nos neurônios nociceptivos e sua ativação estimulará vias de sinalização intracelular como a da adenosina monofosfato cíclico (AMPc) e das proteínas quinases A (PKA) e C (PKC), levando à sensibilização neuronal (VERRI JR. et al., 2007).

Entre os mediadores intermediários, podem-se destacar as citocinas e as quimiocinas como os mediadores mais característicos da dor inflamatória. As citocinas mais importantes no que se refere à hipernocicepção são o fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α), a interleucina (IL) 1 e a IL-8. A IL-1 β e a IL8 liberam, respectivamente, os mediadores finais prostaglandinas e as aminas simpatomiméticas. É interessante notar que, dependendo do cenário experimental ou inflamatório, mediadores intermediários também podem comportar-se como mediadores finais (CUNHA et al., 1991; CUNHA et al., 1992).

2.4.3 Hipernocicepção crônica

Vários modelos experimentais têm sido propostos para o estudo de dor persistente, incluindo a dor de câncer (KURASHI et al., 2003; LEE et al., 2005; LUGER et al., 2002; SASAMURA et al., 2002; SCHWEI et al., 1999; SHIMOYAMA et al., 2005; ZHANG et al., 2003) e a dor neuropática (BENNETT; XIE, 1988; KIM; CHUNG, 1992; SELTZER; DUBNER; SHIR, 1990). A dor neuropática pode surgir como resultado de lesão a um nervo periférico (amputações), infecções (neuralgia pós-herpética), compressão de nervos (acidentes, cirurgias, tumores), distúrbios cardiovasculares (infarto e acidente vascular cerebral), distúrbios metabólicos (neuralgia diabética), doença viral (herpes zoster), neurotoxicidade farmacológica (quimioterapia antineoplásica), doença inflamatória, por mecanismos imunológicos (esclerose múltipla) ou ser idiopática (CHONG; BAJWA, 2003; GALLUZZI, 2007; MACFARLANE et al., 1997; SERRA, 1999; ZIMMERMANN, 2001).

Vários fenômenos estão envolvidos na origem desse tipo de dor, entre eles estão: a sensibilização de receptores, ocorrência de focos ectópicos de potenciais de ação em fibras periféricas, atividade anormal das estruturas supressoras e de processamento central da parte aferente (sensitiva), liberação de substâncias algio gênicas teciduais, liberação de neurotransmissores excitatórios, inflamação neurogênica e outros fenômenos de ordem física,

psíquica e neurovegetativa (BRIDGES; THOMPSON; RICE, 2001; WOOLF; MANNION, 1999).

Na dor neuropática, a sensação dolorosa persiste após a retirada do estímulo nociceptivo, podendo ocorrer mesmo quando este é indetectável (CHONG; BAJWA, 2003; MACFARLANE et al., 1997). Isto se dá em função de alterações nos neurônios e nas fibras que conduzem o impulso nociceptivo. Ocorrem os mecanismos de sensibilização periférica e central. Esses mecanismos envolvem a liberação de mediadores químicos no local da lesão e nas regiões do SNC relacionadas, o que intensifica a transmissão nociceptiva. A partir da sensibilização podem surgir alterações sensoriais características da dor patológica que são observadas através da existência de hiperalgesia e alodinia (BRIDGES; THOMPSON; RICE, 2001).

Os mecanismos periféricos de dor neuropática envolvem o disparo de descargas ectópicas pelas fibras nervosas lesadas. Essa atividade elétrica alterada ocorre também nas fibras do tipo A β , que em situações fisiológicas conduzem informações referentes à sensibilidade mecânica inócua. Essas descargas podem ocorrer devido à alteração na expressão de canais iônicos nas fibras nervosas danificadas e nos corpos celulares no gânglio da raiz dorsal e ainda pela liberação de mediadores inflamatórios no local da lesão, tais como bradicinina e a serotonina, os quais ativam e sensibilizam os neurônios aferentes primários (SCHAIBLE; RICHTER, 2004; ZIMMERMANN, 2001).

Assim, a transmissão da informação nociceptiva é gerada pela alteração na excitabilidade dos terminais sensoriais. No entanto, outras regiões do neurônio sensorial primário, e mesmo células pós-sinápticas da coluna posterior da medula espinhal, ou de ordem superior, podem contribuir para a fisiopatologia da dor neuropática. Essas alterações no SNC ocorrem devido ao fenômeno de sensibilização central (WOOLF; MANNION, 1999; ZIMMERMANN, 2001). Isto pode ocorrer pela estimulação repetitiva das fibras C, que produz uma sensibilização dos neurônios de segunda ordem, com redução no seu limiar de ativação, levando à ocorrência de atividade espontânea (CORTELLI; PIERANGELI, 2003).

A liberação de SP e NKA na medula espinhal e a superexpressão de receptores NMDA também parecem ser importantes na indução da sensibilização central (MACFARLANE et al., 1997). Estes neuropeptídeos ligam-se a receptores taquicinérgicos NK1 e NK2, disparando a liberação de cálcio intracelular, que leva à excitabilidade neuronal, deslocando o íon magnésio que bloqueia fisicamente o canal do receptor NMDA. Uma vez desbloqueado, a ativação do receptor NMDA por aminoácidos excitatórios, como o glutamato, leva a um influxo de cálcio e sódio para a célula, aumentando ainda mais a

excitabilidade neuronal. Além disso, o aumento da concentração intracelular de cálcio permite que este íon atue como segundo mensageiro em mecanismos que contribuem para a manutenção do estado de dor persistente (MACFARLANE et al., 1997; WOOLF; MANNION, 1999).

Quando se considera a complexidade do processo de dor neuropática, torna-se compreensível a dificuldade clínica encontrada no seu tratamento, uma vez que pouco se compreende sobre os mecanismos celulares e moleculares envolvidos no desenvolvimento e manutenção deste tipo de dor (ALEY; LEVINE, 2002; GALLUZZI, 2007; SAH; OSSIPOV; PORRECA, 2003).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais

Foram utilizados camundongos C57/Black 6J, machos, adultos, pesando entre 25 g e 30 g, provenientes do Biotério de Camundongos Isogênicos do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo e ratos Wistar machos pesando entre 160 g e 180 g. Os animais foram mantidos sob temperatura controlada (20 a 22 °C), ciclo claro/escuro de 12 h e alimentados com ração balanceada e água. Todos os procedimentos experimentais foram realizados de acordo com as normas do Comitê de Ética em Experimentação Animal do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo. Os ratos foram tratados de acordo com os princípios e diretrizes para o cuidado de animais de laboratório em estudos envolvendo dor (ZIMMERMANN, 1983).

3.2 Isolamento de peptídeos de tecido cerebral de camundongos

O isolamento de peptídeos de tecido de cérebro de camundongos foi realizado como descrito anteriormente (BERTI et al., 2009; CHE et al., 2001; CUNHA et al., 2008). Os animais foram eutanasiados por deslocamento cervical e posteriormente decapitados. Para interromper a atividade enzimática, os encéfalos foram dispostos no microondas por 7 s (potência *Medium High*) juntamente com dois béqueres contendo 50 mL de água. Após essa fase, os encéfalos foram transferidos para um tubo falcon contendo 10 mL de água a 80 °C, homogeneizados com o auxílio de um homogeneizador de tecidos (*Tissue Tearor*, Bio Spec Products Inc., Bartlesville, OK, USA) e mantidos em banho maria a 80 °C por 20 min.

Em seguida, os homogenatos foram resfriados a 4 °C para adição de 20 µL de HCl (Merck, Darmstadt, Alemanha) 5 M para concentração final de 10 mM. As amostras foram sonicadas (20 pulsos – 4 Hz de aproximadamente 1 s) e submetidas a centrifugação por 40 min a 1500 x g, 4 °C. O sobrenadante foi transferido para tubos de ultracentrífuga e centrifugado a 100.000 x g por 1 h a 4 °C. O sobrenadante foi filtrado em membrana Millipore que permite a passagem de moléculas com peso molecular inferior a 5 kDa (*Centrifugal Filter Unit*, MILLIPORE, 5.000 NMCO). O eluato (fração contendo moléculas < 5 kDa) foi purificado em pré-colunas OASIS (Waters), lavado com metanol (Merck, Darmstadt, Alemanha - 5% e eluído em metanol 100% + 0,15% de ácido trifluoracético (Merck, Darmstadt, Alemanha - TFA). O volume do material foi reduzido ao mínimo

(aproximadamente 5 µL) por centrifugação a vácuo (*Speed Vac*, Eppendorf do Brasil Ltda, São Paulo, SP, Brasil) e estocado a - 80 °C até o momento de uso.

3.3 Dosagem de peptídeos

Os peptídeos foram dosados pelo método fluorimétrico, utilizando-se o marcador fluorescamina (Invitrogen, Eugene, Oregon, USA - C₁₇H₁₀O₄) (CASTRO et al., 2010; CUNHA et al., 2008; SARIC; GRAEF; GOLDBERG, 2004). Este método consiste na ligação de uma molécula de fluorescamina às aminas primárias presentes nos resíduos de lisina (K) e no N-terminal dos peptídeos. Ao reagir com estes resíduos a molécula de fluorescamina emite fluorescência medida nos comprimentos de onda de 370 nm (excitação) e 480 nm (emissão). As concentrações de peptídeos nas amostras desconhecidas foram determinadas através de uma curva padrão utilizando o peptídeo 5A (Proteimax Biotecnologia, Cotia, SP, Brasil - LTLRTKL) como padrão.

Para a realização desses experimentos, foi utilizada uma placa branca opaca de 96 poços (Corning Incorporated, NY, USA). Em cada poço misturou-se 2,5 µL de amostra, 25 µL de tampão fosfato 0,2 M (pH 6.8) e 12,5 µL de solução de fluorescamina 0,3 mg/mL diluída em acetona (Merck, Darmstadt, Alemanha). Após a aplicação de todas as amostras, deixou-se a placa no agitador por 1 min, quando foi acrescentado 110 µL de água. A fluorescência foi medida nos comprimentos de onda 370 nm (excitação) e 480 nm (emissão).

3.4 Expressão das proteínas recombinantes

A expressão das proteínas recombinantes EP24.15 de testículo de rato (selvagem ou mutada - E474A cataliticamente inativa) ou 14-3-3ε de cérebro de rato foi feita em *E. coli* e a purificação foi realizada como descrito anteriormente (RIOLI et al., 1998). Colônias de *E. coli* XL1-blue transformadas com o vetor pGEX4T-2 contendo o cDNA de interesse, foram repicadas em meio LB-ágar (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) contendo ampicilina (Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemanha - 50 µg/mL). Uma colônia isolada foi escolhida, e transferida para um tubo de 50 mL, contendo 5 mL de meio LB (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) e ampicilina (50 mg/mL). Após crescimento a 37 °C sob agitação (250 rpm) durante 8 h, essa cultura foi transferida para 50 mL de meio LB e ampicilina (50 µg/ml). Após incubação a 37 °C sob agitação (250 rpm) durante 16 h, a cultura de bactérias foi transferida para 4 L de meio LB, onde deixou-se crescer até atingir um valor de absorbância a 600 nm entre 0,6 e 0,7. A

temperatura foi reduzida para 30 °C, e adicionou-se 0,5 mM de isopropil- β -D-galactopiranosídeo (Fermentas, Vilnius, Lituânia - IPTG) como indutor da expressão das proteínas. Após 4 h de indução, o processo foi interrompido e as culturas foram submetidas à centrifugação (5.000 x g durante 20 min) para sedimentação das bactérias e descarte do sobrenadante. Os *pellets* foram ressuspensos em 150 mL de tampão PBS (tampão fosfato-salina) 0,15 M, pH 7,4, incubados durante 20 min na presença de lisozima (Amresco, Solon, OH, USA - 10 mg/mL), a temperatura ambiente, e então submetidos a 3 ciclos de sonicação de 40 s à 40 Hz em gelo, com intervalo de 1 min entre eles. O homogenato obtido foi centrifugado a 5.000 x g por 30 min a 4 °C, sendo o sobrenadante removido cuidadosamente e incubado com a resina glutationa-Sepharose (GE Healthcare, Uppsala, Suécia), previamente equilibrada em tampão PBS 0,15 M pH 7,4, durante 30 min em temperatura ambiente, sob rotação horizontal branda. A resina foi removida do sobrenadante por centrifugação a 500 x g, por 5 min, e transferida para uma coluna de cromatografia. Na coluna a resina foi lavada exaustivamente com tampão de lavagem (50 mM Tris, pH 7,4 contendo 150 mM NaCl - Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemanha) e em seguida com tampão de lavagem + cálcio (50 mM Tris, pH 7,4, contendo 50 mM NaCl e 2,5 mM CaCl_2 - Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemanha). A seguir foram adicionados 100 U de trombina (Amersham Biosciences, USA) por mL de resina, e foi feita a incubação por 18 h, a temperatura ambiente em rotação horizontal, para remoção da proteína de interesse. A proteína recombinante livre foi eluída da coluna em tampão 50 mM Tris, pH 7,4, contendo 150 mM NaCl. Para eliminação da trombina e concentração das amostras, foi feita filtração em membranas de exclusão molecular (Centrifugal Filter Unit 50.000 NMCO). As proteínas obtidas, após quantificação pelo método de Bradford, foram submetidas a eletroforese em SDS-PAGE para análise da pureza, conforme descrito anteriormente (RIOLI et al., 2003; RIOLI et al., 1998).

3.5 Síntese dos marcadores isotópicos TMABs (4-trimetil-amônio-butiril)

Os marcadores isotópicos TMABs, utilizados nos experimentos de espectrometria de massas, foram sintetizados como descrito anteriormente (MORANO; ZHANG; FRICKER, 2008).

Os reagentes ácido γ -aminobutírico (GABA), iodeto de metila ou um de seus isótopos deuterados, N-hidroxisuccinimida (NHS), dicitclohexilcarbodiimida (DCC) e bicarbonato de potássio foram comprados da empresa Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemanha. Os solventes

clorofórmio, tetra-hidrofurano (THF) e acetonitrila foram comprados da empresa Merck, Darmstadt, Alemanha.

A síntese foi realizada em duas etapas. A primeira foi a alquilação do ácido γ -aminobutírico (GABA), utilizando iodeto de metila ou um de seus isótopos deuterados. Isto gerou um sal de iodeto de trimetilamônio, que foi lavado com clorofórmio e depois convertido para o sal de cloreto pela acidificação com HCl. A segunda foi a ativação do ácido pela formação do éster N-hidroxisuccinimida (NHS), utilizando-se diciclohexilcarbodiimida (DCC).

Na primeira etapa da síntese foi produzido o cloreto de 3-carboxipropil trimetilamônio (D_0 -TMAB ácido). Ácido γ -aminobutírico (GABA - 2,23 g, 21,6 mmol) e bicarbonato de potássio (10,0 g, 99,9 mmol) foram combinados em 250 mL de metanol sob agitação e atmosfera de N_2 . Após 15 min, 6,9 mL de iodeto de metila D_0 (aproximadamente 16 g, 110 mmol) foram adicionados. A reação foi agitada por 66 h à temperatura ambiente. Em seguida, o solvente foi removido por evaporação sob pressão reduzida a 55 °C. O sólido branco resultante foi lavado quatro vezes com 50 mL de clorofórmio. O sólido foi então dissolvido em 50 mL de uma solução de 3:1 água / HCl, seguida da remoção de água por evaporação sob pressão reduzida e calor moderado (60 - 65 °C). O resíduo laranja resultante foi colocado sob alto vácuo para secagem. Após 2 h o resíduo âmbar foi extraído quatro vezes com 60 mL de acetona. A acetona foi removida por evaporação sob pressão reduzida a 55 °C, gerando um resíduo oleoso âmbar. Em seguida, 150 mL de tetra-hidrofurano (THF) anidro foi adicionado, e a mistura foi resfriada a 0 °C por 30 min. O sólido resultante foi filtrado e lavado novamente com THF, e então seco sob vácuo. A reação produziu 2,21 g (12,14 mmol, 56,87% de rendimento) de TMAB ácido D_0 . Os TMABs ácidos D_3 e D_9 foram sintetizados seguindo o mesmo método.

Na segunda etapa da síntese foi produzido o cloreto de [3-(2,5-dioxo-pirrolidina-1-iloxicarbonil)-propil] trimetilamônio (TMAB-NHS). O TMAB ácido D_0 (2,21 g, 12,14 mmol) foi dissolvido em 250 mL de acetonitrila anidra e resfriado a 0 °C. N-hidroxi-succinimida (NHS - 2,38 g, 20,74 mmol, 1,7 equiv) foi adicionado sob agitação, seguido por diciclohexilcarbodiimida (DCC) (4,70 g, 21,79 mmol, 1,9 equiv). A reação foi mantida à temperatura ambiente durante 16 h e então novamente resfriada a 0 °C. A mistura foi filtrada, o sólido foi descartado, e a acetonitrila foi evaporada sob pressão reduzida. Adicionou-se ao composto 125 mL de THF e resfriado a 0 °C por 1 h. O sólido branco resultante foi filtrado e seco sob vácuo. Para avaliar a eficiência da síntese foi realizado um experimento teste de marcação isotópica de uma solução contendo 21 peptídeos sintéticos listados na Tabela 1. A

marcação isotópica de peptídeos foi realizada conforme descrito anteriormente (MORANO; ZHANG; FRICKER, 2008). Foram preparadas quatro corridas, sendo a primeira uma corrida (corrida 1) controle utilizando-se marcadores isotópicos antes testados, cedidos pelo Prof. Dr. Lloyd Fricker (Albert Einstein College of Medicine, Bronx, New York) e outras três corridas para a avaliação dos novos marcadores. Dessas três corridas com marcadores novos, duas foram feitas com curva de concentração de peptídeos (corrida 2 e corrida 4) e uma com concentração constante (corrida 3).

Tabela 1 - Peptídeos sintéticos utilizados nos experimentos teste de marcação isotópica

	Sequência dos peptídeos	massa molecular
1	ELFADKVPKTAENFR	1765
2	GDVNTDRPGLLDL	1384,5
3	AIRDIDLKNR	1213,4
4	HDSFLKAVPSQKRT	1613,8
5	RGGPPFAFVEF	1223,4
6	GAIRDIDLKNR	1270,4
7	VFDVELL	834,4
8	VFDVELLKLE	1204,4
9	KVDNLTY	851,9
10	KGNDISSGTVL	1090,5
11	GISTPEELGLDKV	1357,5
12	SPQLEDEAKEL	1258,3
13	SAMTEEA AVAIKAMAK	1621,9
14	AVAIKAMAK	902,1
15	SAMTEEA AVAIK	1220,4
16	NAAGHLDDLPGALSSDL	1850
17	AGHLDDLPGALSAL	1349,5
18	AGHLDDLPGALSA	1236,3
19	AAGHLDDLPGALSSDLH	1873
20	KGPGPGGGPGGAGGARGGGGPSGD	1904,9
21	AKADGIVSKNF	1149,6
22	KADGIVSKN	931,5

Corridas:

1) TMABs cedidos pelo Prof. Dr. Lloyd Fricker

D₀ – 25 nM de cada peptídeo em 300 µL

D₃ – 25 nM de cada peptídeo em 300 µL

D₉ – 25 nM de cada peptídeo em 300 µL

2) TMABs novos

D₀ – 12,5 nM de cada peptídeo em 300 µL

D₃ – 25 nM de cada peptídeo em 300 µL

D₉ – 50 nM de cada peptídeo em 300 µL

3) TMABs novos

D₀ – 25 nM de cada peptídeo em 300 µL

D₃ – 25 nM de cada peptídeo em 300 µL

D₉ – 25 nM de cada peptídeo em 300 µL

4) TMABs novos

D₀ – 50 nM de cada peptídeo em 300 µL

D₃ – 12,5 nM de cada peptídeo em 300 µL

D₉ – 25 nM de cada peptídeo em 300 µL

3.6 Ensaio de captura de substrato (ECS)

As amostras do extrato de peptídeos do cérebro de camundongos foram incubadas com EP24.15 inativa (grupo experimental) ou com EP24.15 inativa denaturada (grupo controle). Os complexos enzima(1,15 µmol - 90 µg)-peptídeo(3,75 µg/µL - 50 µg) foram produzidos incubando-se o extrato peptídico com a EP24.15 inativa em 100 µL de tampão (25 mM Tris-HCl, 125 mM NaCl, 0,1% albumina do soro bovino, pH 7,5) por 1 h em temperatura ambiente. Em seguida, a essa mistura foi filtrada em coluna Sephadex G-25 (Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemanha, previamente lavada, equilibrada com 25 mM Tris-HCl, 125 mM NaCl e seca por centrifugação) e centrifugada a 1.000 x g por 2 min (BERTI et al., 2009; CUNHA et al., 2008; RIOLI et al., 2003). O fluxo de 100 µL passado pela coluna foi coletado, e o conteúdo peptídico foi marcado com os marcadores isotópicos D₀-, D₃-, D₆- e D₉-TMABs (4-trimetil-amônio-butilil) (CHE; FRICKER, 2002; MORANO; ZHANG; FRICKER, 2008). O marcador D₆ foi cedido pelo Prof. Dr. Lloyd Fricker (Albert Einstein College of Medicine, Bronx, New York).

3.7 Marcação isotópica

A marcação isotópica de peptídeos foi realizada conforme descrito anteriormente (CHE; FRICKER, 2002; MORANO; ZHANG; FRICKER, 2008). Esse procedimento permite a análise semi-quantitativa do conteúdo peptídico isolado utilizando as oligopeptidases inativas, facilitando assim a identificação dos peptídeos ligantes em relação ao conteúdo total. Os reagentes bicarbonato de amônio (NH₃HCO₄), fosfato de sódio (NaHPO₄), hidróxido de sódio (NaOH), glicina, hidroxilamina foram comprados da empresa Sigma-Aldrich,

Steinheim, Alemanha. O solvente dimetilsulfóxido (DMSO) foi comprado da empresa Merck, Darmstadt, Alemanha. Foram utilizados quatro TMABs para a marcação dos grupos controle (enzima denaturada) e experimental (forma cataliticamente inativa da enzima). O grupo controle foi marcado com D₀ e D₆ e o grupo experimental foi marcado com D₃ e D₉.

As amostras foram reconstituídas em 300 µL de tampão bicarbonato de amônio (NH₃HCO₄, 25 mM), o pH foi ajustado para 9,5 com tampão fosfato de sódio (NaHPO₄; 0,4 M). Para cada amostra, foram adicionados 6,4 µL de uma solução 350 µg/µL de D₀-TMAB, D₃-TMAB ou D₉-TMAB dissolvido em dimetilsulfóxido (DMSO). Após 8 min a temperatura ambiente, uma solução de NaOH 1 M foi usada para ajustar o pH da reação para 9,5 e novamente a amostra foi deixada a temperatura ambiente por 8 min. A adição dos reagentes marcadores (D₀, D₃ ou D₉ TMAB) e do NaOH foi repetida por mais sete vezes, mantendo-se os mesmos intervalos de tempo entre uma adição e outra. Após o término da marcação, a mistura foi incubada a temperatura ambiente por 30 min, quando 30 µL de uma solução de glicina 2,5 M foram adicionados interrompendo a reação de marcação isotópica.

Após 40 min a temperatura ambiente, as amostras, agora marcadas com D₀-, D₃- ou D₉-TMAB, foram combinadas e centrifugadas a 800 x g, a 4 °C, por 5 min. O sobrenadante foi coletado e o pH ajustado para 9,0 com uma solução de NaOH 1 M. Nesse momento adicionou-se hidroxilamina 2 M (na proporção de 3 µL para 1 mL de amostra), para remover possíveis marcações em resíduos de tirosina. A adição de hidroxilamina e o ajuste do pH para 9,0 foram repetidos por 3 vezes, respeitando um intervalo de 10 min entre estas repetições.

Essas amostras foram submetidas à dessalinização em colunas C18 (OASIS - Millipore) e os peptídeos marcados foram eluídos com 1 mL de metanol contendo 0,15% de TFA. Para remoção do metanol as amostras foram submetidas à centrifugação a vácuo e armazenadas a -80 °C.

3.8 Cromatografia Líquida Acoplada à Espectrometria de Massas (LC-MS/MS)

Para detectar e quantificar os peptídeos, as amostras de peptídeos marcados com diferentes isótopos foram submetidas a análise por Cromatografia Líquida Acoplada à Espectrometria de Massas (LC-MS/MS) em um espectrômetro Synapt HDMS equipado com uma fonte de *nanoelectrospray* (Waters Co., Milford, MA, USA).

A mistura de peptídeos foi dessalinizada durante 15 min usando-se uma coluna Symmetry C18 (partículas de 5 µm, 180 µm de diâmetro interno, 20 mm de comprimento; Waters Co., Milford, MA, USA). A mistura de peptídeos foi subsequentemente separada por

eluição em gradiente de 0 - 85% de uma mistura água/acetonitrila contendo 0,1% de ácido fórmico (Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemanha), através de uma coluna BEH 130-c18 (partículas de 1,7 μ M, 100 μ m de diâmetro interno, 100 mm de comprimento; Waters Co., Milford, MA, USA). Os dados foram adquiridos em modo de dados-dependente (DDA) após geração de múltiplos peptídeos protonados por ionização em *electrospray* (ESI), seguido de dissociação em MS/MS por colisão com argônio em intensidade de 10 a 30 eV. Condições típicas de LC e ESI foram: fluxo de 10 nL/min, voltagem no capilar do nanofluxo de 3,5 kV, temperatura do bloco de 100 °C, e voltagem do cone de 100 V (CASTRO et al., 2010).

3.9 Análises dos dados de LC-MS/MS

Para identificar os peptídeos, os arquivos brutos (raw) gerados pelo equipamento foram convertidos em arquivos no formato de texto (mgf) pelo programa Mascot Distiller versão 2.1.1 (Matrix Science Ltd., London, UK). As análises de sequenciamento dos peptídeos foram realizadas através do programa MASCOT versão 2.2 (Matrix Science Ltd., London, UK). As modificações variáveis foram selecionadas como GIST- Quat (K) e GIST – Quat (N-term) para sequenciamento dos peptídeos contendo D₀-TMAB, GIST- Quat: 2H(3) (K) e GIST – Quat: 2H (3) (N-term) para sequenciamento dos peptídeos contendo D₃-TMAB, GIST- Quat: 2H(6) (K) e GIST – Quat: 2H (6) (N-term) para sequenciamento dos peptídeos contendo D₆-TMAB e GIST-Quat: 2H(9) (K) e GIST-Quat: 2H(9) N-term para o sequenciamento de peptídeos contendo D₉-TMAB. Foi realizada a submissão dos dados para o Mascot, utilizando-se o banco de dados NCBI (data da busca 10/11/2009) com a taxonomia *Mus musculus*, e sem digestão enzimática. A tolerância do erro utilizada para os íons precursores de MS e MS/MS foi de 0,2 Da. Após a obtenção dos resultados, as sequências peptídicas foram validadas por interpretação manual para a eliminação dos resultados falsos positivos. A quantificação foi realizada pela medida da intensidade dos íons precursores dos espectros de MS marcados com D₀-, D₃-, D₆- ou D₉-TMAB. Para estas análises foram utilizados os picos monoisotópicos e os picos contendo 1 e 2 átomos de ¹³C. Múltiplos *scans* de espectros de MS foram combinados para cada quantificação.

3.10 Ensaios de competição entre AGH e o peptídeo FRET (transferência de energia de ressonância de fluorescência) Abz-GGFLRRV-EDDnp na presença da EP24.15 ou EP24.16

Foi realizada uma reação de cinética de ordem zero, para verificar se o peptídeo AGH (Proteimax Biotecnologia, Cotia, SP, Brasil) seria capaz de competir com a degradação do substrato FRET (transferência de energia de ressonância de fluorescência - *fluorescence resonance energy transfer*) Abz-GGFLRRV-EDDnp (onde Abz é o-aminobenzoil; e EDDnp é N-(2,4-dinitrofenil)- etilenodiamina – Anaspec, San Jose, CA, USA) na presença da EP24.15 ou EP24.16 (GRAVI et al., 2012; MACHADO et al., 2007; PASCHOALIN et al., 2007). Para cada reação, uma solução de peptídeo (1 e 25 μM) foi incubada na presença da EP24.15 (1 nM) ou EP24.16 (0,3 nM) e do substrato FRET Abz-GGFLRRV-EDDnp (10 μM) em tampão TBS (tris-salina). Estas reações foram feitas em triplicatas em uma placa branca opaca de 96 poços, em volume final de 100 μL por poço. As leituras da fluorescência foram realizadas em espectrofluorímetro (SpectraMax M2e plate reader, Molecular Devices, USA), a cada 60 s, a 25 °C e os resultados foram expressos como unidades arbitrárias de fluorescência (UAF)/min (RIOLI et al., 1998).

3.11 Hidrólise do peptídeo com EP24.15 ou EP24.16

Uma solução de 100 μM do peptídeo AGH (que foi identificado no ensaio de captura de substrato - ECS) foi incubada na presença de 2,5 nM de EP24.15 ou EP24.16 recombinantes, em um volume final de 500 μL (tampão tris-salina - TBS). Como controle destes experimentos, foi realizado o mesmo procedimento para bradicinina (100 μM), que é um substrato padrão das EP24.15 e EP24.16 e os peptídeos JA2 (15 μM) (SMITH et al., 2000) e Pro-Ile (5 mM) (DAUCH; VINCENT; CHECLER, 1991) que são inibidores competitivos da EP24.15 e EP24.16, respectivamente. Foram preparados tubos contendo 5 μL de ácido trifluoracético (TFA) 50%, os tubos foram colocados em banho-maria a 37 °C. Para determinação do percentual de hidrólise dos peptídeos, uma alíquota de 100 μL de cada reação foi retirada nos tempo 0 min, 15 min, 30 min e 60 min. Estas alíquotas foram transferidas para tubos, contendo 5 μL de uma solução de TFA 50% em H_2O , para o encerramento da reação.

Posteriormente, 50 μL de cada uma destas amostras foi analisado por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) para detecção dos picos cromatográficos e cálculo do percentual de hidrólise de cada peptídeo, em relação à área dos seus respectivos picos cromatográficos no tempo 0 min (BERTI et al., 2009; RIOLI et al., 1998).

3.12 Interação proteína-proteína e peptídeo-proteína

Os ensaios de interação proteína-proteína e peptídeo-proteína foram realizados por Ressonância Plasmônica de Superfície a 25 °C em um equipamento BIAcore T100 (GE Healthcare, Uppsala, Suécia) com HBS-EP+ Ca^{2+} (5 mM - GE Healthcare, Uppsala, Suécia) como tampão de corrida em fluxo constante de 30 $\mu\text{L}/\text{min}$ por 180 s. A proteína 14-3-3 ϵ foi imobilizada em um sensor chip CM5. Esse sensor chip contém cadeias de dextrano carboximetilado covalentemente ligadas à superfície de ouro. A proteína se liga a essa superfície através de ligações amina nas nanopartículas de ouro estabilizadas com 2,4,6-trimercapto-1,3,5-triazina presentes nesse sensor chip (PATTNAIK, 2005). Foram avaliadas as interações entre a proteína 14-3-3 ϵ e EP24.15, na presença e na ausência de AGH, como também a interação direta entre 14-3-3 ϵ e AGH. Foram utilizadas concentrações crescentes de AGH de 1 a 100 μM .

3.13 Experimentos de ligação cruzada - interação entre a proteína 14-3-3 ϵ e o peptídeo AGH

Os estudos de ligação cruzada foram desenvolvidos em colaboração com o grupo Dalton de Espectrometria Massas, da Unicamp, sob liderança do Prof. Dr. Fabio Cesar Gozzo. Inicialmente foram realizados testes de otimização das razões molares entre a proteína 14-3-3 ϵ , e o peptídeo AGH, uma vez que neste experimento também se buscou determinar a estequiometria do complexo e a região de interação, e desta forma, deve-se evitar o emprego de grandes excessos das espécies envolvidas, o que pode resultar em artefatos de concentração. O experimento de ligação cruzada com o agente de ligação cruzada (ALC) suberato de N-N-disuccinimidila (Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemanha - DSS) foi realizado após a incubação da 14-3-3 ϵ com o peptídeo AGH, na proporção 1:5 por duas horas a temperatura ambiente. Foi utilizado um excesso de 100 x do ALC. A amostra foi então analisada por espectrometria de massas, onde foi obtido um espectro de massas das espécies intactas. Uma alíquota desta amostra foi digerida com tripsina e analisada por espectrometria de massas. Os espectros das espécies foram verificados manualmente, e com base nas restrições de distâncias impostas pelo DSS, foi proposto o modelo de interação.

3.14 Dicroísmo circular

A estrutura secundária da proteína 14-3-3 ϵ na presença e na ausência do peptídeo AGH foi avaliada por espectroscopia de dicroísmo circular utilizando-se um espectropolarímetro Jasco J-810 e caminho ótico de 0,01 cm. A calibração do instrumento foi verificada com uma solução aquosa de ácido d-10-canforsulfônico (Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemanha), e os espectros foram coletados numa janela de comprimento de onda de 190 a 260 nm, em intervalos de 0,5 nm, tempo de resposta de 0,5 segundos, velocidade de 20 nm/min para 5 varreduras. As leituras foram feitas a temperatura de 20 - 22 °C. As amostras foram preparadas em PBS diluído 1:5 (PBS tablets, Amresco, OH, USA) (RIOLI et al., 2003).

3.15 Atividade farmacológica

Os estudos de atividade farmacológica foram desenvolvidos em colaboração com o Laboratório de Neuromodulação e Dor experimental do Instituto de Ensino e Pesquisa do Hospital Sírio-Libanês, sob liderança da Dra. Camila Squarzon Dale.

3.15.1 Tratamentos farmacológicos

O antagonista inespecífico para receptores opióides cloridrato de naloxona (1 μ g/pata), e os antagonistas específicos como D-Trp-Orn-Thr-Pen-Thr-NH₂ (CTOP - 20 μ g/pata), cloridrato de nor-binaltorfimina (nor-BNI - 50 μ g/pata) e N,N-dialil-Tyr-Aib-Aib-Phe-Leu (ICI 174,864 - 10 μ g/pata), para receptores opióides do tipo μ (MOR), κ (KOR) e δ (DOR), respectivamente foram comprados da Sigma Aldrich (USA). Estes compostos foram diluídos em solução salina estéril e injetados por via intraplantar na pata traseira direita 1 h antes da administração intraplantar de 0,1 mL de salina estéril contendo carragenina (200 μ g/pata Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA).

3.15.2 Hipernocicepção mecânica do membro posterior

Para avaliar atividade antinociceptiva do AGH, foi realizado o teste de Randall e Selitto de pressão crescente na pata de ratos (RANDALL; SELITTO, 1957). Para a execução deste teste utilizou-se analgesímetro (Insight®, SP, Brasil), que gera aumento linear da força

(16 g/s) sobre a superfície dorsal da pata do animal até que esse retire a pata. O reflexo de retirada da pata é considerado representativo do limiar nociceptivo. A pressão necessária para que esse animal exiba tal resposta é registrada em gramas. Os subgrupos 0 h e 3 h de cada grupo experimental correspondem ao limiar nociceptivo dos mesmos animais antes e depois dos tratamentos.

3.15.3 Hipernocicepção inflamatória

A hipernocicepção inflamatória foi induzida por administração intraplantar de carragenina na pata traseira direita. O limiar nociceptivo foi medido pelo teste de pressão na pata antes da administração da carragenina e 3 h após, que corresponde à resposta máxima hiperalgésica da carragenina. O AGH foi diluído em solução salina estéril e alíquotas de 0,1 mL contendo 10 µg ou 50 µg foram administradas por via intraplantar ou oral, respectivamente, concomitantemente com a injeção de carragenina. O possível envolvimento de receptores opióides foi avaliado usando-se o antagonista inespecífico cloridrato de naloxona ou antagonistas específicos como CTOP, nor-BNI e ICI 174,864.

3.15.4 Indução da hipernocicepção neuropática

Os ratos foram anestesiados com halotano (2,5%) e submetidos à constrição crônica no nervo isquiático (*chronic constriction injury* - CCI) pelo método de Bennett e Xie (1988). Nesse procedimento, o nervo isquiático da pata direita foi exposto na região mediana da coxa do animal por dissecação do músculo bíceps femoral. Próximo a trifurcação do nervo isquiático (aproximadamente 7 mm), o nervo foi solto do tecido aderente e foram realizadas 4 ligaduras (gut cromado 4.0) frouxas distantes entre si em aproximadamente 1 mm. As incisões foram suturadas em camadas usando o fio de sutura de seda (4-0). Como controle, ratos foram falsamente operados por exposição do nervo isquiático sem ligadura do nervo, compressão ou constrição. Esses ratos foram avaliados 14 dias após a cirurgia. Os animais controle da cirurgia foram submetidos a procedimentos semelhantes exceto que não foram colocadas ligaduras em torno do nervo (BENNETT; XIE, 1988). O AGH foi diluído em solução salina estéril e alíquotas de 0,1 mL contendo 1 µg ou 10 µg de peptídeo foram administradas por via intratecal ou intraperitoneal, respectivamente.

3.15.5 Procedimento para tratamento intratecal

Os animais foram anestesiados com halotano (2,5%) e após o aqueamento da coluna vertebral foi realizada a punção lombar, conforme descrito anteriormente (CHACUR et al., 2004; GRISEL; WATKINS; MAIER, 1996). Uma agulha estéril foi inserida entre as vértebras lombares L5 e L6. Imediatamente após a inserção foi observado o *flick* característico, indicando a entrada da agulha no espaço subaracnoideo da medula.

3.16 Ensaios de ligação de [³⁵S]GTPγS estimuladas por agonista

3.16.1 Preparação das membranas de estriado de rato

Os reagentes cloreto de magnésio (MgCl₂), ácido etileno glicol tetracético EGTA) e ditioneitol (DTT) foram comprados da empresa Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemanha. Para preparar as membranas de estriado, ratos Wistar foram sacrificados por decapitação. O cérebro foi removido imediatamente e dissecado no gelo. O tecido foi homogeneizado (Dounce *homogenizer*) em 250 μL de tampão do ensaio de ligação de [³⁵S]GTPγS (50 mM Tris-HCl, pH 7,4; 3 mM MgCl₂; 100 mM NaCl; 0,2 mM EGTA) suplementado com 1mM de ditioneitol (DTT) e coquetel de inibidores de protease (1 mL/100 mL, Sigma-Aldrich, P8340). A amostra foi centrifugada a 1.000 x g por 5 min. O sobrenadante foi lavado duas vezes por centrifugação a 40.000 x g por 10 min a 4 °C. O *pellet* resultante foi ressuspensão em 10 mL de tampão do ensaio de ligação de [³⁵S]GTPγS suplementado com 1mM de DTT. O *pellet* final foi ressuspensão em 750 μL de tampão do ensaio de ligação de [³⁵S]GTPγS e estocado a -80 °C em alíquotas de 100 μL (1 - 2 mg/mL). A concentração de proteína na amostra foi estimada pelo método ácido bicinonínico (BCA) (Pierce, Rockford, IL, USA) usando albumina do soro bovino (BSA) como padrão.

3.16.2 Ensaios de ligação de [³⁵S]GTPγS estimuladas por agonista

As membranas (20 μg/tubo) foram lavadas com o tampão do ensaio de ligação de [³⁵S]GTPγS e incubadas com o mesmo tampão contendo 100 μM GDP, 0,1 nM [³⁵S]GTPγS e 1 μM de DAMGO ([D-Ala²,N-Met-Phe⁴,Gly(ol)⁵]-encefalina), agonista de receptores opióides do tipo μ ou (6aR,10aR)- 9-(Hidroximetil)- 6,6-dimetil- 3-(2-metiloctan-2-il)- 6a,7,10,10a-tetrahidrobenzo[c]cromen-1-ol (HU-210, agonista de receptores canabinóides do

tipo 1) na presença e na ausência de 10 μM ou 50 μM de AGH em volume final de 1 mL. Após a incubação por 1 h a 30 °C, as membranas foram coletadas em filtros (Whatman GF/B - Schleicher and Schuell, Keene, NH, USA) com um coletor de células (Brandel, Gaithersburg, MD, USA), lavadas três vezes com Tris-HCl 50 mM, pH 7,4, gelado. E após incubação *overnight* em líquido de cintilação, a radioatividade foi detectada utilizando-se um contador de cintilação. Os experimentos foram feitos em triplicatas (GOMES; FILIPOVSKA; DEVI, 2003).

3.17 Identificação do peptídeo AGH em tecidos perfundidos

Vinte camundongos machos C57/Black6J com dois meses foram perfundidos com salina e posteriormente decapitados. As cabeças foram levadas ao microondas por sete segundos (potência *Medium-High*) com dois béqueres com 50 mL de água cada um. Os vinte cérebros foram dissecados em sete regiões: hipocampo, hipotálamo, bulbo olfatório, córtex fronto-temporal, estriado, mesencéfalo e cerebelo. Foram feitos dois *pools* de dez estruturas para cada região, totalizando catorze *pools* (duplicata de cada região). Os peptídeos de cada *pool* foram extraídos conforme descrito no item 3.2. A marcação isotópica de peptídeos foi realizada conforme descrito no item 3.7 e as análises por LC-MS/MS conforme os itens 3.8 e 3.9.

Para análise dos dados, foi considerada uma corrida com peptídeo sintético (25 nm e 75 nm) que foi usada como controle. As amostras inicialmente com volume de 300 μL foram concentradas até 10 μL . Desse volume, 5 μL (metade do total da amostra inicial com 300 μL) foram injetados no espectrômetro de massas para as análises. Portanto as quantidades absolutas injetadas foram de 3,75 pmol (25 nm) e 11,25 pmol (75 nm). Para análise dos dados, foram consideradas as intensidades de sinal dos espectros de MS.

3.18 Forma de análise dos resultados

Todos os dados foram apresentados como média $\pm$ o erro padrão da média (EPM). Foram aplicados testes estatísticos One way-ANOVA e Two way-ANOVA para análise dos resultados. Foram considerados significantes valores com $p < 0,05$.

4 RESULTADOS

4.1 Síntese dos marcadores isotópicos TMABs (4-trimetil-amônio-butilil)

Na primeira etapa de síntese, as reações produziram 2,21 g (12,14 mmol, 56,87% de rendimento) de TMAB ácido D₀, 2,13 g (11,70 mmol, 54,81% de rendimento) de TMAB ácido D₃ e 2,26 g (12,41 mmol, 58,13% de rendimento) de TMAB ácido D₉. Na segunda etapa, a reação produziu 1,95 g (6,98 mmol, rendimento de 63,06%) do TMAB-NHS D₀. Para os TMAB-NHS D₃ e D₉ os rendimentos foram de 2,13 g (7,54 mmol, 68,91%) e 2,50 g (8,95 mmol, 80,88%) respectivamente.

A Figura 2 mostra o espectro de MS (peptídeo GAIRDIDLK^{NR}) do experimento teste dos novos marcadores isotópicos. A Tabela 2 mostra a análise das curvas de peptídeo (corridas 2 e 3), evidenciando a linearidade ($R^2 > 0,99$) da quantificação absoluta desse peptídeo em concentrações entre 12,5 e 50 nM.

Figura 2 - Espectros de MS representativos dos experimentos testes dos novos marcadores isotópicos.

Espectro de MS do peptídeo GAIRDIDLK (íon com carga 4⁺). Massa mono-isotópica do peptídeo não marcado = 1269,72. Pannel A: Corrida 1 - 25 nM do peptídeo GAIRDIDLK em 300 µL marcados com D₀, D₃ e D₉ cedidos pelo Prof. Dr. Lloyd Fricker - Albert Einstein College of Medicine, Bronx, New York. Pannel B: Corrida 2 - curva do peptídeo GAIRDIDLK: 12,5 nM, 25 nM e 50 nM do peptídeo GAIRDIDLK em 300 µL marcados com os novos D₀, D₃ e D₉, respectivamente. Pannel C: Corrida 3 - 25 nM do peptídeo GAIRDIDLK em 300 µL marcados com os novos D₀, D₃ e D₉. Pannel D: Corrida 4 - curva do peptídeo GAIRDIDLK: 50 nM, 12,5 nM e 25 nM do peptídeo GAIRDIDLK em 300 µL marcados com os novos D₀, D₃ e D₉, respectivamente.

Tabela 2 - Análise das curvas de peptídeo

Corrida	12,5 nM	25 nM	50 nM	R ²
2	0,4	1,033333	2,8	0,9942
4	0,6	1,666667	2	1

Referente à Figura 2 - corridas 2 e 4, Painéis B e D, respectivamente. Foi realizada a regressão linear dos valores de intensidade de pico obtidos nos espectros de MS do peptídeo GAIRDIDLKNR, nas corridas 2 e 4.

$$y = 15,307x + 7,5667 \quad \text{Equação da reta, Corrida 2}$$

$$y = 11,719x + 5,4687 \quad \text{Equação da reta, Corrida 4}$$

4.2 Identificação do peptídeo AGH

A partir de homogenatos de cérebros de camundongos, foi preparado um extrato de peptídeos, que foi incubado com a enzima inativa para o isolamento dos peptídeos ligantes da EP24.15. Os peptídeos foram marcados com TMAB para posterior análise semi-quantitativa por espectrometria de massas. Foram utilizados quatro TMABs para a marcação dos grupos controle (enzima denaturada) e experimental (forma cataliticamente inativa da enzima). O grupo controle foi marcado com D₀ e D₆ e o grupo experimental com D₃ e D₉.

Um dos peptídeos identificados apresentou intensidade de sinal maior no grupo experimental que no grupo controle, já que a intensidade de sinal no grupo controle ficou próxima ao ruído do espectro. Isto demonstra que o peptídeo ligou-se a EP24.15 com alta especificidade no ensaio de captura de substrato (ECS), como pode ser observado no espectro de MS na Figura 3.

Figura 3 - Espectros de MS representativos dos ensaios de captura de substrato utilizando a EP24.15 inativa.

Painel A: Espectro de MS de um peptídeo com o mesmo perfil de ligação nos grupos controle (D₀ e D₆) e experimental (D₃ e D₉). Painel B: Espectro de MS do peptídeo identificado por possuir uma maior afinidade pela enzima inativa. D₀, D₃, D₆ e D₉ são os marcadores (4-trimetil-amônio-butilil) (TMAB) (D₀, D₃, D₆ e D₉-TMAB) utilizados para a análise semi-quantitativa.

O programa Mascot foi utilizado para o sequenciamento do peptídeo (Figura 3, Painel B, acima) a partir do espectro de MS/MS, como representado na Figura 4. Esse peptídeo foi identificado como sendo um fragmento da cadeia α da hemoglobina, com 14 resíduos aminoácidos. A nomenclatura adotada pelo nosso grupo é de nomear os peptídeos descobertos pelos três primeiros aminoácidos. Assim, esse novo peptídeo foi denominado AGH (AGHLDDLPGALSAL).

Figura 4 - Sequenciamento do peptídeo AGH a partir da análise do espectro de MS/MS.

Essa análise de MS/MS é de um íon com carga 2⁺, com massa carga de 738,93, que foi eluído da coluna de fase reversa após 25,1 min (massa mono-isotópica do peptídeo não marcado = 1.348.70 Da). Note que esse espectro representa o peptídeo mostrado na Figura 3b marcado com D₀-TMAB, e após a dissociação induzida por colisão, os fragmentos b e y que contém os marcadores TMAB perderam 59 Da devido a perda do grupo (CH₃)₃N do marcador. Foram encontrados também vários fragmentos internos (em letras maiúsculas: L – Leucina, PG – Prolina+Glicina, PGA-28 – Prolina+Glicina+Alanina perdendo uma carbonila, PGA - Prolina+Glicina+Alanina, PGAL-28 - Prolina+Glicina+Alanina+Leucina perdendo uma carbonila). A sequência desse peptídeo foi definida como AGHLLDLPGALSAL.

4.3 Ensaios de competição entre AGH e o substrato FRET Abz-GGFLRRV-EDDnp na presença da EP24.15 ou EP24.16

Nos ensaios de competição com a EP24.15, é possível observar uma sutil diminuição na eficiência da clivagem do substrato FRET Abz-GGFLRRV-EDDnp na presença do AGH, o que não foi observado nos ensaios de competição com a EP24.16, como pode ser observado na Figura 5.

Figura 5 - Efeito do peptídeo AGH na atividade enzimática da EP24.15 ou da EP24.16 avaliado por ensaio de competição com o substrato FRET Abz-GGFLRRV-EDDnp.

Houve uma redução sutil na eficiência de clivagem do substrato FRET Abz-GGFLRRV-EDDnp pela EP24.15, o que não foi observado nos ensaios usando a EP24.16 ($p < 0,05$ x controle). O efeito do AGH sobre a atividade catalítica das enzimas foi determinado em três experimentos realizados em triplicatas. As colunas representam a média $\pm$ E.P.M. As comparações estatísticas foram realizadas por análise de variância (One way-ANOVA) seguida pelo teste de Tukey. $p < 0,05$ (*) indicaram uma diferença significativa em relação ao controle. As análises estatísticas dos dados foram geradas pelo GraphPad Prism, versão 5.0 (GraphPad).

4.4 Análise da hidrólise do peptídeo AGH pela EP24.15 ou EP24.16

Após incubação com a EP24.15 ativa recombinante, por diferentes intervalos de tempo, a concentração inicial de AGH (100 μM) diminuiu entre 4 e 16%. Quando incubado com a EP24.16 ativa recombinante, o AGH teve a sua concentração diminuída em cerca de 3%. Assim, o AGH se mostrou um substrato “fraco” da EP24.15, como mostrado na Tabela 3.

Tabela 3 - Hidrólise do AGH e da bradicinina pela EP24.15 ou pela EP24.16

EP24.15			EP24.16		
	bradicinina	AGH		bradicinina	AGH
0 min	0%	0%	0 min	0%	0%
15 min	30%	0%	15 min	37%	0%
30 min	50%	4%	30 min	53%	3%
60 min	72%	16%	60 min	73%	2%
60 min + JA2	23%	0%	60 min + Pro-Ile	16%	0%

Para verificar a ligação do peptídeo identificado acima, ensaios enzimáticos foram realizados e analisados por HPLC. A inibição por JA2 (EP24.15) ou Pro-Ile (EP24.16) foi utilizada como controle. AGH 100 μM; EP24.15 2,5 nM; EP24.16 2,5 nM.

Esses dados corroboram com os dados obtidos anteriormente de competição entre AGH e o substrato FRET. O AGH levou a uma sutil diminuição na eficiência da clivagem do substrato FRET pela EP24.15, mas não pela EP24.16 e no ensaio de hidrólise mostrou-se um “fraco” substrato da EP24.15, mas não da EP24.16.

4.5 Interação proteína-proteína e peptídeo-proteína

Os ensaios de interação proteína-proteína e peptídeo-proteína foram realizados por Ressonância Plasmônica de Superfície a 25 °C em um equipamento BIAcore T100 (GE Healthcare) com HBS-EP+ Ca^{2+} (5 mM) como tampão de corrida em fluxo constante de 30 $\mu\text{L}/\text{min}$ por 180 s. A proteína 14-3-3 ϵ foi imobilizada em um *sensor chip* CM5. O AGH interagiu diretamente com a 14-3-3 ϵ com valores estatisticamente significativos quando utilizado em concentrações a partir de 10 μM em relação ao controle. A partir de 25 μM , o AGH foi ainda capaz de aumentar a interação entre a 14-3-3 ϵ e a EP24.15 (5 μM), como representado na Figura 6.

Figura 6 - Ressonância plasmônica de superfície.

Os valores obtidos na ausência de AGH foram considerados como 100% de interação entre a EP24.15 e a 14-3-3 ϵ (controle). Portanto, no grupo AGH, o controle corresponde ao fluxo de apenas tampão e no grupo EP24.15 + AGH ao fluxo de solução de EP24.15. Para todas as corridas a proteína imobilizada foi a 14-3-3 ϵ . No grupo AGH, mediu-se a interação direta de AGH com a 14-3-3 ϵ . No grupo EP24.15 + AGH mediu-se a influência de AGH na interação entre a EP24.15 e 14-3-3 ϵ . As colunas representam a média $\pm$ E.P.M. As comparações estatísticas foram realizadas por análise de variância (One way-ANOVA) seguida pelo teste de Tukey. ** $p < 0,01$ x controle; *** $p < 0,001$ x controle; ### $p < 0,001$ x 1 μM . As análises estatísticas dos dados foram geradas pelo GraphPad Prism, versão 5.0 (GraphPad).

4.6 Ligação cruzada (cross-linking) - interação entre 14-3-3ε e AGH

Como foi demonstrado por ressonância plasmônica de superfície (RPS), o AGH é capaz de interagir com a proteína 14-3-3ε. Portanto, foram realizados experimentos de ligação cruzada para confirmar essas observações por RPS, bem como para mapear a região na proteína 14-3-3ε onde ocorre a interação com o peptídeo AGH. As amostras desses experimentos foram analisadas por espectrometria de massas, e foi obtido um espectro de massas das espécies intactas (Figura 7).

Figura 7 - Espectro de massas deconvolvido das espécies intactas formadas pela incubação da 14-3-3ε com o peptídeo AGH, após a adição de suberato de N-N-disuccinimidila (DSS).

Uma alíquota desta amostra foi digerida com tripsina e analisada por espectrometria de massas, onde foram identificados dois peptídeos da 14-3-3ε ligados ao AGH, que são mostrados na Tabela 4.

Tabela 4 - Peptídeos da 14-3-3ε encontrados ligados ao peptídeo AGH

m/z (z)	Peptídeos 14-3-3ε
1121.3106 (+4)	EAAENSLVAY K AASDIAMTELPPTHPIR
1012.5321 (+4)	YLAEFATGNDR K EAAENSLVAYK

Com base nas restrições de distâncias impostas pelo suberato de N-N-disuccinimidila (DSS), foi proposto o modelo de interação mostrado a seguir na Figura 8, onde é possível observar uma convergência entre as duas espécies encontradas modificadas, ambas indicando uma mesma região de interação. Em função da ausência de lisinas na sequência do peptídeo, foi possível apenas determinar a região de ancoragem da porção N-terminal, não sendo possível caracterizar a região de ancoragem da porção C-terminal do AGH ao longo da superfície da 14-3-3 ϵ . No entanto, essa informação é suficiente para determinar que a interação com AGH ocorre na hélice α F da proteína 14-3-3 ϵ (WILKER et al., 2005).

Figura 8 - Região de ancoragem do peptídeo AGH (N-terminal) na superfície da proteína 14-3-3 ϵ .

Os espectros de massas gerados foram processados utilizando o programa Mascot Distiller, que realiza a correção dos eventuais deslocamentos de massa. Os espectros processados foram então analisados pelo programa CRUX, que gera uma lista com os potenciais peptídeos ligados pelo agente de ligação cruzada, esta lista é então manualmente verificada, para a confirmação dos dados.

4.7 Dicroísmo circular

Usando espectroscopia de dicroísmo circular, verificou-se também se a interação com o AGH poderia interferir na formação de elementos de estrutura secundária da proteína 14-3-3 ϵ . Essa informação é relevante para estudos estruturais, uma vez que os programas utilizados para a análise dos dados de ligação cruzada não preveem essas alterações. No entanto, foi verificado que não houve alterações significativas nas estruturas secundárias da proteína, como pode ser observado na Figura 9.

Figura 9 - Espectro de dicroísmo circular da proteína 14-3-3 ϵ subtraído do espectro do complexo 14-3-3 ϵ /AGH.

Esse espectro foi obtido no espectropolarímetro Jasco J-810, em um intervalo de comprimento de onda 190 a 260 nm, sendo os espectros gerados por 4 a 5 leituras consecutivas.

4.8 Hipernocicepção inflamatória

Para investigar um possível efeito do AGH sobre a hipernocicepção inflamatória, ratos Wistar foram injetados por via intraplantar com carragenina (200 μ g) concomitantemente com AGH (10 μ g) e avaliados após 3 h, pelo teste de pressão na pata. Em comparação com o grupo controle, de animais que receberam apenas carragenina, o AGH preveniu completamente a hipernocicepção induzida por carragenina (Figura 10, Painel A).

O possível envolvimento de receptores opióides na ação antinociceptiva do AGH foi avaliada usando-se naloxona, um antagonista inespecífico de receptores opióides. Os animais foram injetados com 1 μ g de naloxona por pata por via intraplantar, e após 1 h receberam a carragenina e o AGH concomitantemente, também por via intraplantar. O ensaio de pressão na pata realizado 3 h após a última administração mostrou que a naloxona preveniu completamente o efeito antinociceptivo do AGH (Figura 10, Painel A).

Para caracterizar o tipo de receptor opióide envolvido na antinocicepção induzida pelo AGH, os animais foram tratados com CTOP, nor-BNI, ou ICI 174.864, que são antagonistas específicos de receptores opióides do tipo μ (MOR), κ (KOR) e δ (DOR), respectivamente. Os antagonistas foram injetados por via intraplantar 1 h antes da injeção de carragenina ou carragenina e AGH. O ensaio de pressão da pata realizado 3 h após o último tratamento, mostrando que os antagonistas específicos para KOR e DOR não interferiram na

antinocicepção induzida pelo AGH. No entanto, o tratamento com o antagonista de receptores MOR, CTOP, aboliu a antinocicepção induzida por AGH (Figura 10, Painel B).

Para investigar uma possível ação sistêmica do AGH, os ratos foram injetados com carragenina (200 µg) na pata direita e concomitantemente com 10 µg de AGH na pata esquerda (Figura 10, Painel D) ou receberam 50 µg de AGH por via oral (Figura 10, Painel C). O ensaio de pressão da pata realizada 3 h após os tratamentos demonstra que o AGH não interferiu na hipernocicepção induzida por carragenina nessas situações (Figura 10, Painéis C e D).

Figura 10 - Efeito do AGH na hipernocicepção induzida por carragenina.

Painel A: Os ratos foram injetados com naloxona (1 µg/pata) por via intraplantar, e após 1 h receberam a carragenina (Cg, 200 µg/pata) ou a carragenina e o AGH (intraplantar, 10 µg/pata) concomitantemente também por via intraplantar. Painel B: Os ratos foram injetados com CTOP (20 µg/pata), nor-BNI (50 µg/pata) ou ICI 174,864 (10 µg/pata) por via intraplantar, e após 1 h receberam a carragenina (Cg, 200 µg/pata) ou a carragenina e o AGH (intraplantar, 10 µg/pata) concomitantemente também por via intraplantar. Painel C: Os ratos foram injetados por via intraplantar com carragenina (Cg, 200 µg) e receberam AGH por via oral (50 µg/2 mL). Painel D: Os ratos foram injetados por via intraplantar com carragenina (Cg, 200 µg) na pata direita e concomitantemente com AGH (intraplantar, 10 µg) na pata esquerda. Em todos os experimentos o limiar nociceptivo foi avaliado pelo teste de pressão na pata antes (0 h) e 3 h após a injeção da carragenina. Os animais controle receberam somente carragenina. As colunas representam a média ± E.P.M. para 5 a 6 animais por grupo. As diferenças estatisticamente significativas estão indicadas (*). (*) $p < 0,05$ x 0 h, (**) $p < 0,01$ x 0 h. As comparações estatísticas foram realizadas por análise de variância (Two-way) ANOVA seguida do teste de comparações múltiplas de Bonferroni. As análises estatísticas dos dados foram geradas pelo GraphPad Prism, versão 5.0 (GraphPad).

4.9 Hipernocicepção neuropática

Para avaliar se o AGH poderia ter efeito também na hipernocicepção neuropática, ratos Wistar foram submetidos ao modelo constrição do nervo isquiático (CCI) e receberam AGH por via intratecal (1 µg) (Figura 11, Painel A) ou intraperitoneal (Figura 11, Painel B).

Nessas condições, os animais foram avaliados pelo teste de pressão da pata 1 h após a administração do peptídeo. O AGH não interferiu no limiar nociceptivo dos animais.

Figura 11 - Hipernocicepção mecânica avaliada pelo teste de pressão na pata 14 dias após a cirurgia de constrição do nervo isquiático (CCI) e tratamento com AGH.

Painel A: Os animais foram submetidos à cirurgia e o AGH foi administrado pela via intratecal (1 µg). Painel B: Os animais foram submetidos à cirurgia e o AGH foi administrado pela via intraperitoneal (10 µg). Nos dois experimentos o teste de pressão na pata foi realizado 1 h após a administração do AGH. As colunas representam a média ± E.P.M. para 5 a 6 animais por grupo. As diferenças estatisticamente significativas estão indicadas (*). (*) $p < 0,05$ x 0 h, (***) $p < 0,001$ x 0 h. As comparações estatísticas foram realizadas por análise de variância (Two-way) ANOVA seguida do teste de comparações múltiplas de Bonferroni. As análises estatísticas dos dados foram geradas pelo GraphPad Prism, versão 5.0 (GraphPad).

4.10 Efeito do AGH na ligação de [35 S]GTP γ S estimulada por agonista

O ensaio de ligação de [35 S]GTP γ S mede o nível de ativação da proteína G após a ocupação de um receptor acoplado a proteína G por um agonista. A ligação do agonista ao receptor faz com ocorra que a troca de GTP por GDP na subunidade α da proteína G; as

subunidades $G\alpha$ -GTP e $G\beta\gamma$ ativam efetores celulares. A atividade GTPásica da subunidade $G\alpha$ hidrolisa GTP a GDP, as subunidades $G\alpha$ e $G\beta\gamma$ se reassociam e o sistema é desligado. Nesse ensaio, a troca de [^{35}S]GTP γ S por GDP ocorre, mas $G\alpha$ não é capaz de hidrolisar a ligação $G\alpha$ -[^{35}S]GTP γ S que se acumula e pode ser medida por um contador de marcador [^{35}S] incorporado. Para investigar se o AGH tem efeito sobre o acoplamento funcional do receptor a proteínas G, ensaios de ligação de [^{35}S]GTP γ S foram realizados utilizando-se membranas de estriado de ratos.

Nos grupos de controle positivo, como esperado, encontramos um aumento na ligação basal de [^{35}S]GTP γ S, em resposta a ligação de DAMGO, agonista de receptores opióides do tipo μ (MOR), ou de HU-210, agonista de receptores canabinóides do tipo 1 (CB1). No entanto, não foram observadas diferenças entre os grupos basais e AGH, como também o peptídeo não foi capaz de deslocar os agonistas DAMGO e HU-210 da ligação com os respectivos receptores, como pode ser observado na Figura 12.

Figura 12 - Efeito do AGH e de outras seqüências similares na ativação da proteína G induzida pela ligação de um agonista.

A ligação do agonista ao receptor faz com que ocorra a troca de GTP por GDP na subunidade α da proteína G; as subunidades $G\alpha$ -GTP e $G\beta\gamma$ ativam efetores celulares. A atividade GTPásica da subunidade $G\alpha$ hidrolisa GTP a GDP, as subunidades $G\alpha$ e $G\beta\gamma$ se reassociam e o sistema é desligado. Nesse ensaio, a troca de [³⁵S]GTPγS por GDP ocorre, mas $G\alpha$ não é capaz de hidrolisar a ligação $G\alpha$ -[³⁵S]GTPγS que se acumula e pode ser medida por um contador de marcador [³⁵S] incorporado. Pannel A: AGH e outras seqüência similares foram adicionadas na concentração de 10 μ M. Pannel B: AGH e outras seqüência similares foram adicionadas na concentração de 50 μ M. Nos dois casos, a quantificação de [³⁵S]GTPγS, após ativação de MOR, mostrou que o AGH não foi capaz de deslocar DAMGO. Pannel C: Para investigar a possibilidade do AGH ativar indiretamente MOR presente em heterodímeros, o mesmo experimento foi realizado com HU-210, agonista de CB1. No entanto na concentração de 50 μ M, o AGH não foi capaz de deslocar o agonista dos receptores CB1. As colunas representam a média $\pm$ E.P.M. As análises estatísticas dos dados foram geradas pelo GraphPad Prism, versão 5.0 (GraphPad). AGH – AGHLDDLPGALSAL, AGH-SA – AGHLDDLPGALSA, AAGH – AAGHLDDLPGALSALSDLH, NAAGH – NAAGHLDDLPGALSALSDL.

4.11 Identificação do peptídeo AGH em tecidos perfundidos

O peptídeo AGH foi identificado em tecidos perfundidos do hipocampo e do cerebelo como demonstrado na Figura 13. O peptídeo sintético foi usado para calcular a concentração de peptídeo natural nas amostras. Como cada amostra foi composta por dez estruturas, os valores obtidos foram divididos por dez para que se obtivessem valores em pmol/estrutura. As estruturas ainda úmidas foram pesadas para que, a partir dos valores de pmol/estrutura, se obtivessem os valores de pmol/peso úmido. Com base nesses resultados podemos sugerir que o peptídeo AGH se encontra no hipocampo na concentração de 0,3171 pmol/estrutura ou 7,724 fmol/mg de tecido úmido; e no cerebelo, na concentração de 0,3277 pmol/estrutura ou 5,516 fmol/mg de tecido úmido.

Figura 13 - Espectros de MS do peptídeo AGH identificado em tecidos perfundidos de hipocampo e cerebelo de camundongos.

Painel A: Espectro de MS do peptídeo AGH sintético (25 nm – D₀-TMAB e 75 nm – D₉-TMAB) que foi usado como controle. As amostras inicialmente com volume de 300 µL foram concentradas até 10 µL. Desse volume, 5 µL (metade do total da amostra inicial com 300 µL) foram injetados no espectrômetro de massas para as análises. Portanto as quantidades absolutas injetadas foram de 3,75 pmol (25 nm) e 11,25 pmol (75 nm). O tempo de eluição dos peptídeos foi de 24,4 min. Painel B: Espectro de MS do peptídeo AGH identificado em tecidos perfundidos de hipocampo de camundongos (D₀-TMAB) e do peptídeo AGH sintético (75 nm – D₉-TMAB). O tempo de eluição dos peptídeos foi de 21,5 min. Painel C: Espectro de MS do peptídeo AGH identificado em tecidos perfundidos de cerebelo de camundongos (D₀-TMAB) e do peptídeo AGH sintético (75 nm – D₉-TMAB). O tempo de eluição dos peptídeos foi de 22,4 min.

5 DISCUSSÃO

A viabilidade do uso das formas cataliticamente inativas das enzimas EP24.15 e EP24.16 nos ensaios de captura de substrato (ECS), para identificar novos peptídeos bioativos foi demonstrada originalmente por Rioli e colaboradores (2003). A hemopressina, o primeiro peptídeo identificado utilizando-se esse ensaio, diminui a pressão arterial (RIOLI et al., 2003), inibe respostas hipernociceptivas periféricas (DALE et al., 2005), e funciona por via oral como um supressor do apetite (DODD et al., 2010), agindo como um agonista inverso de receptores canabinóides do tipo 1 (CB1) (HEIMANN et al., 2007). Além disso, uma família de peptídeos endógenos gerados a partir da cadeia α da hemoglobina que atuam como moduladores alostéricos negativos em receptores CB1 foi encontrada (BAUER et al., 2012; GOMES et al., 2010), o que aumenta a importância biológica do sistema sinalizador peptidérgico derivado de hemoglobina para a resposta fisiológica.

No presente estudo, a abordagem original do ECS (RIOLI et al., 2003), foi combinada com a marcação isotópica e espectrometria de massas para identificar e caracterizar novos peptídeos endógenos bioativos que se ligam à EP24.15. Uma descoberta importante foi a identificação de um novo peptídeo bioativo derivado da cadeia α da hemoglobina, com 14 resíduos aminoácidos, o que é consistente com o tamanho médio dos produtos de degradação de proteínas mediada pelo proteassoma (KISSELEV et al., 1999; WENZEL et al., 1994). Esse peptídeo recebeu o nome AGH e mostrou ser um substrato “fraco” da enzima EP24.15. A existência de vários peptídeos intracelulares que não são degradados pela EP24.15, já havia sido observada (BERTI et al., 2009). A estabilidade de um grupo relativamente grande de peptídeos intracelulares, como mostrado também em outros trabalhos (BERTI et al., 2009; CASTRO et al., 2010; FRICKER et al., 2012), é um aspecto novo do conhecimento de peptídeos intracelulares que era anteriormente desconhecido (AKOPIAN; KISSELEV; GOLDBERG, 1997; REITS et al., 2004; SARIC; GRAEF; GOLDBERG, 2004). Alguns desses peptídeos vem sendo caracterizados com atividade biológica, por exemplo, foi demonstrado que peptídeos intracelulares do tecido adiposo de ratos se ligam a proteínas específicas de modo a facilitar a absorção de glicose induzida pela insulina em adipócitos 3T3-L1. Os peptídeos intracelulares identificadas naquele trabalho, não são nem substratos nem inibidores competitivos da oligopeptidase EP24.15 (BERTI et al., 2012). Assim, aparentemente o AGH faz parte desse grupo de peptídeos intracelulares resistentes à degradação pelas oligopeptidases.

Em ensaios de ressonância plasmônica de superfície (RPS), o AGH interagiu diretamente com a 14-3-3 ϵ , e ainda foi capaz de aumentar a interação entre a 14-3-3 ϵ e a EP24.15. Como foi demonstrado por Carreño e colaboradores (2005), a interação entre EP24.15 e a proteína 14-3-3 ϵ , está relacionada com a secreção não convencional da EP24.15 (CARRENO et al., 2005). Uma vez que o AGH está presente no citosol e aumenta a afinidade entre essas duas proteínas, poderia ter uma importância biológica nesse processo. Para explorar as características dessa interação, foram realizados experimentos de ligação cruzada, por meio dos quais foi possível obter informações estruturais sobre o complexo AGH/14-3-3 ϵ .

Agentes de ligação cruzada (ALC) são compostos orgânicos, contendo dois grupos reativos, unidos por uma cadeia espaçadora de comprimento variável. Quando em contato com proteínas e peptídeos em solução, os ALC reagem com resíduos de aminoácidos unindo as cadeias laterais de dois resíduos que estejam espacialmente separados, no máximo, pela distância da cadeia espaçadora. O fenômeno de ligação cruzada compreende a união de duas espécies pela formação de uma ligação covalente (WONG, 1993).

O uso da espectrometria de massas na análise de produtos de ligação cruzada permite identificar as espécies moleculares contendo a ligação cruzada e assim obtêm-se as informações estruturais desejadas, por meio de restrições de distâncias espaciais determinadas a partir de resíduos ligados pelo ALC. Isto é feito submetendo-se a proteína ligada ao ALC à proteólise enzimática, e identificando-se os peptídeos modificados por LC-MS/MS (KALKHOF; SINZ, 2008).

Os experimentos de ligação cruzada foram feitos com suberato de N-N-disuccinimidila (DSS), que contém um grupo N-hidroxissuccinimida (NHS) em cada uma de suas extremidades. Os grupos NHS reagem e formam ligações covalentes com os N-terminais e as lisinas das proteínas e dos peptídeos. Em função da ausência de lisinas na sequência do peptídeo, foi possível apenas determinar a região de ancoragem da porção N-terminal. No entanto, essa informação foi suficiente para determinar que a interação com AGH ocorre na hélice α F da proteína 14-3-3 ϵ (WILKER et al., 2005).

Determinada a hélice de interação da proteína 14-3-3 ϵ com o AGH, foram realizados experimentos de espectroscopia de dicroísmo circular para avaliar possíveis mudanças conformacionais que pudessem ocasionar alterações em elementos de estrutura secundária da proteína devido à interação com o peptídeo AGH. A espectroscopia de dicroísmo circular é uma técnica muito empregada no estudo de mudanças conformacionais, interações de ligantes com proteínas ou outras biomoléculas e também como uma estimativa da qualidade da estrutura secundária da proteína em solução (GREENFIELD, 1999; KELLY; PRICE, 2000).

Essa técnica é baseada no estudo de elementos de estrutura secundária das proteínas em solução (α -hélices, estruturas β e estruturas randômicas) os quais contribuem na formação da estrutura terciária das proteínas (DYSON; WRIGHT, 1995; KELLY; PRICE, 2000). Como observado nesse trabalho, a interação com o peptídeo AGH não levou a alterações estruturais na proteína 14-3-3 ϵ , constituindo um importante dado para a validação do modelo proposto a partir dos dados obtidos por ligação cruzada.

Peptídeos derivados de hemoglobina denominados hemorfinas, mimetizam os peptídeos opióides clássicos no que diz respeito às suas propriedades analgésicas. Por exemplo, no modelo animal de “*tail-flick*”, ou de retirada da cauda, as hemorfinas -4 e -5 produziram efeitos antinociceptivos dose dependentes reversíveis pela administração de naloxona em camundongos (DAVIS; GILLESPIE; PORRECA, 1989). Além disso, foi demonstrado que as hemorfinas -4 e -7 podem induzir a liberação de β -endorfina e dinorfina a partir da glândula pituitária *in vitro* (SCHEFFLER et al., 1990), dando início ao estudo das propriedades analgésicas das hemorfinas, também pela ativação dos sistemas clássicos de peptídeos opióides. Sanderson e colaboradores (1998), demonstraram que a hemorfina-7 pode desempenhar um papel na modulação da resposta inflamatória aguda em ratos, mas não tem efeito sobre a inflamação associada com lesão recorrente ou crônica (SANDERSON; NYBERG; KHALIL, 1998).

Uma vez que vários relatos apontam que os peptídeos derivados da hemoglobina, como hemorfinas, derivadas da cadeia β da hemoglobina, (CHENG et al., 2012; DAVIS; GILLESPIE; PORRECA, 1989), e hemopressinas, derivadas da cadeia α da hemoglobina (DALE et al., 2005), têm um efeito antinociceptivo, os efeitos do AGH foram avaliados no limiar nociceptivo de ratos.

Como foi demonstrado, o AGH teve atividade antinociceptiva no modelo experimental de hipernocicepção induzida por carragenina em ratos. Quando administrado por via intraplantar, a antinocicepção induzida por AGH foi reversível por naloxona (antagonista inespecífico de receptores opióides) e CTOP (antagonista específico para receptores opióides do tipo μ), sugerindo o envolvimento de receptores opióides do tipo μ (MOR). O ensaio de pressão da pata usa a pressão como um estímulo mecânico. Este método ativa diretamente os nociceptores de fibras nervosas C e A δ , resultando numa resposta motora que conduz a retirada da pata (RANDALL; SELITTO, 1957). Este modelo é amplamente utilizado para estudar a atividade de substâncias analgésicas periféricas, mas também pode ser utilizado para investigar a hipernocicepção inflamatória, uma vez que é possível quantificar as alterações no limiar nociceptivo dos animais.

A hipernocicepção induzida pela carragenina é constituída por um componente periférico que envolve sensibilização de nociceptores e um componente central que envolve circuitos centrais de dor (FERREIRA; LORENZETTI; CORREA, 1978). A mediação química da hipernocicepção induzida por carragenina, em ratos, inicia-se com a formação de bradicinina, que estimula a produção de fator de necrose tumoral- α (TNF- α), estimulando a formação de interleucina 1 β (IL-1 β), interleucina 6 (IL-6) e interleucina 8 (IL-8) (CUNHA et al., 1992) e (FERREIRA; LORENZETTI; POOLE, 1993). Em seguida, a IL-1 β e IL-6 podem estimular a produção de prostaglandinas (FERREIRA et al., 1988) enquanto que a IL-8 induz a liberação de aminas simpatomiméticas a partir de fibras nervosas simpáticas. Prostanóides e aminas simpatomiméticas são os mediadores finais responsáveis pelo desenvolvimento do quadro hipernociceptivo induzido por carragenina (CUNHA et al., 2005).

Utilizando-se novamente do modelo de hipernocicepção induzida por carragenina, o peptídeo AGH foi injetado por via intraplantar na pata contralateral à indução da inflamação e administrado por via oral. O ensaio de pressão da pata demonstrou que, nos dois casos, o AGH não interferiu na diminuição do limiar nociceptivo ocasionado pela inflamação, sugerindo que o efeito do peptídeo é local.

Devido ao efeito inibitório de respostas de hipernocicepção periférica com o envolvimento de MOR, o peptídeo AGH foi avaliado também na hipernocicepção persistente. O modelo utilizado foi a constrição crônica do nervo isquiático (CCI), que é um modelo que consiste em uma mononeuropatia periférica produzida por ligaduras constritivas frouxas ao redor do nervo isquiático (BENNETT; XIE, 1988). Essa constrição do nervo pode gerar edema intraneural, isquemia local e degeneração axonal (MYERS; HECKMAN; POWELL, 1996; MYERS et al., 1993; OLMARKER; RYDEVIK, 2001), levando ao desenvolvimento da hipernocicepção neuropática. As alterações estruturais envolvem degeneração de todas as fibras A e a maioria das fibras C (BASBAUM et al., 1991; CARLTON et al., 1991). Este modelo reproduz os mecanismos da dor neuropática observada em humanos (BENNETT; XIE, 1988; DOWDALL; ROBINSON; MEERT, 2005). Um dos sintomas mais frequentes da nocicepção neuropática é a alodinia mecânica, que pode se desenvolver após uma injúria neural periférica. Esta se caracteriza por uma hipersensibilidade tátil a estímulos mecânicos normalmente inócuos (WOOLF, 2004a).

Os animais foram submetidos ao ensaio de pressão da pata 14 dias após a cirurgia, já que hipernocicepção causada pela constrição pode ter início entre 24 h e 5 dias após a constrição do nervo, atingindo respostas máximas no final da segunda semana (BENNETT; XIE, 1988). Foram utilizadas duas vias de administração do AGH, uma central (intratecal) e

uma sistêmica (intraperitoneal). No entanto, em nenhum dos casos o efeito antinociceptivo foi observado nesse modelo de nocicepção neuropática. A expressão de receptores opióides no gânglio da raiz dorsal é substancialmente reduzida em neurônios que apresentam degeneração axonal, contribuindo assim para a diminuição destes na medula espinhal. Este processo está diretamente envolvido na insensibilidade a opióides apresentada por animais submetidos a modelos de dor neuropática (KOHNO et al., 2005; ZHANG et al., 1998).

Devido ao indício do envolvimento de receptores opióides no efeito de AGH na nocicepção, foram realizados ensaios de [³⁵S]GTPγS. Na conformação inativa, o dímero G β/γ está associado à subunidade G α-GDP. A ativação de receptores por um agonista resulta na dissociação do complexo G α-GDP, na formação do complexo G α-GTP e na consequente dissociação da subunidade G α do dímero β/γ. Assim, tanto a subunidade G α quanto o complexo G β/γ podem interagir com sistemas efetores intracelulares. A proteína G retorna ao seu estado inativo (heterotrimérico) após a hidrólise do GTP a GDP pela atividade GTPásica da subunidade Gα. Com base neste mecanismo de ação, o objetivo desse experimento foi quantificar a ativação da proteína G induzida por receptores a ela acoplados. Para isso, a ligação do [³⁵S]GTPγS (análogo não hidrolisável do GTP) à subunidade α das proteínas G de receptores de membranas purificadas de estriado de rato foi avaliada, comparando-se a ativação por DAMGO, agonista de receptores μ opióides, por AGH, e por três outros peptídeos de sequência próxima ao AGH já identificados em outro trabalho (GELMAN et al., 2010).

Em contraste com os dados obtidos *in vivo*, o AGH não aumentou os níveis basais de ativação da proteína G induzida por MOR, em experimento de [³⁵S]GTPγS, bem como não foi capaz de deslocar DAMGO dos receptores. Para investigar a possibilidade da ligação do AGH a receptores canabinóides ativando indiretamente MOR presentes em heterodímeros (BUSHLIN; ROZENFELD; DEVI, 2010), o mesmo experimento foi realizado com o HU-210, um agonista de CB1. No entanto, o AGH também não foi capaz de deslocar o HU-210. Dessa forma, é possível sugerir uma possível ação indireta sobre MOR.

A sequência AGHLDDLPGALSAL foi identificada previamente como um peptídeo intracelular natural do cérebro de camundongo por LC-MS/MS em estudos realizados utilizando o cérebro inteiro (CASTRO et al., 2010; GELMAN et al., 2010; GOMES et al., 2010). Gelman e colaboradores (2010) demonstraram diferenças no conteúdo peptídico do cérebro e do sangue de camundongos. Embora os experimentos tenham sido realizados sem a perfusão dos animais, os resultados indicam a presença de AGH e de várias outras sequências naturais semelhantes ao AGH no sangue, mas também no cérebro. Neste trabalho, o AGH foi

encontrado em tecidos cerebrais perfundidos, sugerindo sua localização em células do tecido nervoso. Corroborando esta constatação, a expressão da hemoglobina tem sido demonstrada ocorrer em neurônios do sistema nervoso central (BIAGIOLI et al., 2009). Sua persistência no tecido nervoso associada à existência de uma família de peptídeos de sequência similar sugere uma relevância fisiológica. Uma hipótese é que o AGH atue como um neuropeptídeo não clássico formado no interior do citosol e secretado através de um mecanismo ainda desconhecido para interagir com MOR em uma célula vizinha, conforme sugerido por Fricker (2010) (FRICKER, 2010). Um trabalho mais recente do mesmo grupo revelou a secreção de uma série de peptídeos intracelulares à partir de *slices* de cérebro de camundongos, entre eles a RVD-hemopressina. A sequência AGHLDDLPGALSA, que corresponde a sequência do peptídeo AGH com a perda do último aminoácido, foi identificada por espectrometria de massas duas vezes nas amostras de *slices* e duas vezes nas amostras de meio de cultura, demonstrando que o peptídeo foi secretado a partir dos *slices*. Essa sequência também foi identificada no ensaio de captura de substrato neste trabalho (dados não mostrados). O peptídeo AGH foi encontrado uma vez nas amostras de *slices*, mas não foi encontrado em amostras de meio de cultura de maneira que ainda não foi comprovada definitivamente a secreção do peptídeo AGH com sua sequência completa de catorze aminoácidos, mas somente com treze aminoácidos (GELMAN et al., 2013. In press.).

6 CONCLUSÕES

- O ensaio de captura de substrato (ECS) se confirmou como um método eficaz para a identificação de peptídeos com atividade biológica.
- O peptídeo AGH se liga diretamente à 14-3-3 ϵ , no entanto não altera significativamente sua estrutura secundária.
- O peptídeo AGH modula as interações entre as proteínas 14-3-3 ϵ e EP24.15 *in vitro*, podendo estar relacionado com a secreção não convencional da EP24.15.
- O AGH é um novo peptídeo bioativo que inibe as respostas de hipernocicepção periférica, com envolvimento de receptores opióides do tipo μ (MOR).
- Embora o AGH seja derivado de hemoglobina e tenha atividade opióide, falta-lhe a sequência chave das hemorfinas (YPWT), indicando que ele pode pertencer a uma nova classe de peptídeos opióides com diferentes propriedades farmacológicas a serem estudadas.
- A presença do peptídeo AGH no tecido nervoso associada à existência de uma família de peptídeos de sequência similar sugere sua relevância fisiológica.

REFERÊNCIAS*

- AKOPIAN, T. N.; KISSELEV, A. F.; GOLDBERG, A. L. Processive degradation of proteins and other catalytic properties of the proteasome from thermoplasma acidophilum. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 272, n. 3, p. 1791-1798, 1997.
- ALEY, K. O.; LEVINE, J. D. Different peripheral mechanisms mediate enhanced nociception in metabolic/toxic and traumatic painful peripheral neuropathies in the rat. **Neuroscience**, v. 111, n. 2, p. 389-397, 2002.
- ALMEIDA, T. F.; ROIZENBLATT, S.; TUFIK, S. Afferent pain pathways: a neuroanatomical review. **Brain Research**, v. 1000, n. 1-2, p. 40-56, 2004.
- AMARANTE, L. H.; DUARTE, I. D. G. The kappa-opioid agonist (+/-)-bremazocine elicits peripheral antinociception by activation of the l-arginine/nitric oxide/cyclic gmp pathway. **European Journal of Pharmacology**, v. 454, n. 1, p. 19-23, 2002.
- ANDREW, D.; GREENSPAN, J. D. Peripheral coding of tonic mechanical cutaneous pain: comparison of nociceptor activity in rat and human psychophysics. **Journal of Neurophysiology**, v. 82, n. 5, p. 2641-2648, 1999.
- BARANAUSKAS, G.; NISTRI, A. Sensitization of pain pathways in the spinal cord: cellular mechanisms. **Progress in Neurobiology**, v. 54, n. 3, p. 349-365, 1998.
- BARKHUDARYAN, N. et al. High molecular weight aspartic endopeptidase generates a coronaro-constrictory peptide from the beta-chain of hemoglobin. **FEBS Letters**, v. 329, n. 1-2, p. 215-218, 1993.
- BARKHUDARYAN, N. et al. Structure of hypothalamic coronaro-constrictory peptide factors. **Neurochemical Research**, v. 17, n. 12, p. 1217-1221, 1992.
- BASBAUM, A. I. et al. Cellular and molecular mechanisms of pain. **Cell**, v. 139, n. 2, p. 267-284, 2009.
- BASBAUM, A. I. et al. The spectrum of fiber loss in a model of neuropathic pain in the rat - an electron-microscopic study. **Pain**, v. 47, n. 3, p. 359-367, 1991.
- BAUER, M. et al. Identification and quantification of a new family of peptide endocannabinoids (pepcans) showing negative allosteric modulation at cb1 receptors. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 287, n. 44, p. 36944-36967, 2012.
- BENNETT, G. J.; XIE, Y. K. A peripheral mononeuropathy in rat that produces disorders of pain sensation like those seen in man. **Pain**, v. 33, n. 1, p. 87-107, 1988.

* De acordo com:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICA. **NBR 6023**: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

BERTI, D. A. et al. Analysis of intracellular substrates and products of thimet oligopeptidase in human embryonic kidney 293 cells. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 284, n. 21, p. 14105-14116, 2009.

BERTI, D. A. et al. Identification of intracellular peptides in rat adipose tissue: insights into insulin resistance. **Proteomics**, v. 12, n. 17, p. 2668-2681, 2012.

BESSON, J. M. The neurobiology of pain. **Lancet**, v. 353, n. 9164, p. 1610-1615, 1999.

BESSOU, P.; PERL, E. R. Response of cutaneous sensory units with unmyelinated fibers to noxious stimuli. **Journal of Neurophysiology**, v. 32, n. 6, p. 1025-43, 1969.

BIAGIOLI, M. et al. Unexpected expression of alpha- and beta-globin in mesencephalic dopaminergic neurons and glial cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 106, n. 36, p. 15454-15459, 2009.

BINDER, W.; CARMODY, J.; WALKER, J. Effect of gender on anti-inflammatory and analgesic actions of two kappa-opioids. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 292, n. 1, p. 303-309, 2000.

BRADBURY, A. F. et al. C fragment of lipotropin has a high affinity for brain opiate receptors. **Nature**, v. 260, n. 5554, p. 793-795, 1976.

BRANTL, V. et al. Novel opioid peptides derived from mitochondrial cytochrome b: cytochromophins. **European Journal of Pharmacology**, v. 111, n. 2, p. 293-294, 1985.

BRANTL, V. et al. Novel opioid peptides derived from hemoglobin: hemorphins. **European Journal of Pharmacology**, v. 125, n. 2, p. 309-310, 1986.

BRANTL, V. et al. Novel opioid peptides derived from casein (beta-casomorphins). I. Isolation from bovine casein peptone. **Hoppe-Seyler's Zeitschrift für physiologische Chemie**, v. 360, n. 9, p. 1211-1216, 1979.

BRENNAN, F.; CARR, D. B.; COUSINS, M. Pain management: A fundamental human right. **Anesthesia and Analgesia**, v. 105, n. 1, p. 205-221, 2007.

BRENT, P. J.; PANG, G. T. Sigma binding site ligands inhibit cell proliferation in mammary and colon carcinoma cell lines and melanoma cells in culture. **European Journal of Pharmacology**, v. 278, n. 2, p. 151-160, 1995.

BRIDGES, D.; THOMPSON, S. W.; RICE, A. S. Mechanisms of neuropathic pain. **British Journal of Anaesthesia**, v. 87, n. 1, p. 12-26, 2001.

BROWN, C. K. et al. Structure of neurolysin reveals a deep channel that limits substrate access. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 98, n. 6, p. 3127-3132, 2001.

BROWNSTEIN, M. J. A brief-history of opiates, opioid-peptides, and opioid receptors. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 90, n. 12, p. 5391-5393, 1993.

BURGESS, P. R.; PERL, E. R. Myelinated afferent fibres responding specifically to noxious stimulation of the skin. **The Journal of Physiology**, v. 190, n. 3, p. 541-562, 1967.

BUSHLIN, I.; ROZENFELD, R.; DEVI, L. A. Cannabinoid-opioid interactions during neuropathic pain and analgesia. **Current Opinion in Pharmacology**, v. 10, n. 1, p. 80-86, 2010.

CAILLIET, R. **Dor:** mecanismos e tratamento. Porto Alegre: Editora Artes Médicas. Sul LTDA, 1993.

CAMARGO, A. C. M. et al. Structural features that make oligopeptides susceptible substrates for hydrolysis by recombinant thimet oligopeptidase. **Biochemical Journal**, v. 324, p. 517-522, 1997.

CARDOZO, C.; ORLOWSKI, M. Evidence that enzymatic conversion of n-[1(r,s)-carboxy-3-phenylpropyl]-ala-ala-phe-p-aminobenzoate, a specific inhibitor of endopeptidase 24.15, to n-[1(r,s)-carboxy-3-phenylpropyl]-ala-ala is necessary for inhibition of angiotensin-converting enzyme. **Peptides**, v. 14, n. 6, p. 1259-1262, 1993.

CARLTON, S. M. et al. Neuroma formation and numbers of axons in a rat model of experimental peripheral neuropathy. **Neuroscience Letters**, v. 131, n. 1, p. 88-92, 1991.

CARRENO, F. R. et al. 14-3-3 epsilon modulates the stimulated secretion of endopeptidase 24.15. **Journal of Neurochemistry**, v. 93, n. 1, p. 10-25, 2005.

CASTRO, L. M. et al. Similar intracellular peptide profile of tap1/beta2 microglobulin double-knockout mice and c57bl/6 wild-type mice as revealed by peptidomic analysis. **AAPS Journal**, v. 12, n. 4, p. 608-616, 2010.

CHACUR, M. et al. Snake venom phospholipase a2s (asp49 and lys49) induce mechanical allodynia upon peri-sciatic administration: involvement of spinal cord glia, proinflammatory cytokines and nitric oxide. **Pain**, v. 108, n. 1-2, p. 180-191, 2004.

CHANG, R. C. C. et al. Isolation and structure of several peptides from porcine hypothalami. **Biochimica Et Biophysica Acta**, v. 625, n. 2, p. 266-273, 1980.

CHE, F. Y.; FRICKER, L. D. Quantitation of neuropeptides in cpe(fat)/cpe(fat) mice using differential isotopic tags and mass spectrometry. **Analytical Chemistry**, v. 74, n. 13, p. 3190-3198, 2002.

CHE, F. Y. et al. Identification of peptides from brain and pituitary of cpe(fat)/cpe(fat) mice. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 98, n. 17, p. 9971-9976, 2001.

CHENG, B. C. et al. Lvv-hemorphin 7 and angiotensin iv in correlation with antinociception and anti-thermal hyperalgesia in rats. **Peptides**, v. 36, n. 1, p. 9-16, 2012.

CHONG, M. S.; BAJWA, Z. H. Diagnosis and treatment of neuropathic pain. **Journal of Pain and Symptom Management**, v. 25, n. 5, p. S4-S11, 2003.

CORTELLI, P.; PIERANGELI, G. Chronic pain-autonomic interactions. **Neurological Sciences**, v. 24, p. S68-S70, 2003.

COSTIGAN, M.; SCHOLZ, J.; WOOLF, C. J. Neuropathic pain: A maladaptive response of the nervous system to damage. **Annual Review of Neuroscience**, v. 32, p. 1-32, 2009.

COSTIGAN, M.; WOOLF, C. J. Pain: molecular mechanisms. **Journal of Pain**, v. 1, n. 3, p. 35-44, 2000.

CUMMINS, P. M. et al. Zinc coordination and substrate catalysis within the neuropeptide processing enzyme endopeptidase ec 3.4.24.15 - identification of active site histidine and glutamate residues. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 274, n. 23, p. 16003-16009, 1999.

CUNHA, F. M. et al. Intracellular peptides as natural regulators of cell signaling. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 283, n. 36, p. 24448-24459, 2008.

CUNHA, F. Q. et al. Interleukin-8 as a mediator of sympathetic pain. **British Journal of Pharmacology**, v. 104, n. 3, p. 765-767, 1991.

CUNHA, F. Q. et al. The pivotal role of tumor-necrosis-factor-alpha in the development of inflammatory hyperalgesia. **British Journal of Pharmacology**, v. 107, n. 3, p. 660-664, 1992.

CUNHA, T. M. et al. A cascade of cytokines mediates mechanical inflammatory hypernociception in mice. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 102, n. 5, p. 1755-1760, 2005.

DAGOUASSAT, N. et al. Generation of vv-hemorphin-7 from globin by peritoneal macrophages. **FEBS Letters**, v. 382, n. 1-2, p. 37-42, 1996.

DALE, C. S. et al. Antinociceptive action of hemopressin in experimental hyperalgesia. **Peptides**, v. 26, n. 3, p. 431-436, 2005.

DAUCH, P.; VINCENT, J. P.; CHECLER, F. Molecular-cloning and expression of rat-brain endopeptidase-3.4.24.16. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 270, n. 45, p. 27266-27271, 1995.

DAUCH, P.; VINCENT, J. P.; CHECLER, F. Specific inhibition of endopeptidase 24.16 by dipeptides. **European Journal of Biochemistry**, v. 202, n. 2, p. 269-276, 1991.

DAVIS, T. P.; GILLESPIE, T. J.; PORRECA, F. Peptide-fragments derived from the beta-chain of hemoglobin (hemorphins) are centrally active invivo. **Peptides**, v. 10, n. 4, p. 747-751, 1989.

DEMASI, M. et al. Oligomerization of the cysteinyl-rich oligopeptidase ep24.15 is triggered by s-glutathionylation. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 44, n. 6, p. 1180-1190, 2008.

DICKENSON, A. H.; SULLIVAN, A. F. Evidence for a role of the nmda receptor in the frequency-dependent potentiation of deep rat dorsal horn nociceptive neurons following c-fiber stimulation. **Neuropharmacology**, v. 26, n. 8, p. 1235-1238, 1987.

DODD, G. T. et al. The peptide hemopressin acts through cb1 cannabinoid receptors to reduce food intake in rats and mice. **Journal of Neuroscience**, v. 30, n. 21, p. 7369-7376, 2010.

DOWDALL, T.; ROBINSON, I.; MEERT, T. F. Comparison of five different rat models of peripheral nerve injury. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 80, n. 1, p. 93-108, 2005.

DUARTE, I. D. G.; LORENZETTI, B. B.; FERREIRA, S. H. Peripheral analgesia and activation of the nitric oxide-cyclic gmp pathway. **European Journal of Pharmacology**, v. 186, n. 2-3, p. 289-293, 1990.

DUETHMAN, D.; DEWAN, N.; CONLON, J. M. Isolation of the opioid peptide leu-val-val-hemorphin-7 from bronchoalveolar lavage fluid of a patient with non-small cell lung cancer. **Peptides**, v. 21, n. 1, p. 137-142, 2000.

DWORKIN, R. H. et al. Advances in neuropathic pain - diagnosis, mechanisms, and treatment recommendations. **Archives of Neurology**, v. 60, n. 11, p. 1524-1534, 2003.

DYSON, H. J.; WRIGHT, P. E. Antigenic peptides. **Faseb Journal**, v. 9, n. 1, p. 37-42, 1995.

ERCHEGYI, J. et al. Isolation of a heptapeptide val-val-tyr-pro-trp-thr-gln (valorphin) with some opiate activity. **International Journal of Peptide and Protein Research**, v. 39, n. 6, p. 477-484, 1992.

FERREIRA, S. H. Peripheral analgesic sites of action of anti-inflammatory drugs. **International Journal of Clinical Practice**, v. 128, p. 2-10, 2002.

FERREIRA, S. H.; DUARTE, I. D. G.; LORENZETTI, B. B. The molecular mechanism of action of peripheral morphine analgesia - stimulation of the cgmp system via nitric-oxide release. **European Journal of Pharmacology**, v. 201, n. 1, p. 121-122, 1991.

FERREIRA, S. H.; LORENZETTI, B. B. Glutamate spinal retrograde sensitization of primary sensory neurons associated with nociception. **Neuropharmacology**, v. 33, n. 11, p. 1479-1485, 1994.

FERREIRA, S. H. et al. Interleukin-1-beta as a potent hyperalgesic agent antagonized by a tripeptide analog. **Nature**, v. 334, n. 6184, p. 698-701, 1988.

FERREIRA, S. H.; LORENZETTI, B. B.; CORREA, F. M. Central and peripheral antialgesic action of aspirin-like drugs. **European Journal of Pharmacology**, v. 53, n. 1, p. 39-48, 1978.

FERREIRA, S. H.; LORENZETTI, B. B.; POOLE, S. Bradykinin initiates cytokine-mediated inflammatory hyperalgesia. **British Journal of Pharmacology**, v. 110, n. 3, p. 1227-1231, 1993.

FERRO, E. S.; HYSLOP, S.; CAMARGO, A. C. M. Intracellular peptides as putative natural regulators of protein interactions. **Journal of Neurochemistry**, v. 91, n. 4, p. 769-777, 2004.

FERRO, E. S. et al. Secretion of metalloendopeptidase 24.15 (ec 3.4.24.15). **DNA and Cell Biology**, v. 18, n. 10, p. 781-789, 1999.

FISCHLI, W. et al. Isolation and amino acid sequence analysis of a 4,000-dalton dynorphin from porcine pituitary. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 79, n. 17, p. 5435-5437, 1982.

FONTENELE-NETO, J. D. et al. Comparative fine structural distribution of endopeptidase 24.15 (ec3.4.24.15) and 24.16 (ec3.4.24.16) in rat brain. **Journal of Comparative Neurology**, v. 438, n. 4, p. 399-410, 2001.

FREEMAN, F. M.; YOUNG, I. G. Inhibition of passive-avoidance memory formation in the day-old chick by the opioid cytochromin-4. **Learning & Memory**, v. 7, n. 4, p. 213-219, 2000.

FRICKER, L. D. Analysis of mouse brain peptides using mass spectrometry-based peptidomics: implications for novel functions ranging from non-classical neuropeptides to microproteins. **Molecular Biosystems**, v. 6, n. 8, p. 1355-1365, 2010.

FRICKER, L. D. et al. Peptidomic analysis of hek293t cells: effect of the proteasome inhibitor epoxomicin on intracellular peptides. **Journal of Proteome Research**, v. 11, n. 3, p. 1981-1990, 2012.

FRUITIER, I. et al. Proteolytic degradation of hemoglobin by endogenous lysosomal proteases gives rise to bioactive peptides: Hemorphins. **FEBS Letters**, v. 447, n. 1, p. 81-86, 1999.

FRUITIER, I.; GARREAU, I.; PIOT, J. M. Cathepsin D is a good candidate for the specific release of a stable hemorphin from hemoglobin in vivo: W-hemorphin-7. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 246, n. 3, p. 719-724, 1998.

FUKUDA, K. et al. Functional coupling of the delta-, mu-, and kappa-opioid receptors to mitogen-activated protein kinase and arachidonate release in chinese hamster ovary cells. **Journal of Neurochemistry**, v. 67, n. 3, p. 1309-1316, 1996.

GALLUZZI, K. E. Managing neuropathic pain. **Journal of the American Osteopathic Association**, v. 107, n. 10, p. ES39-48, 2007. Suppl. 6.

GARRIDO, P. A. G. et al. Confocal microscopy reveals thimet oligopeptidase (ec 3.4.24.15) and neurolysin (ec 3.4.24.16) in the classical secretory pathway. **DNA and Cell Biology**, v. 18, n. 4, p. 323-331, 1999.

GELMAN, J. S. et al. Analysis of peptides secreted from cultured mouse brain tissue. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics**, 2013. In press.

GELMAN, J. S. et al. Hemopressins and other hemoglobin-derived peptides in mouse brain: Comparison between brain, blood, and heart peptidome and regulation in cpefat/fat mice. **Journal of Neurochemistry**, v. 113, n. 4, p. 871-880, 2010.

GELMAN, J. S. et al. Peptidomic analysis of human cell lines. **Journal of Proteome Research**, v. 10, n. 4, p. 1583-1592, 2011.

GLAMSTA, E. L. et al. Isolation and characterization of a hemoglobin-derived opioid peptide from the human pituitary gland. **Regulatory Peptides**, v. 34, n. 3, p. 169-179, 1991.

GLAMSTA, E. L. et al. Isolation of a hemoglobin-derived opioid peptide from cerebrospinal fluid of patients with cerebrovascular bleedings. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 184, n. 2, p. 1060-1066, 1992.

GLAMSTA, E. L. et al. Concomitant increase in blood plasma levels of immunoreactive hemorphin-7 and beta-endorphin following long distance running. **Regulatory Peptides**, v. 49, n. 1, p. 9-18, 1993.

GOLDSTEIN, A. et al. Porcine pituitary dynorphin: Complete amino acid sequence of the biologically active heptadecapeptide. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 78, n. 11, p. 7219-7223, 1981.

GOLDSTEIN, A. et al. Dynorphin-(1-13), an extraordinarily potent opioid peptide. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 76, n. 12, p. 6666-6670, 1979.

GOMES, I. et al. Hemoglobin-derived peptides as novel type of bioactive signaling molecules. **AAPS Journal**, v. 12, n. 4, p. 658-669, 2010.

GOMES, I.; FILIPOVSKA, J.; DEVI, L. A. Opioid receptor oligomerization: detection and functional characterization of interacting receptors. **Methods in Molecular Medicine** v. 84, p. 157-183, 2003.

GOMES, I. et al. Novel endogenous peptide agonists of cannabinoid receptors. **Faseb Journal**, v. 23, n. 9, p. 3020-3029, 2009.

GOMES, M. D. et al. Dynorphin-derived peptides reveal the presence of a critical cysteine for the activity of brain endo-oligopeptidase-a. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 197, n. 2, p. 501-507, 1993.

GOMEZ, R. et al. Metallopeptidase inhibition potentiates bradykinin-induced hyperalgesia. **Pain**, v. 152, n. 7, p. 1548-1554, 2011.

GRANADOS-SOTO, V. et al. Evidence for the involvement of the nitric oxide-cgmp pathway in the antinociception of morphine in the formalin test. **European Journal of Pharmacology**, v. 340, n. 2-3, p. 177-180, 1997.

GRAVI, E. T. et al. Identification of a metallopeptidase with top-like activity in *paracoccidioides brasiliensis*, with increased expression in a virulent strain. **Medical Mycology**, v. 50, n. 1, p. 81-90, 2012.

GREENFIELD, N. J. Applications of circular dichroism in protein and peptide analysis. **Trac-Trends in Analytical Chemistry**, v. 18, n. 4, p. 236-244, 1999.

GRISEL, J. E.; WATKINS, L. R.; MAIER, S. F. Associative and non-associative mechanisms of morphine analgesic tolerance are neurochemically distinct in the rat spinal cord. **Psychopharmacology (Berl)**, v. 128, n. 3, p. 248-255, 1996.

GUTSTEIN, H. B. et al. Opioid effects on mitogen-activated protein kinase signaling cascades. **Anesthesiology**, v. 87, n. 5, p. 1118-1126, 1997.

HARRISON, L. M.; KASTIN, A. J.; ZADINA, J. E. Opiate tolerance and dependence: receptors, g-proteins, and antiopiates. **Peptides**, v. 19, n. 9, p. 1603-1630, 1998.

HASSAN, A. H. S. et al. Inflammation of the rat paw enhances axonal-transport of opioid receptors in the sciatic-nerve and increases their density in the inflamed tissue. **Neuroscience**, v. 55, n. 1, p. 185-195, 1993.

HEIMANN, A. S. et al. Hemopressin is an inverse agonist of cb1 cannabinoid receptors. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 104, n. 51, p. 20588-20593, 2007.

HOLDEN, J. E.; PIZZI, J. A. The challenge of chronic pain. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 55, n. 8, p. 935-948, 2003.

HORSTHEMKE, B.; BAUER, K. Characterization of a nonchymotrypsin-like endopeptidase from anterior pituitary that hydrolyzes luteinizing hormone-releasing hormone at the tyrosyl-glycine and histidyl-tryptophan bonds. **Biochemistry**, v. 19, n. 13, p. 2867-2873, 1980.

HUGHES, J. et al. Identification of two related pentapeptides from the brain with potent opiate agonist activity. **Nature**, v. 258, n. 5536, p. 577-580, 1975.

ITO, S.; OKUDA-ASHITAKA, E.; MINAMI, T. Central and peripheral roles of prostaglandins in pain and their interactions with novel neuropeptides nociceptin and nocistatin. **Neuroscience Research**, v. 41, n. 4, p. 299-332, 2001.

IVANOV, V. T. et al. Hemoglobin as a source of endogenous bioactive peptides: The concept of tissue-specific peptide pool. **Biopolymers**, v. 43, n. 2, p. 171-188, 1997.

JONGKAMONWIWAT, N. et al. The presence of opioid receptors in rat inner ear. **Hearing Research**, v. 181, n. 1-2, p. 85-93, 2003.

JULIUS, D.; BASBAUM, A. I. Molecular mechanisms of nociception. **Nature**, v. 413, n. 6852, p. 203-210, 2001.

KAKIDANI, H. et al. Cloning and sequence analysis of cDNA for porcine beta-neo-endorphin/dynorphin precursor. **Nature**, v. 298, n. 5871, p. 245-249, 1982.

KALKHOF, S.; SINZ, A. Chances and pitfalls of chemical cross-linking with amine-reactive n-hydroxysuccinimide esters. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 392, n. 1-2, p. 305-312, 2008.

KARELIN, A. A. et al. Isolation of endogenous hemorphin-related hemoglobin fragments from bovine brain. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 202, n. 1, p. 410-415, 1994.

KELLY, S. M.; PRICE, N. C. The use of circular dichroism in the investigation of protein structure and function. **Current Protein & Peptide Science**, v. 1, n. 4, p. 349-384, 2000.

KESSLER, J. H. et al. Antigen processing by nardilysin and thimet oligopeptidase generates cytotoxic t cell epitopes. **Nature Immunology**, v. 12, n. 1, p. 45-U67, 2011.

KEST, B.; ORLOWSKI, M.; BODNAR, R. J. Endopeptidase 24.15 inhibition and opioid antinociception. **Psychopharmacology (Berl)**, v. 106, n. 3, p. 408-416, 1992.

KEST, B. et al. Antinociceptive properties of inhibitors of endopeptidase 24.15. **International Journal of Neuroscience**, v. 56, n. 1-4, p. 141-149, 1991.

KIDD, B. L.; URBAN, L. A. Mechanisms of inflammatory pain. **British Journal of Anaesthesia**, v. 87, n. 1, p. 3-11, 2001.

KIM, S. H.; CHUNG, J. M. An experimental-model for peripheral neuropathy produced by segmental spinal nerve ligation in the rat. **Pain**, v. 50, n. 3, p. 355-363, 1992.

KIM, S. I. et al. Regulation of cell-surface major histocompatibility complex class i expression by the endopeptidase ec3.4.24.15 (thimet oligopeptidase). **Biochemical Journal**, v. 375, p. 111-120, 2003.

KISSELEV, A. F. et al. The sizes of peptides generated from protein by mammalian 26 and 20 s proteasomes - implications for understanding the degradative mechanism and antigen presentation. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 274, n. 6, p. 3363-3371, 1999.

KOHNO, T. et al. Peripheral axonal injury results in reduced mu opioid receptor pre- and post-synaptic action in the spinal cord. **Pain**, v. 117, n. 1-2, p. 77-87, 2005.

KORHONEN, H. et al. Impact of processing on bioactive proteins and peptides. **Trends in Food Science & Technology**, v. 9, n. 8-9, p. 307-319, 1998.

KOSTERLITZ, H. W.; PATERSON, S. J.; ROBSON, L. E. Characterization of the kappa-subtype of the opiate receptor in the guinea-pig brain. **British Journal of Pharmacology**, v. 73, n. 4, p. 939-949, 1981.

KURAISHI, Y. et al. Suppression by gabapentin of pain-related mechano-responses in mice given orthotopic tumor inoculation. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 26, n. 4, p. 550-552, 2003.

LEE, B. H. et al. Behavioral characteristics of a mouse model of cancer pain. **Yonsei Medical Journal**, v. 46, n. 2, p. 252-259, 2005.

LEE, J. et al. Effect of i.C.V. injection of at4 receptor ligands, nle1-angiotensin iv and lvv-hemorphin 7, on spatial learning in rats. **Neuroscience**, v. 124, n. 2, p. 341-349, 2004.

LEW, R. A. et al. Peptidases that degrade gonadotropin-releasing hormone: influence on lh secretion in the ewe. **Journal of Neuroendocrinology**, v. 9, n. 9, p. 707-712, 1997.

LI, C. H.; CHUNG, D. Isolation and structure of an untriakontapeptide with opiate activity from camel pituitary glands. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 73, n. 4, p. 1145-1148, 1976.

LOESER, J. D.; MELZACK, R. Pain: an overview. **Lancet**, v. 353, n. 9164, p. 1607-1609, 1999.

LUGER, N. M. et al. Efficacy of systemic morphine suggests a fundamental difference in the mechanisms that generate bone cancer vs. Inflammatory pain. **Pain**, v. 99, n. 3, p. 397-406, 2002.

MACFARLANE, B. V. et al. Chronic neuropathic pain and its control by drugs. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 75, n. 1, p. 1-19, 1997.

MACHADO, M. F. M. et al. The role of tyr(605) and ala(607) of thimet oligopeptidase and tyr(606) and gly(608) of neurolysin in substrate hydrolysis and inhibitor binding. **Biochemical Journal**, v. 404, p. 279-288, 2007.

MAKINEN, K. K.; SEWON, L.; MAKINEN, P. Analysis in gingival crevicular fluid of two oligopeptides derived from human hemoglobin beta-chain. **Journal of Periodontal Research**, v. 31, n. 1, p. 43-46, 1996.

MARKENSON, J. A. Mechanisms of chronic pain. **The American Journal of Medicine**, v. 101, n. 1A, p. 6S-18S, 1996.

MATSUMOTO, M. et al. Pharmacological switch in a beta-fiber stimulation-induced spinal transmission in mice with partial sciatic nerve injury. **Molecular Pain**, v. 4, n. 25, p. 1-12, 2008.

MCKIE, N. et al. Thimet oligopeptidase - similarity to soluble angiotensin ii-binding protein and some corrections to the published amino-acid-sequence of the rat testis enzyme. **Biochemical Journal**, v. 295, p. 57-60, 1993.

MEISEL, H.; FRISTER, H.; SCHLIMME, E. Biologically-active peptides in milk-proteins. **Zeitschrift Fur Ernährungswissenschaft**, v. 28, n. 4, p. 267-278, 1989.

MILLAN, M. J. The induction of pain: an integrative review. **Progress in Neurobiology**, v. 57, n. 1, p. 1-164, 1999.

MILLAN, M. J. Descending control of pain. **Progress in Neurobiology**, v. 66, n. 6, p. 355-474, 2002.

MOISAN, S. et al. Structural requirements and mechanism of the pressor activity of leu-val-val-hemorphin-7, a fragment of hemoglobin beta-chain in rats. **Peptides**, v. 19, n. 1, p. 119-131, 1998.

MOLINEAUX, C. J.; AYALA, J. M. An inhibitor of endopeptidase-24.15 blocks the degradation of intraventricularly administered dynorphins. **Journal of Neurochemistry**, v. 55, n. 2, p. 611-618, 1990.

MORANO, C.; ZHANG, X.; FRICKER, L. D. Multiple isotopic labels for quantitative mass spectrometry. **Analytical Chemistry**, v. 80, n. 23, p. 9298-9309, 2008.

MOUSA, S. A. et al. Beta-endorphin, met-enkephalin and corresponding opioid receptors within synovium of patients with joint trauma, osteoarthritis and rheumatoid arthritis. **Annals of the Rheumatic Diseases**, v. 66, n. 7, p. 871-879, 2007.

MYERS, R. R.; HECKMAN, H. M.; POWELL, H. C. Axonal viability and the persistence of thermal hyperalgesia after partial freeze lesions of nerve. **Journal of the Neurological Sciences**, v. 139, n. 1, p. 28-38, 1996.

MYERS, R. R. et al. The role of focal nerve ischemia and wallerian degeneration in peripheral-nerve injury producing hyperesthesia. **Anesthesiology**, v. 78, n. 2, p. 308-316, 1993.

NAKANISHI, S. et al. Nucleotide sequence of cloned cDNA for bovine corticotropin-beta-lipotropin precursor. **Nature**, v. 278, n. 5703, p. 423-427, 1979.

NARITA, M. et al. Lack of the involvement of mu(1)-opioid receptor subtype on motivational effects induced by the endogenous mu-opioid receptor ligands endomorphin-1 and-2 in the mouse. **Neuroscience Letters**, v. 308, n. 1, p. 17-20, 2001.

NISHIMURA, K.; HAZATO, T. Isolation and identification of an endogenous inhibitor of enkephalin-degrading enzymes from bovine spinal cord. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 194, n. 2, p. 713-719, 1993.

NODA, M. et al. Cloning and sequence analysis of cDNA for bovine adrenal preproenkephalin. **Nature**, v. 295, n. 5846, p. 202-206, 1982.

NYBERG, F.; SANDERSON, K.; GLAMSTA, E. L. The hemorphins: A new class of opioid peptides derived from the blood protein hemoglobin. **Biopolymers**, v. 43, n. 2, p. 147-156, 1997.

OLIVEIRA, V. et al. Substrate specificity characterization of recombinant metallo oligopeptidases thimet oligopeptidase and neurolysin. **Biochemistry**, v. 40, n. 14, p. 4417-4425, 2001.

OLMARKER, K.; RYDEVIK, B. Selective inhibition of tumor necrosis factor-alpha prevents nucleus pulposus-induced thrombus formation, intraneural edema, and reduction of nerve conduction velocity - possible implications for future pharmacologic treatment strategies of sciatica. **Spine**, v. 26, n. 8, p. 863-869, 2001.

OLSSON, Y. Microenvironment of the peripheral nervous-system under normal and pathological conditions. **Critical Reviews in Neurobiology**, v. 5, n. 3, p. 265-311, 1990.

ORLOWSKI, M.; MICHAUD, C.; CHU, T. G. A soluble metalloendopeptidase from rat brain. Purification of the enzyme and determination of specificity with synthetic and natural peptides. **European Journal of Biochemistry**, v. 135, n. 1, p. 81-88, 1983.

PAN, H. L. et al. Modulation of pain transmission by g-protein-coupled receptors. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 117, n. 1, p. 141-161, 2008.

PARADA, C. A. et al. Activation of presynaptic nmda receptors coupled to nav1.8-resistant sodium channel c-fibers causes retrograde mechanical nociceptor sensitization. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 100, n. 5, p. 2923-2928, 2003.

PASCHOALIN, T. et al. Characterization of thimet oligopeptidase and neurolysin activities in b16f10-nex2 tumor cells and their involvement in angiogenesis and tumor growth. **Molecular Cancer**, v. 6, n. 44, p. 1-14, 2007.

PATTNAIK, P. Surface plasmon resonance - applications in understanding receptor-ligand interaction. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 126, n. 2, p. 79-92, 2005.

PEDERSEN, L. H.; SCHEEL-KRUGER, J.; BLACKBURN-MUNRO, G. Amygdala gaba-a receptor involvement in mediating sensory-discriminative and affective-motivational pain responses in a rat model of peripheral nerve injury. **Pain**, v. 127, n. 1-2, p. 17-26, 2007.

PERL, E. R. Somatosensory mechanisms. **Annual Review of Physiology**, v. 25, p. 459-492, 1963.

PERT, C. B.; SNYDER, S. H. Opiate receptor - demonstration in nervous-tissue. **Science**, v. 179, n. 4077, p. 1011-1014, 1973.

PHIPPS, R. P.; STEIN, S. H.; ROPER, R. L. A new view of prostaglandin-e regulation of the immune-response. **Immunology Today**, v. 12, n. 10, p. 349-352, 1991.

PIEROTTI, A. R. et al. Endopeptidase-24.15 in rat hypothalamic/pituitary/gonadal axis. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 76, n. 1-3, p. 95-103, 1991.

PIOT, J. M. et al. Isolation and characterization of two opioid peptides from a bovine hemoglobin peptic hydrolysate. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 189, n. 1, p. 101-110, 1992.

POLAKIEWICZ, R. D. et al. A mitogen-activated protein kinase pathway is required for mu-opioid receptor desensitization. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 273, n. 20, p. 12402-12406.

PORTARO, F. C. V. et al. Thimet oligopeptidase and the stability of mhc class i epitopes in macrophage cytosol. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 255, n. 3, p. 596-601, 1999.

PRZEWLOCKI, R.; PRZEWLOCKA, B. Opioids in chronic pain. **European Journal of Pharmacology**, v. 429, n. 1-3, p. 79-91, 2001.

PUEHLER, W. et al. Interleukin-1 beta contributes to the upregulation of kappa opioid receptor mRNA in dorsal root ganglia in response to peripheral inflammation. **Neuroscience**, v. 141, n. 2, p. 989-998, 2006.

PUEHLER, W. et al. Rapid upregulation of mu opioid receptor mRNA in dorsal root ganglia in response to peripheral inflammation depends on neuronal conduction. **Neuroscience**, v. 129, n. 2, p. 473-479, 2004.

RANDALL, L. O.; SELITTO, J. J. A method for measurement of analgesic activity on inflamed tissue. **Archives Internationales De Pharmacodynamie Et De Therapie**, v. 111, n. 4, p. 409-419, 1957.

RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M. **Farmacologia**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 1997.

RAWLINGS, N. D.; BARRETT, A. J. Evolutionary families of metallopeptidases. **Proteolytic Enzymes: Aspartic and Metallo Peptidases**, v. 248, p. 183-228, 1995.

RAY, K. et al. Crystal structure of human thimet oligopeptidase provides insight into substrate recognition, regulation, and localization. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 19, p. 20480-20489, 2004.

RECHTHAND, E.; RAPOPORT, S. I. Regulation of the microenvironment of peripheral-nerve - role of the blood nerve barrier. **Progress in Neurobiology**, v. 28, n. 4, p. 303-343, 1987.

REISINE, T. et al. Molecular mechanisms of opiate receptor coupling to G proteins and effector systems. **Neuropeptides: Basic and Clinical Advances**, v. 780, p. 168-175, 1996.

REITS, E. et al. A major role for TPII in trimming proteasomal degradation products for MHC class I antigen presentation. **Immunity**, v. 20, n. 4, p. 495-506, 2004.

REN, K.; DUBNER, R. Descending modulation in persistent pain: an update. **Pain**, v. 100, n. 1-2, p. 1-6, 2002.

RIEDEL, W.; NEECK, G. Nociception, pain, and antinociception: current concepts. **Zeitschrift Fur Rheumatologie**, v. 60, n. 6, p. 404-415, 2001.

RIOLI, V. et al. Novel natural peptide substrates for endopeptidase 24.15, neurolysin, and angiotensin-converting enzyme. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 10, p. 8547-8555, 2003.

RIOLI, V. et al. Neuropeptide specificity and inhibition of recombinant isoforms of the endopeptidase 3.4.24.16 family: Comparison with the related recombinant endopeptidase 3.4.24.15. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 250, n. 1, p. 5-11, 1998.

ROTHMAN, R. B. et al. Pharmacological activities of optically pure enantiomers of the kappa-opioid agonist, u50,488, and its cis diastereomer - evidence for 3 kappa-receptor subtypes. **European Journal of Pharmacology**, v. 167, n. 3, p. 345-353, 1989.

RUSSO, L. C. et al. Natural intracellular peptides can modulate the interactions of mouse brain proteins and thimet oligopeptidase with 14-3-3e and calmodulin. **Proteomics**, v. 12, n. 17, p. 2641-2655, 2012a.

RUSSO, L. C. et al. Inhibition of thimet oligopeptidase by sirna alters specific intracellular peptides and potentiates isoproterenol signal transduction. **FEBS Letters**, v. 586, n. 19, p. 3287-92, 2012b.

RUSSO, L. C. et al. Interaction with calmodulin is important for the secretion of thimet oligopeptidase following stimulation. **FEBS Journal**, v. 276, n. 16, p. 4358-4371, 2009.

SACHS, D.; CUNHA, F. Q.; FERREIRA, S. H. Peripheral analgesic blockade of hypernociception: Activation of arginine/no/cgmp/protein kinase g/atp-sensitive k⁺ channel pathway. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 101, n. 10, p. 3680-3685, 2004.

SAH, D. W. Y.; OSSIPOV, M. H.; PORRECA, F. Neurotrophic factors as novel therapeutics for neuropathic pain. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 2, n. 6, p. 460-472, 2003.

SANDERSON, K.; NYBERG, F.; KHALIL, Z. Modulation of peripheral inflammation by locally administered hemorphin-7. **Inflammation Research**, v. 47, n. 2, p. 49-55, 1998.

SARIC, T.; GRAEF, C. I.; GOLDBERG, A. L. Pathway for degradation of peptides generated by proteasomes - a key role for thimet oligopeptidase and other metallopeptidases. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 45, p. 46723-46732, 2004.

SASAMURA, T. et al. Morphine analgesia suppresses tumor growth and metastasis in a mouse model of cancer pain produced by orthotopic tumor inoculation. **European Journal of Pharmacology**, v. 441, n. 3, p. 185-191, 2002.

SCHAIBLE, H. G.; RICHTER, F. Pathophysiology of pain. **Langenbecks Archives of Surgery**, v. 389, n. 4, p. 237-243, 2004.

SCHANBACHER, F. L. et al. Milk-borne bioactive peptides. **International Dairy Journal**, v. 8, n. 5-6, p. 393-403, 1998.

SCHEFFLER, H. et al. Hemorphin-4 stimulates the release of a dynorphin immunoreactive material from rat pituitary tissue. In:_____. **New leads in opioid research**. Amsterdam: Elsevier, 1990. p. 379-380.

SCHULTZ, J. E.; GROSS, G. J. Opioids and cardioprotection. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 89, n. 2, p. 123-137, 2001.

SCHWEI, M. J. et al. Neurochemical and cellular reorganization of the spinal cord in a murine model of bone cancer pain. **Journal of Neuroscience**, v. 19, n. 24, p. 10886-10897, 1999.

SELTZER, Z.; DUBNER, R.; SHIR, Y. A novel behavioral-model of neuropathic pain disorders produced in rats by partial sciatic-nerve injury. **Pain**, v. 43, n. 2, p. 205-218, 1990.

SERRA, J. Overview of neuropathic pain syndromes. **Acta Neurologica Scandinavica**, v. 100, p. 7-11, 1999.

SHIMOYAMA, M. et al. Change of dorsal horn neurochemistry in a mouse model of neuropathic cancer pain. **Pain**, v. 114, n. 1-2, p. 221-230, 2005.

SHRIMPTON, C. N. et al. Thiol activation of endopeptidase ec 3.4.24.15 - a novel mechanism for the regulation of catalytic activity. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 272, n. 28, p. 17395-17399, 1997.

SHRIMPTON, C. N.; SMITH, A. I.; LEW, R. A. Soluble metalloendopeptidases and neuroendocrine signaling. **Endocrine Reviews**, v. 23, n. 5, p. 647-664, 2002.

SIGMAN, J. A. et al. Ph dependence studies provide insight into the structure and mechanism of thimet oligopeptidase (ec 3.4.24.15). **FEBS Letters**, v. 545, n. 2-3, p. 224-228, 2003.

SILVA, C. L. et al. Thimet oligopeptidase (ec 3.4.24.15), a novel protein on the route of mhc class i antigen presentation. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 255, n. 3, p. 591-595, 1999.

SIMON, E. J. Citation classic - stereospecific binding of the potent narcotic analgesic [h-3]etorphine to rat-brain homogenate. **Current Contents/Life Sciences**, n. 41, p. 19-19, 1988.

SMITH, A. L. et al. A novel stable inhibitor of endopeptidases EC 3.4.24.15 and 3.4.24.16 potentiates bradykinin-induced hypotension. **Hypertension**, v. 35, n. 2, p. 626-630, 2000.

SONG, C. Z. et al. Inhibition of intraerythrocytic proteasome retards the generation of hemorphins. **Peptides**, v. 33, n. 1, p. 170-173, 2012.

STEIN, C.; GRAMSCH, C.; HERZ, A. Intrinsic mechanisms of antinociception in inflammation - local opioid receptors and beta-endorphin. **Journal of Neuroscience**, v. 10, n. 4, p. 1292-1298, 1990.

STEIN, C.; SCHAFER, M.; MACHELSKA, H. Attacking pain at its source: new perspectives on opioids. **Nature Medicine**, v. 9, n. 8, p. 1003-1008, 2003.

STEIN, C.; ZOLLNER, C. Opioids and sensory nerves. **Handbook of Experimental Pharmacology**, n. 194, p. 495-518, 2009.

TEIXEIRA, M. J.; PIMENTA, C. A. M. Introdução: a evolução do conhecimento. In: _____. **Dor: conceitos gerais**. São Paulo: LIMAY, 1994. p. 3-7.

TELFORD, S. E. et al. Role of angiotensin-converting enzyme in the vascular effects of an endopeptidase-24.15 inhibitor. **British Journal of Pharmacology**, v. 114, n. 6, p. 1185-1192, 1995.

TERENIUS, L. Stereospecific interaction between narcotic analgesics and a synaptic plasma membrane fraction of rat cerebral cortex. **Acta Pharmacologica et Toxicologica**, v. 32, n. 3, p. 317-320, 1973.

TRAYNOR, J. Subtypes of the κ -opioid receptor - fact or fiction. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 10, n. 2, p. 52-53, 1989.

TRAYNOR, J. R.; ELLIOTT, J. Delta-opioid receptor subtypes and cross-talk with mu-receptors. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 14, n. 3, p. 84-86, 1993.

VAN RIJN, R. M.; WHISTLER, J. L.; WALDHOER, M. Opioid-receptor-heteromer-specific trafficking and pharmacology. **Current Opinion in Pharmacology**, v. 10, n. 1, p. 73-79, 2010.

VERRI JR., W. A. et al. Cytokine inhibitors and pain control. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 47, p. 341-353, 2007.

WALDHOER, M.; BARTLETT, S. E.; WHISTLER, J. L. Opioid receptors. **Annual Review of Biochemistry**, v. 73, p. 953-990, 2004.

WENZEL, T. et al. Existence of a molecular ruler in proteasomes suggested by analysis of degradation products. **FEBS Letters**, v. 349, n. 2, p. 205-209, 1994.

WILKER, E. W. et al. A structural basis for 14-3-3 sigma functional specificity. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n. 19, p. 18891-18898, 2005.

WINKELSTEIN, B. A. Mechanisms of central sensitization, neuroimmunology & injury biomechanics in persistent pain: implications for musculoskeletal disorders. **Journal of Electromyography and Kinesiology**, v. 14, n. 1, p. 87-93, 2004.

WONG, S. S. **Chemistry of protein conjugation and cross-linking**. Florida, United States: CRC Press, 1993.

WOOLF, C. J. Pain. **Neurobiology of Disease**, v. 7, n. 5, p. 504-510, 2000.

WOOLF, C. J. Dissecting out mechanisms responsible for peripheral neuropathic pain: Implications for diagnosis and therapy. **Life Sciences**, v. 74, n. 21, p. 2605-2610, 2004a.

WOOLF, C. J. Pain: moving from symptom control toward mechanism-specific pharmacologic management. **Annals of Internal Medicine**, v. 140, n. 6, p. 441-451, 2004b.

WOOLF, C. J.; MANNION, R. J. Neuropathic pain: aetiology, symptoms, mechanisms, and management. **Lancet**, v. 353, n. 9168, p. 1959-1964, 1999.

WOOLF, C. J.; SALTER, M. W. Neuroscience - neuronal plasticity: increasing the gain in pain. **Science**, v. 288, n. 5472, p. 1765-1768, 2000.

WU, T. J.; PAGANO, E.; MANI, S. K. A biological role for the gonadotrophin-releasing hormone (gnrh) metabolite, gnrh-(1-5). **Journal of Neuroendocrinology**, v. 21, n. 4, p. 293-298, 2009.

YAKSH, T. L. Spinal systems and pain processing: development of novel analgesic drugs with mechanistically defined models. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 20, n. 8, p. 329-337, 1999.

YORK, I. A. et al. The cytosolic endopeptidase, thimet oligopeptidase, destroys antigenic peptides and limits the extent of mhc class i antigen presentation. **Immunity**, v. 18, n. 3, p. 429-440, 2003.

ZHANG, H. W. et al. Mechanical hypersensitivity and alterations in cutaneous nerve fibers in a mouse model of skin cancer pain. **Journal of Pharmacological Sciences**, v. 91, n. 2, p. 167-170, 2003.

ZHANG, X. et al. Down-regulation of mu-opioid receptors in rat and monkey dorsal root ganglion neurons and spinal cord after peripheral axotomy. **Neuroscience**, v. 82, n. 1, p. 223-240, 1998.

ZIMMERMANN, M. Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. **Pain**, v. 16, n. 2, p. 109-110, 1983.

ZIMMERMANN, M. Pathobiology of neuropathic pain. **European Journal of Pharmacology**, v. 429, n. 1-3, p. 23-37, 2001.