

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

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.

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

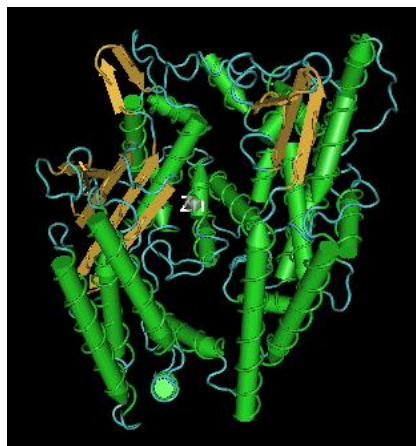
2.1 Endopeptidase EP24.15 e os peptídeos intracelulares

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-glutatiolação, 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 proteossoma, 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 revertem 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, citocrofina e hemorfina, 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 anti-diarréicos, 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 cefalorraquidiano (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 proteossoma intraeritrocítico retarda a geração de hemorfinas, sugerindo que o proteossoma 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; NISTRÌ, 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 μm 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 μm e têm velocidade de transmissão de 12 - 30 m/s. Fibras não mielinizadas do tipo C possuem diâmetro entre 0,4 - 1,2 μm 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 conseqüente 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 (KURAIISHI 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).

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.; NISTRÌ, 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 TÉCNICAS. **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 *in vivo*. **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-neoendorphin/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.
- KURASHI, 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 Tpp1 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/nitric oxide/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 metalloproteinases. **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.; SCHAFFER, 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 μ -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.