

ROSEANE DURANTE FRANCO

Caracterização fenotípica de camundongos *knockout* para as oligopeptidases thimet oligopeptidase e neuropilina

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo para obtenção do Título de Doutora em Farmacologia.

Área de concentração: Farmacologia

Orientador: Prof. Dr. Emer Suavinho Ferro

Co-orientadora: Prof. Dra. Rosana Camarini

Versão Original.

São Paulo

2019

RESUMO

FRANCO, R.D. **Caracterização fenotípica de camundongos knockout para as oligopeptidases Thimet oligopeptidase e Neurolisina**. 2019. 96f. Tese (Doutorado em Farmacologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2019.

A ação concomitante do proteassomo e de peptidases intracelulares, como a thimet oligopeptidase (THOP1) e a neurolisina (Nln), podem levar à formação contínua de peptídeos funcionais. O proteassomo controla a disponibilidade de proteínas importantes para a plasticidade sináptica, sendo fundamental para aquisição e manutenção da memória. O objetivo deste trabalho foi avaliar a participação das oligopeptidases THOP1 e Nln em processos de memória e aprendizado. Como modelo experimental foram utilizados camundongos C57BL6 selvagens (WT) ou com supressão genética (*knockout*, KO) da THOP1 (THOP1^{-/-}), Nln (Nln^{-/-}) ou THOP1/Nln (THOP1/Nln^{-/-}). Os resultados obtidos até o momento sugerem que esses animais possuem alterações cognitivas, além de comportamentos semelhantes à depressão e a esquizofrenia. A análise global da expressão gênica no córtex pré-frontal, estriado, hipocampo e hipotálamo desses animais sugere alterações que não puderam ser diretamente relacionadas aos fenótipos observados. Por outro lado, o mRNA dos receptores de dopamina aparece reduzido no córtex pré-frontal e no hipocampo, e aumentado no estriado dos animais THOP1^{-/-} em comparação aos camundongos WT. As análises peptidômicas sugerem a alteração nos níveis relativos de peptídeos como o SANSNPAMAPRE, que tem como precursor o neuropeptídeo somatostatina, e RKGPGPGGGAGGARGGAGGGPSGD, cuja proteína precursora é a neurogranina. A taxa de *turnover* de serotonina e dopamina no córtex pré-frontal dos animais THOP1^{-/-} encontrou-se alterada, o que poderia explicar uma possível correlação funcional com os fenótipos observados. Em conjunto, esses resultados sugerem a participação das oligopeptidases THOP1 e Nln na consolidação da memória e aprendizado, bem como em distúrbios psiquiátricos. Os mecanismos moleculares ainda demandam investigações adicionais, mas sugerem o envolvimento de peptídeos secretados, derivados da somatostatina, e intracelulares, derivados da neurogranina.

Palavras-chave: Thimet oligopeptidases. Expressão gênica. Memória.
Aprendizado.

ABSTRACT

FRANCO, R.D. **Phenotypic characterization of thimet oligopeptidase and neurolysin knockout mice**. 2019. 96p. Thesis (Pharmacology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2019.

The concomitant action of proteasome and intracellular peptidases, such as thimet oligopeptidase (THOP1) and neurolysin (Nln), may lead to the continuous formation of functional peptides. Proteasome controls the availability of proteins and is important for synaptic plasticity, which has been suggested to be essential for memory acquisition and maintenance. Here, our main aim is to evaluate the participation of oligopeptidases THOP1 and Nln in memory and learning processes. Wild type (WT) C57BL6 or genetically modified (knockout) THOP1 (THOP1^{-/-}), Nln (Nln^{-/-}) or THOP1/Nln (THOP1/Nln^{-/-}) mice were used as experimental models. The results obtained suggest that these animals have cognitive alterations, besides behaviors similar to depression and schizophrenic disorder. The global analysis of gene expression in the prefrontal cortex, striatum, hippocampus and hypothalamus of these animals, suggests alterations that could not be directly related to the observed phenotypes. On the other hand, dopamine receptor mRNA appears reduced in the prefrontal cortex and hippocampus, and increased in the striatum of THOP1 - / - mice compared to WT mice. Peptidomic analyzes suggest alterations in the relative level of specific peptides, including SANSNPAMAPRE, derived from somatostatin, and RKGPGGGPGGAGGARGGAGGGPSGD, derived from neurogranin. The turnover rate of serotonin and dopamine in the prefrontal cortex of THOP1^{-/-} was altered, which could explain a possible functional correlation with the observed phenotypes. Taken together, these results suggest the involvement of oligopeptidases THOP1 and Nln in memory and learning consolidation, as well as in psychiatric disorders. The molecular mechanisms still require further investigations, suggesting the involvement of secreted peptides, such the ones derived from somatostatin, and intracellular peptides, such the ones derivative from neurogranin.

Keywords: Thimet oligopeptidases. Gene expression. Memory. Learning.

INTRODUÇÃO

As proteínas são constituintes fundamentais para a organização, sobrevivência, e função dos organismos vivos. Até a década de 40, as proteínas eram consideradas moléculas estáveis, quando Ratner et al. (1940; revisto por GUGGENHEIM, 1991) demonstraram seu equilíbrio dinâmico regulado por síntese e degradação (definido como *proteostase*); a proteostase é absolutamente essencial para a vida. Desde então, estudos relacionados à síntese e degradação de proteínas se tornaram dos mais fascinantes das ciências biológicas.

A degradação seletiva da maior parte das proteínas intracelulares de eucariontes de “vida curta” é efetuada pelo sistema ubiquitina-proteassomo (Figura 1; HERSHKO; CIECHANOVER, 1998). Nesse sistema, ou via de degradação extralisossomal, as proteínas são degradadas efetivamente pelo proteassomo, um mega complexo proteolítico de 1,2 MDa (GROLL et al., 1997). Essas proteínas são degradadas após serem marcadas covalentemente com cadeias de ubiquitina, uma pequena proteína altamente conservada, ou por sinais adicionais de ubiquitinas “não canônicas” (KRAVTSOVA-IVANTSIV; CIECHANOVER, 2012).

A degradação de proteínas pelo sistema extralisossomal ubiquitina-proteassomo desempenha papéis importantes no controle de inúmeros processos celulares, incluindo a progressão do ciclo celular, a transdução de sinal, a regulação da transcrição, a endocitose, a resposta imune, o desenvolvimento, e a morte celular programada. Anormalidades em processos mediados pelo sistema ubiquitina-proteassomo provocam condições patológicas, incluindo a transformação maligna (HERSHKO; CIECHANOVER, 1998). Em eucariontes, por exemplo, de 30 a 90% das proteínas recém-sintetizadas podem ser degradadas pelo proteassoma (GOLDBERG, 2003).

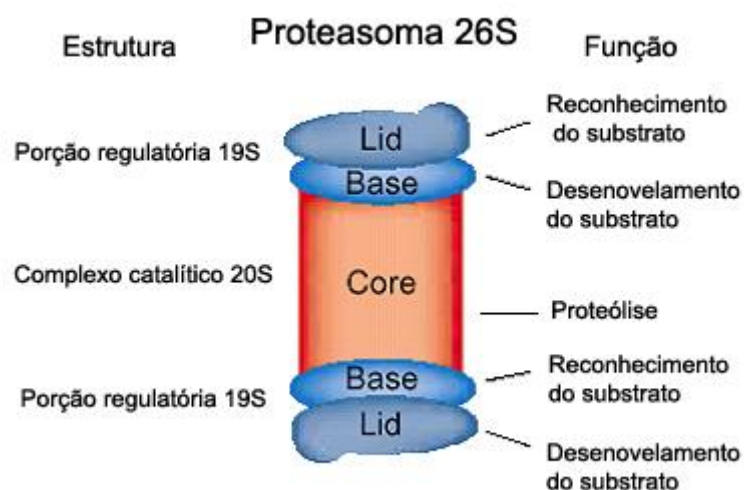


Figura 1 - Representação esquemática do proteassoma 26S. O proteassoma 26S consiste de duas porções regulatórias 19S (“Lid” e “Base”) e um complexo catalítico (“Core”) 20S (Adaptado de Schwechheimer e Deng, 2001).

Desde a descoberta do sistema ubiquitina-proteassoma, reconheceu-se que os peptídeos existiriam transitoriamente dentro de células, pois o proteassoma gera fragmentos contendo entre 2-21 aminoácidos (na média contendo 10-12 aminoácidos) após degradação das proteínas (ROLLAND et al., 2014). Alguns desses peptídeos produzidos pelo proteassoma são transportados para o interior do retículo endoplasmático, onde se associam ao complexo principal de histocompatibilidade I (MHC-I) para serem apresentados como antígenos para células CD8⁺ (REITS et al., 2003).

O conceito aceito nessa área é que apenas um peptídeo por proteína escape da degradação enzimática posterior, sendo o restante degradado, em segundos, por aminopeptidases e utilizado na síntese *de novo* de proteínas (GOLDBERG, 2003; REITS et al., 2003). É nesse contexto que nossos trabalhos acrescentam algo novo, que um grupo de peptídeos escape da degradação proteolítica pós-proteassoma e sejam funcionais no meio intracelular (citossol, mitocôndrias e núcleo); por exemplo, esses peptídeos intracelulares teriam a função de regular interações proteína-proteína (FERRO et al., 2014; FERRO; HYSLOP; CAMARGO, 2004).

1.1 Peptídeos intracelulares

As primeiras descrições de peptídeos intracelulares aparecem na literatura científica no final da década de 50 (MCMANUS, 1958; CONNELL; WATSON, 1957), embora nenhuma função tenha sido descrita para esses peptídeos. Posteriormente, um peptídeo intracelular derivado da proteína acil-CoA foi identificado e denominado “*diazepam binding inibidor*” (DBI), cuja atividade agonista de receptores benzodiazepínicos foi caracterizada (GUIDOTTI et al., 1983; ALHO et al., 1985). Um segundo peptídeo intracelular secretado de leveduras *Saccharomyces cerevisiae* e denominado “a-factor” foi caracterizado como um feromônio de acasalamento (HUYER et al., 2006). O a-factor é produzido dentro do citoplasma por uma série de passos envolvendo ligação de lipídeos (prenilação), clivagens proteolíticas N-terminais por Ste24p e Axl1p, e transporte do citosol para o espaço extracelular por Ste6p (HUYER et al., 2006). Após secreção o a-factor se liga a um receptor específico (Ste3p) e estimula o acasalamento. Tanto para o DBI como para o a-factor a função descrita após secreção é ativação de receptores da membrana plasmática.

Com o desenvolvimento da espectrometria de massas por jato de elétrons (*electron spray*) para moléculas proteicas por Fenn et al. (1989), tornou-se possível o sequenciamento em larga escala de proteínas e peptídeos pela consagrada técnica de *Electron Spray Mass Spectrometry* (ESMS). Nosso laboratório, com a colaboração dos Profs. Fábio Cesar Gozzo e Marcos Eberlin (IQ/UNICAMP), foi um dos pioneiros no Brasil em usar a ESMS para o sequenciamento *de novo* de peptídeos (Patente: PI 0301511-4 A2; RIOLI et al., 2003; HEIMANN et al., 2005).

No trabalho original (RIOLI et al., 2003), foi identificado um pequeno grupo de 15 peptídeos como substratos naturais das oligopeptidases thimet oligopeptidase (THOP1, EP24.15, EC 3.4.24.15) e neurolisina (Nln, EP24.16, EC 3.4.24.16). Uma particularidade desses peptídeos originalmente identificados pelo nosso grupo, foi que as proteínas precursoras eram citosólicas (RIOLI et al, 2003; HEIMANN et al., 2005). A partir desses resultados, propusemos que peptídeos intracelulares poderiam ser reguladores naturais de interações proteína-proteína (FERRO; HYSLOP; CAMARGO, 2004). Os peptídeos intracelulares podem desempenhar funções como aquelas descritas para peptídeos sintéticos racionalmente desenhados e, quando reintroduzidos em células, são capazes de inibir a interação

entre proteínas específicas (QVIT et al., 2017; QVIT; MOCHLY-ROSEN, 2010; FERRO et al., 2014).

Na busca de evidências experimentais que peptídeos intracelulares fossem funcionais, Cunha et al. (2008) identificaram um novo grupo de peptídeos intracelulares que foram reintroduzidos ao meio intracelular e observados modulando positivamente a sinalização de receptores acoplados a proteína G (GPCRs) em células CHO e HEK293; os mesmos peptídeos intracelulares administrados no meio extracelular mostraram-se inativos. A ação dos peptídeos intracelulares modulando a transdução do sinal de GPCRs pode estar correlacionada à significância biológica, o que é relevante se considerarmos que os GPCRs constituem a maior família de receptores da superfície celular, com cerca de 800 diferentes membros codificados por aproximadamente 4% do genoma humano (NORDSTRÖM et al., 2011).

A superexpressão (CUNHA et al., 2008) ou a inibição por siRNA (RUSSO et al., 2012) da THOP1 em células HEK293T causa alteração na transdução do sinal decorrente da ação de agonistas de receptores beta-adrenérgicos ou de angiotensina II; células superexpressando a THOP1 respondem menos a esses agonistas, enquanto células com THOP1 inibida têm uma potenciação dessa resposta (CUNHA et al., 2008; RUSSO et al., 2012). Como essas enzimas são oligopeptidases que metabolizam apenas peptídeos, é possível sugerir que a alteração do conteúdo peptídico intracelular (bem como de um ou outro peptídeo específico) seja responsável pelas alterações observadas na transdução do sinal de GPCRs. Em conjunto, esses estudos sugerem que uma das funções intracelulares da THOP1 é metabolizar peptídeos que modulam a transdução do sinal de agonistas de GPCRs (CUNHA et al., 2008; RUSSO et al., 2012).

Quando os peptídeos intracelulares FE2 e FE3, que potencializam a transdução do sinal da angiotensina II e do isoproterenol (agonista beta adrenérgico) em células CHO-S e HEK293T, foram imobilizados covalentemente em colunas de afinidade, algumas proteínas foram identificadas interagindo (não sabemos se direta ou indiretamente) com eles. Entre as proteínas identificadas estão dinamina (tem um papel crítico nos eventos de fissão da membrana endocítica), adaptina alfa-2 (regulação do transporte de superfície celular) e 14-3-3 ϵ (proteína adaptadora multifuncional), relacionadas à transdução do sinal celular (CUNHA et al., 2008). Utilizando ressonância plasmônica de superfície, investigamos *in vitro* o efeito de

vários peptídeos intracelulares na interação com a cálcio-calmodulina (CAM) ou 14-3-3 ϵ , ambas proteínas importantes no processo de transdução da sinalização celular. Em concentrações de 1-50 μ M, a maior parte dos peptídeos intracelulares testados, incluindo o FE2 e FE3, modularam interações de proteínas do citoplasma do cérebro de ratos com CAM ou 14-3-3 ϵ . Um desses peptídeos intracelulares (VFDVELL; VFD7), que altera marcadamente a interação da THOP1 e de proteínas do citoplasma do cérebro de ratos com ambas CAM e 14-3-3 ϵ , quando introduzido nas células HEK293T, aumenta a concentração do cálcio livre citosólico de forma dose-dependente. Os níveis intracelulares desse peptídeo em células HEK293 são de aproximadamente 16 μ M, sugerindo sua possível relevância biológica no controle da homeostase intracelular de cálcio, cujo mecanismo molecular ainda é desconhecido. Portanto, esses resultados sugerem que os peptídeos intracelulares podem modular interações proteicas, e que esse possa ser um dos mecanismos pelos quais eles são funcionais no meio intracelular (RUSSO et al., 2012).

Corroborando a sugestão que os peptídeos intracelulares tenham função biológica, um trabalho recente do nosso grupo demonstrou que o peptídeo pep5, fragmento da ciclina D2, causa morte celular por apoptose e necrose (ARAÚJO et al., 2014). O pep5 foi encontrado flutuando ao longo do ciclo celular de células HeLa, estando elevado na fase G2/S, sugerindo que em condições normais seja possível que peptídeos intracelulares possam participar do mecanismo de decisão sobre sobrevivência ou morte celular (ARAÚJO et al., 2014; RUSSO et al., 2017). Em células humanas MDA-MB-231 de câncer da mama, a morte celular induzida pelo pep5 é maior quando adicionado na população de células na transição G1/S ou na fase S comparado às células assincrônicas (RUSSO et al., 2017). O pep5 induz uma rápida ativação da fosforilação de ERK1/2 que perdura por até 4 horas em células MDA-MB-231 sincronizadas em G1/S ou S, em comparação com a mesma ativação em células assincrônicas. Utilizando cromatografia de afinidade seguida por espectrometria de massa, identificamos duas proteínas ligando o pep5, sendo elas a *chloride intracellular channel protein 1* e a *plectin*. De fato, o tratamento com pep5 causa uma forte perturbação do citoesqueleto afetando a integridade das fibras de estresse de células MDA-MB-231 (RUSSO et al., 2017).

Como ilustrado (Figura 1), o proteassomo é um complexo proteolítico dependente de ATP e constituído pelas partículas regulatórias 19S, que são responsáveis por reconhecer, desdobrar e encaminhar as proteínas para o interior

do complexo 20S (GOLDBERG, 2003; REITS et al., 2003; KRAVTSOVA-IVANTSIV; CIECHANOVER, 2012; HERSHKO; CIECHANOVER, 1998; LECKER; GOLDBERG, 2002; GROLL et al., 1997). Após indução do proteassomo imune em células HeLa tratadas com interferon- γ (INF- γ), caracterizamos o repertório peptídico intracelular comparativamente às células controle, utilizando ESMS semi-quantitativa. Foram identificados 42 peptídeos, sendo que apenas um (denominado EL28) teve um aumento de 3 vezes em relação ao controle (MONTE-SILVA et al., 2016). O EL28 foi caracterizado como sendo produto de degradação da “26S protease regulatory subunit 4 (*Rpt2*)”. *Rpt2* é uma das 6 ATPase presentes na partícula regulatória 19S do proteassomo, possuindo função relacionada à estabilidade da ligação entre a partícula regulatória 19S e o complexo 20S, bem como de facilitar a entrada de substratos dentro do complexo 20S, através da mudança conformacional do anel α , aumentando a atividade proteolítica do proteassomo (KÖHLER et al., 2001; TIAN et al., 2011).

Ao analisar o efeito do peptídeo EL28 *in vitro* e *in vivo* sobre a atividade do proteassomo, houve um aumento da atividade caspase-, tripsina-, quimotripsina-símile do proteassomo. O significado biológico do EL28 foi avaliado medindo seus efeitos sobre a proliferação de células T CD8⁺. Utilizando esplenócitos murinos de C57BL/6JOT1 (células T CD8⁺ específicas para OVA), há um aumento na proliferação de células T CD8⁺ após tratamento com EL28 (100 pM) comparadas aos controles (MONTE-SILVA et al., 2016; STUMPF et al., 2008).

Dados recentes reforçam a proposta que peptídeos sejam funcionais no meio intracelular, considerando que peptídeos bioativos intracelulares podem ser traduzidos a partir de RNAs derivados de pequenos “*open reading frames*” localizados em sequências não codificantes do DNA nuclear (LAURESSERGUES et al., 2015; ANDREWS; ROTHNAGEL, 2014) ou de DNA mitocondrial (LEE et al., 2015; YEN et al., 2013). Uma análise inicial desses dois grupos de peptídeos (derivados de proteólise comparados a derivados de tradução) sugere que sejam grupos distintos, e não foram observados peptídeos semelhantes entre eles; portanto, haveria dois grupos de peptídeos intracelulares, um derivado de proteólise e outro derivado de tradução direta (FRICKER, FERRO, observações não publicadas).

1.2 Peptídeos intracelulares que atuam em receptores

Uma função dos peptídeos intracelulares é atuar em receptores de superfície celular, como no caso do α -factor de leveduras (HUYER et al., 2006). Dentre os 15 primeiros peptídeos identificados pelo nosso grupo utilizando o método de captura de substratos, um foi denominado hemopressina (PVNFKFLSH) pela sua atividade hipotensora após administração intravenosa em ratos anestesiados (RIOLI et al., 2003). Além dos efeitos hipotensores, a hemopressina administrada intraperitoneal ou oral tem efeitos antinociceptivos relacionados à sua ligação como agonista inverso de receptores canabinóides do tipo 1 (CB1) (DALE et al., 2005; HEIMANN, 2007), bem como pela ativação de receptores vanilóides TRPV1 (TONIOLO et al., 2014; FOGAÇA et al., 2015).

Dodd et al. (2010) sugerem que a hemopressina possa atuar em receptores CB1 modulando a ingestão alimentar e a saciedade do apetite no cérebro de mamíferos, evidenciando seu possível uso terapêutico para o tratamento da obesidade e distúrbios metabólicos relacionados (Patente: PCT/BR2010/000253).

Gomes et al. (2009, 2010) identificaram variantes com extensão de aminoácidos no N-terminal da hemopressina no cérebro de camundongos, que foram definidas como RVD- e VD-hemopressinas. Trabalhos subsequentes de diversos grupos demonstraram que as hemopressinas endógenas são preferencialmente as RVD- e VD-hemopressinas, embora aproximadamente 20 peptídeos contendo a sequência da hemopressina já tenham sido identificados em extratos de cérebro de camundongos (GOMES et al., 2009; BAUER et al., 2012).

Recentemente, Hofer et al. (2015) demonstraram a presença predominante de hemopressinas na medula adrenal, bem como sua presença em neurônios adrenérgicos do sistema nervoso central. Xapelli et al. (2014) mostraram que a hemopressina aumenta a diferenciação de células oligodendrogliais em culturas neurais contendo células-tronco derivadas da região subventricular de camundongos recém-nascidos, atuando como modulador de receptores CB1. Esses resultados sugerem que a hemopressina e seus derivados possam ser de interesse potencial para o desenvolvimento de futuras estratégias para tratar doenças desmielinizantes (XAPELLI et al., 2014; Patent pending PCT/GB2012/051917). Finalmente, vale ressaltar que as hemopressinas foram recentemente citadas como endocannabinóides peptidérgicos em artigo de revisão assinado pelo Prof. Raphael

Mechoulam, Professor of Medicinal Chemistry at the Hebrew University of Jerusalem, Israel (MECHOULAM et al., 2014).

Gelman et al., (2013) sugerem que um percentual de aproximadamente 8% dos peptídeos intracelulares identificados em extratos de fatias de cérebro de camundongos, também podem ser secretados e encontrados no meio de cultura. Algumas formas dos peptídeos intracelulares aparecem apenas no meio de cultura de fatias de cérebro de camundongos, como no caso das hemopressinas RVDPVNFKLL e RVDPVNF, sugerindo que haja processamento proteolítico extracelular para esses peptídeos; o mecanismo de secreção desses peptídeos ainda precisa ser investigado.

Um novo peptídeo intracelular secretado, derivado da hemoglobina e denominado AGH (AGHLDDLPGASAL), foi identificado pelo nosso grupo utilizando o ensaio de captura de substratos combinado com a marcação isotópica e espectrometria de massas (RIBEIRO et al., 2013). O AGH 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 sua 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 THOP1 *in vitro*, podendo estar relacionado com a secreção não convencional da THOP1, entre outros (RIBEIRO et al., 2013).

Utilizando anticorpos sensíveis à mudança de conformação de receptores acoplados à proteína G, foi encontrado um novo peptídeo de sequência DITADDEPLT, que ativa os receptores canabinóides tipo 1 (RECKZIEGEL et al., 2017). Estudos de relação estrutura-atividade, com modificações individuais de aminoácidos, identificaram um peptídeo derivado, DIIADDEPLT (denominado simplesmente "Pep19"), cuja atividade agonista inversa de receptores canabinóides do tipo 1 era ligeiramente melhor que de seu protótipo natural. O Pep19 induziu a expressão da proteína 1 desacopladora da cadeia respiratória (UCP1) em tecido adiposo branco e adipócitos diferenciados derivados de células 3T3-L1. Nessas células diferenciadas, o Pep19 ativa as vias de sinalização pERK1/2 e AKT. A

expressão da UCP1 induzida por Pep19 em adipócitos diferenciados com 3T3-L1 é bloqueada por AM251, um antagonista de receptores de canabinóide tipo 1. A administração oral de Pep19 em ratos Wistar obesos (obesidade induzida por dieta) reduz significativamente o índice de adiposidade, peso corporal total, glicose, triacilglicerol, colesterol e pressão sanguínea, sem alterar a frequência cardíaca. Mudanças no número e tamanho dos adipócitos também foram observadas. O Pep19, ao contrário da hemopressina, não possui efeitos no sistema nervoso central, como sugerido pela falta de indução da expressão da proteína c-Fos no cérebro, toxicidade celular, indução dos comportamentos canabinóides - como depressão e ansiedade. Portanto, o Pep19 tem várias vantagens em relação aos compostos canabinóides periféricamente ativos previamente identificados, podendo no futuro ser utilizado na clínica médica (RECKZIEGEL et al., 2017).

1.3 Oligopeptidases THOP1 e NIn: uma breve revisão

As oligopeptidases THOP1 e NIn são enzimas de atividade específica predominante no sistema nervoso central, que trabalham em sinergia com outros sistemas que participam da manutenção homeostática. Esse papel seria evidente em animais geneticamente modificados para as oligopeptidases THOP1 e/ou NIn que, conforme sugerem resultados prévios (RUSSO et al., 2012; CAVALCANTI et al., 2014; CASTRO et al., 2014), sofrem alterações no conteúdo peptídico intracelular.

Trabalhos anteriores investigaram o fenótipo de camundongos C57BL6 *knockout* para NIn (CAVALCANTI et al., 2014; CASTRO et al., 2014), sugerindo pela primeira vez que a oligopeptidase NIn seja uma enzima chave no metabolismo energético. Esse trabalho ainda sugeriu que a NIn possa vir a ser um novo alvo terapêutico na síndrome metabólica, e que sua inibição possa melhorar a captação de glicose e a sensibilidade à insulina. Os dados também sugerem que *in vivo*, peptídeos intracelulares possam funcionar sinalizando alterações na expressão gênica e, como consequência, afetar o fenótipo dos animais (CAVALCANTI et al., 2014). Essa última possibilidade é uma das mais fascinantes, considerando que os genes e seus produtos não funcionam isoladamente, mas sim como componentes de redes complexas de macromoléculas (DNA, RNA, proteínas e metabólitos)

ligadas através de interações bioquímicas ou físicas, representados nos modelos de redes de interação (Figura 2; SAHNI et al., 2013); nossos trabalhos sugerem que os peptídeos intracelulares têm papel na expressão do fenótipo.

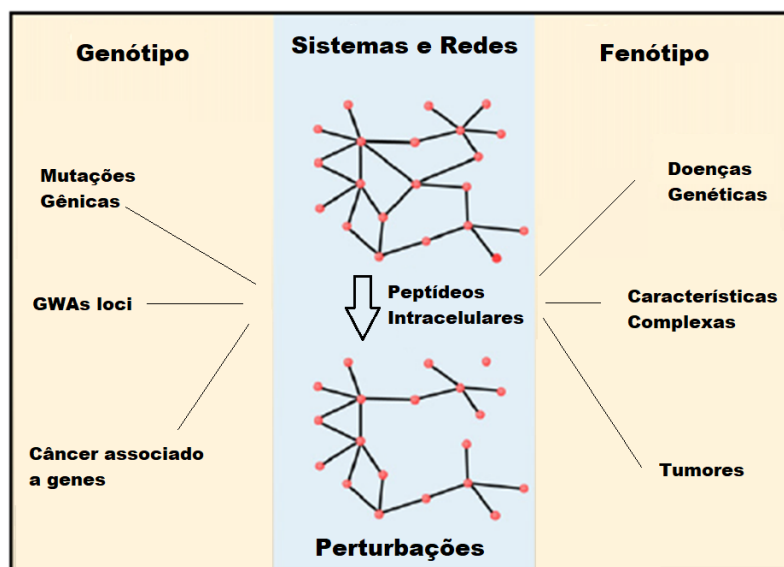


Figura 2 - Perturbações nas redes celulares podem alterar interações entre genótipo-fenótipo. Mudanças na composição de peptídeos intracelulares podem causar perturbações em sistemas biológicos e redes de interações macromoleculares, afetando assim o fenótipo observado. Peptídeos intracelulares podem agir na modulação de interações proteína-proteína, que possam estabilizar ou perturbar interações protéicas dinâmicas como as que ocorrem nas extremidades de complexos protéicos frequentemente associadas a patologias crônicas (adaptado de Vidal et al., 2011).

Em relação à THOP1, esta foi primeiramente identificada em tecidos ricos em neuropeptídeos e hormônios e, posteriormente, constatado ser uma proteína solúvel com específica atividade degradante de neuropeptídeos bioativos incluindo angiotensina, bradicinina, neurotensina, peptídeos opióides e hormônio liberador de gonadotrofina (ORLOWSKI et al., 1983; SHRIMPTON et al., 2002). O fato dessa enzima participar do catabolismo normal de neuropeptídeos é embasado pela evidência anatômica mostrando sua co-localização com seus substratos potenciais ou seus produtos de hidrólise. Assim, a THOP1 é encontrada predominantemente em áreas ricas em neuropeptídeos do cérebro como o estriado e o hipotálamo (HEALY e ORLOWSKI, 1992; GARRIDO et al., 1999; FONTENELE-NETO et al., 2001).

Dentre os neuropeptídeos descritos como substratos da THOP1 podemos citar angiotensina I. O envolvimento e relevância do sistema renina-angiotensina

(SRA) foram claramente estabelecidos em doenças cardiovasculares. Contudo, estudos recentes têm indicado a participação de um SRA cerebral em estudos de memória (DENOBLE et al., 1991; KERR et al., 2005; BONINI et al., 2006; PHILLIPS e DE OLIVEIRA, 2008). Por exemplo, o tratamento com antagonista do receptor de angiotensina 1 (AT1) mostrou uma redução da ansiedade, melhora de aprendizagem, de memória de trabalho espacial e desempenho motor em ratos idosos. Denoble et al. (1991), relataram que a infusão intracerebroventricular de renina atrapalha o aprendizado no teste de esquiva passiva. A administração concomitante do captopril, um inibidor da enzima conversora de angiotensina (ECA), ou antagonista de AT1 atenua o déficit induzido por renina. Inibidores de ECA melhoram a memória em testes de aprendizado por medo ou habituação (KERR et al., 2005; PHILLIPS; OLIVEIRA, 2008)

Outras vias e novos componentes do SRA foram descritos recentemente, como em que a angiotensina -1-7 (Ang-1-7), um heptapeptídeo, liga-se ao receptor Mas. No sistema nervoso central foi relatado que este heptapeptídeo está envolvido nos processos de aprendizagem e memória que ocorrem nas regiões límbicas centrais, tais como o hipocampo e também processos de memória associados ao reconhecimento de objetos (PHILLIPS; OLIVEIRA, 2008). Um estudo mostrou que a Ang-(1-7) é o principal metabólito da angiotensina I em hipocampo de ratos, e surpreendentemente, que THOP1 é a principal enzima envolvida na geração de Ang-(1-7) (PEREIRA et al., 2013).

Baseado nestas informações, constata-se que diversos processos especializados que ocorrem no sistema neuroendócrino, como formação e manutenção de sinapses, liberação de neurotransmissores e hormônios e transporte axonal são regulados por interações proteína-proteína. Compreender os mecanismos moleculares envolvidos requer a identificação das interações protéicas que medeiam tais processos biológicos bem como de moduladores peptídicos como potenciais reguladores das vias de sinalização desencadeadas por tais interações (CARRENO et al., 2005).

1.4 Memória e aprendizado

O turnover de proteínas intracelulares consiste num processo essencial para o funcionamento normal da célula uma vez que o excesso de proteínas envelhecidas e danificadas usualmente leva à formação de agregados insolúveis causando doenças (HERSHKO; CIECHANOVER; VARSHAVSKY, 2000; GLICKMAN; CIECHANOVER, 2002). Além disto, a proteólise regulada é essencial para o funcionamento de neurônios bem como para remodelamento de sinapses durante a plasticidade neuronal, processo pelo qual as conexões sinápticas são modificadas em resposta às experiências e atividades passadas. Esta modificação nas sinapses depende da coordenação da síntese e degradação proteica envolvendo uma variedade de moléculas pré- e pró-sinápticas. A regulação extensiva do proteoma neuronal pelo funcionamento do sistema ubiquitina-proteassomo (UPS) é considerado um processo crítico nos eventos de modificações sinápticas associadas à plasticidade, aprendizado e memória (CAJIGAS; WILL; SCHUMAN, 2010; BINGOL; SHENG, 2011).

O processo de memória compreende aprendizagem, retenção e recuperação. Adquirir nova memória envolve três processos básicos: 1) registro e codificação de informações, na forma de memória sensorial ou de curto prazo; 2) consolidação, que é a transferência da memória registrada de curto prazo em memória de longo prazo; 3) recuperação de informações, ou seja, retirada de informações armazenadas da memória de curto prazo e longo prazo (ANAND et al., 2012). Estudos em modelos animais utilizando técnicas de lesões controladas, inativação farmacológica ou molecular em regiões limitadas ao hipocampo resultaram tanto em falha na aprendizagem bem como perda de memória espacial (MORRIS et al., 1986; TSIEN et al., 1996; PASTALKOVA et al., 2006). Apesar de todas as regiões cerebrais estarem envolvidas no processo de memória, técnicas de neuroimagem comprovaram que é no hipocampo onde ocorrem as maiores alterações moleculares e neuroquímicas após o aprendizado e a retenção das informações. O centro do hipocampo recebe sinais de todas as regiões corticais, desempenhando um papel chave no processamento de informações de múltiplas fontes, e combinando-as para executar certas tarefas de memória espacial e de reconhecimento (ANAND et al., 2012).

A potenciação de longa duração (LTP) é uma atividade dependente do aumento da eficácia sináptica que é considerada como um dos mecanismos celulares que fundamentam a aprendizagem e a memória. Em particular, as formas de LTP que exigem síntese de proteína, referidas como LTP tardia (L-LTP), são supostamente consideradas como homólogos celulares de armazenamento de memória de longo prazo, enquanto que as formas de LTP que não requerem a síntese de proteínas, ou LTP precoce (E-LTP), se acreditam serem homólogos de memória de curto prazo. A degradação de proteínas dependente do proteassomo tem o potencial de controlar a disponibilidade de proteínas importantes para a plasticidade sináptica por contrabalancear a síntese de proteínas, restringindo assim o melhoramento sináptico (CAI et al., 2010; FONSECA et al., 2006).

A exposição a um ambiente novo aumenta a extinção do medo contextual, o que pode ser explicado por alterações em sinapses hipocâmpais utilizadas em extinção de memória, seguidos por captura de proteínas de sinapses que processam novidade. Esse efeito pode ser bloqueado pela inibição da síntese de proteínas no hipocampo bem como pela infusão do antagonista do receptor de 2-amino-5-fosfono ácido pentanóico (NMDA), do inibidor de cálcio/calmodulina-dependente da proteína cinase II (CaMKII), pelo bloqueador dos canais de cálcio L- dependentes de voltagem (L-VDCCs), nifedipina. A inibição da degradação de proteínas pelo inibidor do proteassomo β -lactacistina bloqueia os efeitos inibitórios de todas essas substâncias, corroborando evidências prévias da importância da degradação de proteínas para a aquisição de memória (MYSKIW et al., 2014).

De acordo com o que foi apresentado acima, o presente projeto pretende elucidar a possível relação das oligopeptidases THOP1 e Nln com o processo cognitivo, e tentar entender por meio de quais mecanismos esta relação se apresenta.

CONCLUSÕES

Os animais *knockout* para as oligopeptidases THOP1 ou THOP1/NIn são viáveis, se reproduzem normalmente, e são semelhantes aos animais WT em aparência geral. Foi observado um fenótipo comportamental distinto do WT em alguns testes aplicados, onde os animais THOP1^{-/-} apresentaram um déficit cognitivo relacionado ao medo e um comportamento semelhante à depressão; resultados estes, que após a presença de um déficit de IPP, resultou na hipótese dos animais THOP1^{-/-} apresentarem um comportamento semelhante à esquizofrenia.

Os experimentos de expressão gênica, com alteração nos níveis de expressão dos receptores de dopamina D2 e serotonina 2A em regiões do córtex pré-frontal, hipocampo e estriado e as alterações observadas nas dosagens neuroquímicas, como o *turnover* da dopamina e serotonina, corroboraram para a justificativa do fenótipo observado.

Esses resultados corroboram décadas de estudos que sugerem a contribuição fisiológica essencial da THOP1 e da NIn para a homeostase neuroquímica cerebral. Os exatos mecanismos pelos quais a THOP1 e NIn afetam a aquisição de memória condicionada ao medo, fenótipos semelhantes à esquizofrenia e depressivos, ainda não foram totalmente elucidados nesse trabalho inicial, necessitando assim de investigações futuras.

É possível que os peptídeos intracelulares estejam modulando as interações proteicas, e que esse possa ser um dos mecanismos pelos quais eles são funcionais no meio intracelular. Portanto, as alterações específicas do conteúdo peptídico intracelular, e o fato das oligopeptidases metabolizarem peptídeos que modulam a transdução do sinal, podem ser fatores que estão envolvidos nos fenótipos apresentados.

REFERÊNCIAS

ALHO, H.; COSTA, E.; FERRERO, P.; FUJIMOTO, M.; COSENZA-MURPHY, D. GUIDOTTI, A. Diazepam-binding inhibitor: a neuropeptide located in selected neuronal populations of rat brain. **Science**. v. 229, n. 4709, p.179-82, 1985.

ANAND, A., A. BANIK, K. THAKUR e C. L. MASTERS. The animal models of dementia and Alzheimer's disease for pre-clinical testing and clinical translation. **Curr Alzheimer Res**. v.9, n.9, Nov, p.1010-29. 2012.

ANDREWS, S.J.; ROTHNAGEL, J.A. Emerging evidence for functional peptides encoded by short open reading frames. **Nat Rev Genet**. v.15, n. 3, p.193-204, 2014.

ANTUNES, M.; BIALA, G. The novel object recognition memory: neurobiology, test procedure, and its modifications. **Cogn Process**. v. 13, n. 2, p.93-110, 2012.

ARAÚJO, C.B.; RUSSO, L.C.; CASTRO, L.M.; FORTI, F.L.; MONTE, E.R.; RIOLI, V.; GOZZO, F.C.; COLQUHOUN, A.; FERRO, E.S. A novel intracellular peptide derived from g1/s cyclin d2 induces cell death. **J Biol Chem**. v. 289, n. 24, p.16711-26, 2014.

BARNES, C.A. Memory deficits associated with senescence: a neurophysiological and behavioral study in the rat. **J Comp Physiol Psychol**. v. 93, p. 74-104, 1979.

BAUER, M.; CHICCA, A; TAMBORRINI, M.; EISEN, D.; LERNER, R.; LUTZ, B.; POETZ, O.; PLUSCHKE, G.; GERTSCH, J. Identification and quantification of a new family of peptide endocannabinoids (Pepcans) showing negative allosteric modulation at CB1 receptors. **J Biol Chem**. v. 287, n. 44, p. 36944-67, 2012.

BEREZNIUK, I.; RODRIGUIZ, R.M.; ZEE, M.L.; MARCUS, D.J.; PINTAR, J.; MORGAN, D.J.; WETSEL, W.C.; FRICKER, L.D. ProSAAS-derived peptides are regulated by cocaine and are required for sensitization to the locomotor effects of cocaine. **J Neurochem**. 2017.

BESSA, M. M. **Efeito da α -amirina sobre o filtro sensorio motor de ratos: envolvimento de receptores CB1 e TRPV1 centrais**. Santa Catarina: UFSC, 2013. 100f. Tese (Mestrado em Farmacologia) – Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2013.

BEVINS, R.A.; BESHEER, J. Object recognition in rats and mice: a one-trial non-matching-to-sample learning task to study “recognition memory”. **Nature**. v.01, n.03, 2006.

BINGOL, B.; SHENG, M. Deconstruction for Reconstruction: The Role of Proteolysis in Neural Plasticity and Disease. **Neuron**. v.69, p.22-32, 2011.

BOERSEMA, P.J.; RAIJMAKERS, R.; LEMEER, S.; MOHAMMED, S.; HECK A, J. Multiplex peptide stable isotope dimethyl labeling for quantitative proteomics. **Nat Protoc**. v. 4, n.4, p. 484-94, 2009.

BONINI, J. S.; BEVILAQUA, L.R.; ZINN, C.G.; KERR, D.S.; MEDINA, J.H.; IZQUIERDO, I.; CAMMAROTA, M. Angiotensin II disrupts inhibitory avoidance memory retrieval. **Horm Behav.** v.50, n.2, p.308-13, 2006.

BRISCH, R.; SANIOTIS, A.; WOLF, R.; BIELAU, H.; BERNSTEIN, H.; STEINER, J.; BOGERTS, B.; BRAUNS, K.; JANKOWSKI, Z.; KUMARATILAKE, J.; HENNEBERG, M.; GOS, T. The role of dopamine in schizophrenia from a neurobiological and evolutionary perspective: old fashioned, but still in vogue. **Front. Psychiatry.** v. 5, n. 47, p. 1-11, 2014.

CAFÉ-MENDES, C.C.; FERRO, E.S.; TORRÃO, A.S.; CRUNFLI, F.; RIOLI, V.; SCHMITT, A.; FALKAI, P.; BRITTO, L.R.; TURCK, C.W.; MARTINS-DE-SOUZA, D. Peptidomic analysis of the anterior temporal lobe and corpus callosum from schizophrenia patients. **Journal of Proteomics.** v. 151, p. 97-105, 2017.

CAI, F.; FREY, J.U.; SANNA, P.P; BEHNISCH, T. Protein degradation by the proteasome is required for synaptic tagging and the heterosynaptic stabilization of hippocampal late-phase long-term potentiation. **Neuroscience.** v.169, p. 1520-1526, 2010.

CAJIGAS, I.J.; WILL, T.; SCHUMAN, E.M. Protein homeostasis and synaptic plasticity. **EMBO J.** v.29, p. 2746–2752, 2010.

CALIL, C.M. et al. Analysis of the meaning of the immobility time in swimming experimental models. **Rev. Bras. Cienc. Farm.** v.38, n.4, p.479-485, 2002

CAROBREZ, A.P.; BERTOGLIO, L.J. Ethological and temporal analyses of anxiety-like behavior: the elevated plus-maze model 20 years on. **Neurosci. Biobehav. Rev.** v. 29, p. 1193-1205, 2005.

CARRENO, F. R., C. N. GONI, L. M. CASTRO e E. S. FERRO. 14-3-3 epsilon modulates the stimulated secretion of endopeptidase 24.15. **J Neurochem.** v.93, n.1, p.10-25, 2005.

CASTRO, L. M., D. A. BERTI, L. C. RUSSO, V. COELHO, F. C. GOZZO, V. OLIVEIRA e E. S. FERRO. Similar intracellular peptide profile of TAP1/beta2 microglobulin double-knockout mice and C57BL/6 wild-type mice as revealed by peptidomic analysis. **AAPS J.** v.12, n.4, p.608-16, 2010.

CASTRO, L.M.; CAVALCANTI, D.M.; ARAÚJO, C.B.; RIOLI, V.; ICIMOTO, M.Y.; GOZZO, F.C.; JULIANO, M.; JULIANO, L.; OLIVEIRA, V.; FERRO, E.S. Peptidomic analysis of the neurolysin-knockout mouse brain. **J Proteomics.** v. 111, p. 238-48, 2014.

CAVALCANTI, D.M.; CASTRO, L.M.; ROSA NETO, J.C.; SEELAENDER, M.; NEVES, R.X.; OLIVEIRA, V.; FORTI, F.L.; IWAI, L.K.; GOZZO, F.C.; TODIRAS, M.; SCHADOCK, I.; BARROS, C.C.; BADER, M.; FERRO, E.S. Neurolysin knockout mice generation and initial phenotype characterization. **J Biol Chem.** v. 289, n. 22, p. 15426-40, 2014.

CAVALCANTI, D.M.L.P. **Phenotype characterization of neurolisin knockout mice**. 2014. 92p. Ph.D. Thesis (Cell and Tissue Biology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

CONNELL, G.E.; WATSON, R.W. Intracellular peptides of *Pseudomonas hydrophila*. **Biochim Biophys Acta**. v. 24, n.1, p. 226-7, 1957.

CRAWLEY, J. N. **What's wrong with my mouse? Behavioral phenotyping of transgenic and knockout mice**. New Jersey: Wiley, 2007. 523 p.

CRUZ, A.P.M.; LANDEIRA-FERNANDEZ, J. **Modelos animais de ansiedade e o estudo experimental de drogas serotoninérgicas**. Métodos em Neurociência. São Paulo: Manole, 192 – 217, 2012.

CUNHA, F.M.; BERTI, D.A.; FERREIRA, Z.S.; KLITZKE, C.F.; MARKUS, R.P.; FERRO, E.S. Intracellular peptides as natural regulators of cell signaling. **J Biol Chem**. v. 283, n. 36, p.24448-59, 2008.

DALE, C.S.; PAGANO, R.L.; RIOLI, V.; HYSLOP, S.; GIORGI, R.; FERRO, E.S. Antinociceptive action of hemopressin in experimental hyperalgesia. **Peptides**. v. 26, n. 3, p. 431-6, 2005.

DAWSON, M.E.; HAZLETT, E.A.; FILION, D.L.; NUECHTERLEIN, K.H.; SCHELL, A.M. Attention and schizophrenia: impaired modulation of the startle reflex. **Journal of Abnormal Psychology**. v. 102, p. 633-641, 1993.

DENOBLE, V. J., K. F.; DENOBLE, K. R.; SPENCER, A. T.; CHIU, P. C.; WONG e P. B. TIMMERMANS. Non-peptide angiotensin II receptor antagonist and angiotensin-converting enzyme inhibitor: effect on a renin-induced deficit of a passive avoidance response in rats. **Brain Res**. v.561, n.2, p.230-5, 1991.

DIERSSEN, M.; ARQUE, G.; MCDONALD, J.; ANDREU, N.; MARTINEZ-CUE, C.; FLOREZ, J.; FILLATT, C. Behavioral Characterization of a Mouse Model Overexpressing DSCR1/ RCAN1. **Plos One**. v. 6, n. 2, 2011.

DODD, G.T.; MANCINI, G.; LUTZ, B.; LUCKMAN, S.M. The peptide hemopressin acts through CB1 cannabinoid receptors to reduce food intake in rats and mice. **J Neurosci**. v. 30, n. 21, p. 7369-76, 2010.

FELICIO, L.F.; FLORIO, J.C.; SIDER, L.H.; CRUZ-CASALLAS, P.E.; BRIDGES, R.S. Reproductive Experience Increases Striatal and Hypothalamic Dopamine Levels in Pregnant Rats. **Brain Research Bulletin**. v.40, p. 253-256, 1996.

FENN, J.B.; MANN, M.; MENG, C.K.; WONG, S.F.; WHITEHOUSE, C.M. Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules. **Science**. v. 246, n. 4926, p. 64–71, 1989.

FERRO, E.S.; CARREÑO, F.R.; GONI, C.; GARIIDO, P.A.; GUIMARAES, A.O.; CASTRO, L.M.; OLIVEIRA, V.; ARAUJO, M.C.; RIOLI, V.; GOMES, M.D.;

FONTENELE-NETO, J.D.; HYSLOP, S. The intracellular distribution and secretion of endopeptidases 24.15 (EC3.4.24.15) and 24.16 (EC3.4.24.16). **Protein Pept. Lett.** v.11, p.415-421, 2004.

FERRO, E.S.; HYSLOP, S.; CAMARGO, A.C. Intracellular peptides as putative natural regulators of protein interactions. **J Neurochem.** v.91, p.769-777, 2004

FERRO, E.F.; RIOLI, V.; CASTRO, L.M.; FRICKER, L.D. Intracellular peptides: From discovery to function. **EuPA Open Proteomics.** v.3, p.143-151, 2014.

FOGAÇA, M.V.; SONEGO, A.B.; RIOLI, V.; GOZZO, F.C.; DALE, C.S.; FERRO, E.S.; GUIMARÃES, F.S. Anxiogenic-like effects induced by hemopressin in rats. **Pharmacol Biochem Behav.** v. 129, p. 7-13, 2015.

FONSECA, R.; VABULAS, R.M.; HARTL, F.U.; BONHOEFFER, T.; NAGERL, U.V. A balance of protein synthesis and proteasome-dependent degradation determines the maintenance of LTP. **Neuron.** v.52, p. 239-245, 2006.

FONTENELE-NETO, J. D., E. E. MASSARELLI, P. A. GURGEL GARRIDO, A. BEAUDET e E. S. FERRO. Comparative fine structural distribution of endopeptidase 24.15 (EC3.4.24.15) and 24.16 (EC3.4.24.16) in rat brain. **J Comp Neurol.** v.438, n.4, p.399-410, 2001.

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

GARRIDO, P. A., F. VANDENBULCKE, A. R. RAMJAUN, B. VINCENT, F. CHECLER, E. FERRO e A. BEAUDET. Confocal microscopy reveals thimet oligopeptidase (EC 3.4.24.15) and neurolysin (EC 3.4.24.16) in the classical secretory pathway. **DNA Cell Biol.** v.18, n.4, p.323-31, 1999.

GELMAN, J.S.; DASGUPTA, S.; BEREZNIUK, I.; FRICKER, L.D. Analysis of peptides secreted from cultured mouse brain tissue. **Biochim Biophys Acta.** v.1834, n. 11, p.2408-17, 2013.

GELMAN, J.S.; SIRONI, J.; BEREZNIUK, I.; DASGUPTA, S.; CASTRO, L.M.; GOZZO, F.C.; FERRO, E.S.; FRICKER, L.D. Alterations of the intracellular peptidome in response to the proteasome inhibitor bortezomib. **PLoS One.** v. 8, n.1, e53263, 2013.

GLICKMAN, M.H.; CIECHANOVER, A. The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway: destruction for the sake of construction. **Physiol Rev.** v.82, p.373-428, 2002.

GOLDBERG, A. L. Protein degradation and protection against misfolded or damaged proteins. **Nature**, v. 426, n. 6968, p. 895-99, 2003.

GOLDBERG, A. L.; CASCIO, P.; SARIC, T.; ROCK, K. L. The importance of the proteasome and subsequent proteolytic steps in the generation of antigenic peptides. **Mol. Immunol.**, v.39, n.3-4, p.147-64, 2002

GOMES, I.; DALE, C.S.; CASTEN, K.; GEIGNER, M.A.; GOZZO, F.C.; FERRO, E.S.; HEIMANN, A.S.; DEVI, L.A. Hemoglobin-derived peptides as novel type of bioactive signaling molecules. **AAPS J.** v. 12, n. 4, p. 658-69, 2010.

GOMES, I.; GRUSHKO, J.S.; GOLEBIEWSKA, U.; HOOGENDOORN, S.; GUPTA, A.; HEIMANN, A.S.; FERRO, E.S.; SCARLATA, S.; FRICKER, L.D.; DEVI, L.A. Novel endogenous peptide agonists of cannabinoid receptors. **FASEB J.** v. 23, n. 9, p. 3020-9, 2009.

GOMEZ, J.L.; LEWIS, M.J.; SEBASTIAN, V.; SERRANO, P.; LUINE, V.N. Alcohol administration blocks stress-induced impairments in memory and anxiety, and alters hippocampal neurotransmitter receptor expression in male rats. **Horm Behav.** v. 63, p. 659-666, 2013.

GRAEFF, FG; GUIMARÃES, FS. **Fundamentos da Psicofarmacologia.** São Paulo: editora Atheneu, p. 238, 2005.

GROLL, M.; DITZEL, L.; LÖWE, J.; STOCK, D.; BOCHTLER, M.; BARTUNIK, H. D.; HUBER, R. Structure of 20S proteasome from yeast at 2.4Å resolution. **Nature**, v. 386, p. 463-71, 1997.

GUGGENHEIM, K.Y. Rudolf Schoenheimer and the concept of the dynamic state of body constituents. **J Nutr.** v. 121, n. 11, p. 1701-4, 1991.

GUIDOTTI, A.; FORCHETTI, C.M.; CORDA, M.G.; KONKEL, D. BENNETT, C.D.; COSTA, E. Isolation, characterization, and purification to homogeneity of an endogenous polypeptide with agonistic action on benzodiazepine receptors. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 80, n.11, p. 3531-5, 1983.

HARRISON, F.E.; REISERER, R.S.; TOMARKEN, A.J.; MCDONALD, M.P. Spatial and nonspatial escape strategies in the Barnes Maze. **Learning & Memory**, v.13, p.809-819, 2006.

HEALY, D. P. e M. ORLOWSKI. Immunocytochemical localization of endopeptidase 24.15 in rat brain. **Brain Res**, v.571, n.1, p.121-8, 1992

HEIMANN A.S.; GOMES, I.; DALE, C.S.; PAGANO, R.L.; GUPTA, A.; SOUZA, L.L.; LUCHESSI, A.D.; CASTRO, L.M.; GIORGI, R.; RIOLI, V.; FERRO, E.S.; DEVI, L.A. Hemopressin is an inverse agonist of CB1 cannabinoid receptors. **Proc Natl Acad Sci U S A**. v.104, n. 51, p. 20588-93, 2007.

HEIMANN, A.S.; FAVARATO, M.H.; GOZZO, F.C.; RIOLI, V.; CARREÑO, F.R.; EBERLIN, M.N.; FERRO, E.S.; KREGE, J.H.; KRIEGER, J.E. ACE gene titration in mice uncovers a new mechanism for ACE on the control of body weight. **Physiol Genomics**.v. 20, n. 2, p. 173-82, 2005.

HERSHKO, A.; CIECHANOVER, A. The ubiquitin system. **Annu. Rev. Biochem.**, v. 67, p. 425–79, 1998.

HERSHKO, A.; CIECHANOVER, A.; VARSHAVSKY, A. Basic medical research award. The ubiquitin system. **Nat Med.** v.6, p.1073–1081, 2000.

HO PAK, J.; HUANG, F.L.; LI, J.; BALSCHUN, D.; REYMAN, K.G.; CHIANG, C.; WESTPHAL, H.; HUANG, K.P. Involvement of neurogranin in the modulation of calcium/calmodulin-dependent protein kinase II, synaptic plasticity, and spatial learning: A study with knockout mice. **Proc Natl Acad Sci USA.** v. 97, n. 21, p. 11232–11237, 2000.

HOFER, S.C.; RALVENIUS, W.T.; GACHET, M.S.; FRITSCHY, J.M.; ZEILHOFER, H.U.; GERTSCH, J. Localization and production of peptide endocannabinoids in the rodent CNS and adrenal medulla. **Neuropharmacology.** v. 98, p. 78-89, 2015.

HUYER, G.; KISTLER, A.; NOUVET, F.J.; GEROGÉ, C.M.; BOYLE, M.L.; MICHAELIS, S. *Saccharomyces cerevisiae* a-factor mutants reveal residues critical for processing, activity, and export. **Eukaryot Cell.** v. 5, n. 9, p. 1560-70, 2006.

ICHIHARA, K.; NABESHIMA, T.; KAMEYAMA, T. Effects of haloperidol, sulpiride and SCH 23390 on passive avoidance learning in mice. **European Journal of Pharmacology.** v. 15, p. 435-442, 1988.

IZQUIERDO, I.; MEDINA, J. H. Memory Formation: The Sequence of Biochemical Events in the Hippocampus and Its Connection to Activity in Other Brain Structures. **Neurobiology of Learning and Memory.** v. 68, n. 3, p. 285–316, 1997.

KERR, D. S.; BEVILAQUA, L.R.; BONINI, J.S.; ROSSATO, J.I.; KOHLER, C.A.; MEDINA, J.H.; IZQUIERDO, I.; CAMMAROTA, M. Angiotensin II blocks memory consolidation through an AT2 receptor-dependent mechanism. **Psychopharmacology.** v.179, n.3, p. 529-35, 2005.

KÖHLER, A.; BAJOREK, M.; GROLL, M.; MORODER, L.; RUBIN, D.M.; HUBER, R.; GLICKMAN, M.H.; FINLEY, D. The substrate translocation channel of the proteasome. **Biochimie.** v. 83, n. 3-4, p. 325-32, 2001.

KOMADA, M.; TAKAO, K.; MIYAKAWA, T. Elevated Plus Maze for Mice. **Journal of Visualized Experiments,** n. 22, p. 1–4, 2008.

KRAVTSOVA-IVANTSIV, Y.; CIECHANOVER, A. Non-canonical ubiquitin-based signals for proteasomal degradation. **Journal of Cell Science.** v. 125, n. 3, p. 539–548, 2012.

KUMARI, V.; SHARMA, T. Effects of typical and atypical antipsychotics on prepulse inhibition in schizophrenia: a critical evaluation of current evidence and directions for future research. **Psychopharmacology.** v. 162, n. 2, p. 97–101, 2002.

LAURESSERGUES, D.; COUZIGOU, J.M.; CLEMENTE, H.S.; MARTINEZ, Y.; DUNAND, C.; BÉCARD, G.; COMBIER, J.P. Primary transcripts of microRNAs

encode regulatory peptides. **Nature**. v. 520, n. 7545, p. 90-3, 2015.

LECKER, S.H.; GOLDBERG, A.L. Slowing muscle atrophy: putting the brakes on protein breakdown. **J Physiol**. v. 545, p. 729, 2002.

LEE, C.; ZENG, J.; DREW, B.G.; SALLAM, T.; MARTIN-MONTALVO, A.; WAN, J.; KIM, S.J.; MEHTA, H.; HEVENER, A.L.; CABO, R.; COHEN, P. The mitochondrial-derived peptide MOTS-c promotes metabolic homeostasis and reduces obesity and insulin resistance. **Cell Metab**. v. 21, n. 3, p. 443-54, 2015.

LEPEKHINA, L. M.; TSITSURINA, E. A. Ontogenetic development of dopaminergic regulation of grooming behavior in rats. **Bulletin of Experimental Biology and Medicine**, v. 148, n. 3, p. 363–365, 2009.

LI, Q.; CHEN, D.; CHEN, R.; CAI, Q.; JIA, N.; SU, Q.; ZHANG, H.; ZHU, Z.; ZENG, J.; LI, H. Expression of neurogranin in hippocampus of rat offspring exposed to restraint stress and pulsed magnetic fields. **Brain Research**. v. 1570, p. 26-34, 2014 .

LIVAK, K.J.; SCHMITTGEN, T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. **Methods**. v.25, p. 402–408, 2001.

MCMANUS, I.R. Synthesis of intracellular peptides in *Torula utilis*. **J Biol Chem**, v. 23, n.2, p. 777-85, 1958.

MECHOULAM, R.; HANUS, L.O; PERTWEE, R.; HOWLETT, A.C. Early phytocannabinoid chemistry to endocannabinoids and beyond. **Nat Rev Neurosci**. v. 15, n. 11, p. 757-64, 2014.

MELANSON, J.E.; AVERY, S.L.; PINTO, D.M. High-coverage quantitative proteomics using amine-specific isotopic labeling. **Proteomics**, v. 6, n. 16, p. 4466-74, 2006.

MELTZER, H.Y. Clinical studies on the mechanism of action of clozapine: the dopamine-serotonin hypothesis of schizophrenia. **Psychopharmacology**, v. 99, p.18-27, 1989.

MONTE-SILVA, E.R.C.; ROSSATO, C.; RUSSO, L.C.; CASTRO, L.M.; GOZZO, F.C.; ARAÚJO, C.B.; PERON, J.P.S.; RIOLI, V.; FERRO, E.S. EL28 is a novel intracellular peptide that activates immune proteasome and CD8+ T-cell response. **J Proteomics**. pii: S1874-3919(16)30354-2, 2016.

MOREIRA, F.A.; GUIMARÃES, F.S. Mecanismos de ação dos antipsicóticos: hipóteses dopaminérgicas. **Revista Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto**, v. 40(1), p. 63-71, 2007.

MORRIS, R. G.; ANDERSON, E.; LYNCH G. S.; BAUDRY M. Selective impairment of learning and blockade of long-term potentiation by an N-methyl-D-aspartate receptor antagonist, AP5. **Nature**, v.319, n.6056, p.774-6. 1986.

MYSKIW, J.C.; FURINI, C.R.G.; BENETTI, F.; IZQUIERDO, I. Hippocampal molecular mechanisms involved in the enhancement of fear extinction caused by exposure to novelty. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.111, n.12, p. 4572-4577, 2014.

NASEHI, M.; PIRI, M.; NOURI, M.; FARZIN, D.; NAYER-NOURI, T.; ZARRINDAST, M.R. Involvement of dopamine D1/D2 receptors on harmaline-induced amnesia in the step-down passive avoidance test. **Eur J Pharmacol**. v. 634(1-3), p. 77-83, 2010.

NETO, A.G.A.A.; BRESSAN, R.A.; FILHO, G.B. Fisiopatologia da esquizofrenia: aspectos atuais. **Rev. Psiqu. Clín.** v. 34, supl 2, p. 198-203, 2007.

NORDSTRÖM, K. J. V; SÄLLMAN ALMÉN, M.; EDSTAM, M. M.; FREDRIKSSON, R.; SCHIÖTH, H. B. Independent HHsearch, Needleman-Wunsch-based, and motif analyses reveal the overall hierarchy for most of the G protein-coupled receptor families. **Molecular Biology and Evolution**, v. 28, n. 9, p. 2471–2480, 2011.

NOTO, C.S.; BRESSAN, R.A. **Esquizofrenia: avanços no tratamento multidisciplinar**. Porto Alegre: editora Artmed, p.271, 2012.

O'LEARY, T.P.; BROWN, R.E. The effects of apparatus design and test procedure on learning and memory performance of C57BL/6J mice on the Barnes Maze. **Journal of Neuroscience Methods**. v. 2013. p. 315-324, 2012.

ORLOWSKI, M., C. MICHAUD e T. G. CHU. A soluble metalloendopeptidase from rat brain. Purification of the enzyme and determination of specificity with synthetic and natural peptides. **Eur J Biochem**, v.135, n.1, p.81-8, 1983.

O'TUATHAIGH, C. M. P.; BABOVIC, D.; O'SULLIVAN, G. J.; CLIFFORD, J. J.; TIGHE, O.; CROKE, D. T.; HARVEY, R.; WADDINGTON, J. L. Phenotypic characterization of spatial cognition and social behavior in mice with "knockout" of the schizophrenia risk gene neuregulin 1. **Neuroscience**, v. 147, n. 1, p. 18–27, 2007.

PASTALKOVA, E., P. SERRANO, D. PINKHASOVA, E. WALLACE, A. A. FENTON e T. C. SACKTOR. Storage of spatial information by the maintenance mechanism of LTP. **Science**, v.313, n.5790, Aug 25, p.1141-4. 2006.

PATKI, G.; SOLANKI, N.; ATROOZ, F.; ALLAM, F.; SALIM, S. Depression, anxiety-like behavior and memory impairment are associated with increased oxidative stress and inflammation in a rat model of social stress. **Brain Res**. v. 1539, p. 73-86, 2013.

PEI, L.; LI, S.; WANG, M.; DIWAN, M.; ANISMAN, H; FLETCHER, P.J.; NOBREGA, J.N.; LIU, F. Uncoupling the dopamine D1-D2 receptor complex exerts antidepressant-like effects. **Nature Medicine**. v. 16., n.12, p. 1393-5, 2010.

PEREIRA, B.C. **Avaliação da memória emocional em camundongos : efeito da injeção de midazolam na substância cinzenta periaquedutal**. 53p. Departamento de Psicologia, Universidade Federal de São Carlos, 2012.

PEREIRA, M. G., L. L. SOUZA, C. BECARI, D. A. DUARTE, F. R. CAMACHO, J. A. OLIVEIRA, M. D. GOMES, E. B. OLIVEIRA, M. C. SALGADO, N. GARCIA-

CAIRASCO e C. M. COSTA-NETO. Angiotensin II-independent angiotensin-(1-7) formation in rat hippocampus: involvement of thimet oligopeptidase. **Hypertension**, v.62, n.5, Nov, p.879-85. 2013.

PHILLIPS, M. I; OLIVEIRA, E.M. Brain renin angiotensin in disease. **J Mol Med**, v.86, n.6, p.715-22, 2008.

PORSOLT, R.D.; LE PICHON, M.; JALFRE, M. Depression: a new animal model sensitive to antidepressant treatments. **Nature**, 266, p. 730–732, 1977.

PYTKA, K.; PODKOWA, K.; RAPACZ, A.; PODKOWA, A.; ZMUDZKA, E.; OLCZYK, A.; SAPA, J.; FILIPEK, B. The role of serotonergic, adrenergic and dopaminergic receptors in antidepressant-like effect. **Pharmacological Reports**, v. 68, n. 2, p. 263–274, 2016.

QVIT, N.; MOCHLY-ROSEN, D. Highly Specific Modulators of Protein Kinase C Localization: Applications to Heart Failure. **Drug Discov Today Dis Mech**, v. 7, n. 2, p. 87-93, 2010.

QVIT, N.; RUBIN, S. J. S.; URBAN, T. J.; MOCHLY-ROSEN, D.; GROSS, E. R. Peptidomimetic therapeutics: scientific approaches and opportunities. **Drug Discovery Today**, v. 22, n. 2, p. 454–462, 2017.

RATNER, S.; RITTENBERG, D.; KESTON, A.S.; SCHOENHEIMER, R. Studies in protein metabolism Xiv. the chemical interaction of dietary glycine and body proteins in rats. **J Biol Chem**. v. 134, p. 665-76, 1940.

RECKZIEGEL, P.; BOUFLEUR, N.; BARCELOS, R.C.S.; BENVEGNÚ, D.M.; PASE, C.S.; MULLER, L.G.; TEIXEIRA, A.M.; ZANELLA, R.; PRADO, A.C.P.; FETT, R.; BLOCK, J.M.; BURGER, M.E. Oxidative stress and anxiety-like symptoms related to withdrawal of passive cigarette smoke in mice: beneficial effects of pecan nut shells extract, a by-product of the nut industry. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.74, n.6, p.1770-1778, 2011.

RECKZIEGEL, P.; FESTUCCIA, W.T. BRITTO, L.R.G.; JANG, K.L.L.; ROMÃO, C.M.; HEIMANN, J.C.; FOGAÇA, M.V.; RODRIGUES, N.S.; SILVA, N.R.; GUIMARÃES, F.S.; EICHLER, R.A.S.; GUPTA, A.; GOMES, I.; DEVI, L.A.; HEIMANN, A.S.; FERRO, E.S. A novel peptide that improves metabolic parameters without adverse central nervous system effects. **Scientific Reports**. v. 7, n. 14781, 2017

REITS, E.; GRIEKSPoor, A.; NEIJSSen, J.; GROOTHUIS, T.; JALINK, K.; VAN VEELEN, P.; JANSSEN, H.; CALAFAT, J.; DRIJFHOUT, J. W.; NEEFJES, J. Peptide Diffusion, Protection, and Degradation in Nuclear and Cytoplasmic Compartments before Antigen Presentation by MHC Class I. **Immunity**, v. 18, n. 1, p. 97–108, 2003.

RIBEIRO, N.M.; TONIOLO, E.F.; CASTRO, L.M.; RUSSO, L.C.; RIOLI, V.; FERRO, E.S.; DALE, C.S. AGH is a new hemoglobin alpha-chain fragment with antinociceptive activity. **Peptides**. v. 48, p. 10-20, 2013.

RIOLI, V.; GOZZO, F. C.; HEIMANN, A. S.; LINARDI, A.; KRIEGER, J. E.; SHIDA, C. S.; ALMEIDA, P. C.; HYSLOP, S.; EBERLIN, M. N.; FERRO, E. S. Novel natural peptide substrates for endopeptidase 24.15, neurolysin, and angiotensin-converting enzyme. **J. Biol. Chem.**, v.278, n.10, p.8547-55, 2003.

ROBINSON, O.J.; VYTAL, K.; CORNWELL, B.R.; GRILLON, C. The impact of anxiety upon cognition: perspectives from human threat of shock studies. **Front Hum Neurosci.** v. 7, p. 203, 2013.

ROLLAND, T. et al. A proteome-scale map of the human interactome network. **Cell.** v. 159, n. 5, p. 1212-26, 2014.

RUSSO, L. C.; ARAUJO, C. B.; IWAI, L. K.; FERRO, E. S.; FORTI, F. L. A Cyclin D2-derived peptide acts on specific cell cycle phases by activating ERK1/2 to cause the death of breast cancer cells. **Journal of Proteomics**, v. 151, p. 24–32, 2017.

RUSSO, L. C.; CASTRO, L. M.; GOZZO, F. C.; FERRO, E. S. Inhibition of thimet oligopeptidase by siRNA alters specific intracellular peptides and potentiates isoproterenol signal transduction. **FEBS Letters**, v. 586, n. 19, p. 3287–3292, 2012.

RUSSO, L.C.; ASEGA, A.F.; CASTRO, L.M.; NEGRAES, P.D.; CRUZ, L.; GOZZO, F.C.; ULRICH, H.; CAMARGO, A.C.; RIOLI, V.; FERRO, E.S. Natural intracellular peptides can modulate the interactions of mouse brain proteins and thimet oligopeptidase with 14-3-3 ϵ and calmodulin. **Proteomics**. v. 12, n. 17, p.2641-55, 2012.

RUSSO, L.C.; CASTRO, L.M.; GOZZO, F.C.; FERRO, E.S. Inhibition of thimet oligopeptidase by siRNA alters specific intracellular peptides and potentiates isoproterenol signal transduction. **Febs Letters**, v. 586, n. 19, p. 3287-3292, 2012.

SAHNI, N.; YI, S.; ZHONG, Q.; JAILKHANI, N.; CHARLOTEAUX, B.; CUSICK, M.E.; VIDAL, M. Edgotype: a fundamental link between genotype and phenotype. **Curr Opin Genet Dev.** v. 23, n. 6, p. 649-57, 2013.

SALETTI, P.G. **Caracterização da Inibição por Pré-pulso em Primatas Não-Humanos (*Sapajus spp.*) e Avaliação dos Efeitos da Dizocilpina e Canabidiol na Modulação do Filtro Sensorio-motor.** Brasília: UnB, 2015. 131f. Tese (Doutorado em Biologia Animal) – Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília, Brasília, 2015.

SCHEICH, B.; CSEKO, K.; BORBÉLY, E.; ABRAHAM, I.; CSENURS, V.; GASZNER, B.; HEYLES, Z. Higher susceptibility of somatostatin 4 receptor gene-deleted mice to chronic stress-induced behavioral and neuroendocrine alterations. **Neuroscience**, v. 27 ,p. 320-336, 2017.

SCHWECHHEIMER, C.; DENG, X. W. COP9 signalosome revisited: a novel mediator of protein degradation. **Trends Cell. Biol.**, v.11, n.10, p.420-6, 2001.

SEIBENHENER, M. L.; WOOTEN, M. C. Use of the Open Field Maze to Measure Locomotor and Anxiety-like Behavior in Mice. **Journal of Visualized Experiments**,

n. 96, p. 1–6, 2015.

SHRIMPTON, C. N., A. I. SMITH e R. A. LEW. Soluble metalloendopeptidases and neuroendocrine signaling. **Endocr Rev**, v.23, n.5, p.647-64, 2002.

SILVA, R.C.B. Esquizofrenia: uma revisão. **Psicologia USP**, v. 17(4), p. 263-285, 2006.

SINGER, P.; YEE, B.K. Reversal of scopolamine-induced disruption of prepulse inhibition by clozapine in mice. **Pharmacol Biochem Behav.** v. 101(1), p.107–114, 2012.

SINGER, P.; HAUSER, J.; LLANO, L.L.; PELEG-RAIBSTEIN, D.; FELDON, J.; GARGIULO, P.A.; YEE, B.K. Prepulse inhibition predicts working memory performance whilst startle habituation predicts spatial reference memory retention in C57BL/6 mice. **Behavioural Brain Research.** v. 242, p.166-177, 2013.

STUMPF, M.P.; THORNE, T.; SILVA, E.; STEWART, R.; AN, H.J.; LAPPE, M.; WIUF, C. Estimating the size of the human interactome. **Proc Natl Acad Sci USA.** v.105, p.6959–6964, 2008.

SUN, M.K.; ALKON, D.L. Induced depressive behavior impairs learning and memory in rats. **Neuroscience.** v. 129, n. 1, p.129-139, 2004.

SUNYER, B.; PATIL, S.; HÖGER, H.; LUBEC, G. Barnes maze, a useful task to assess spatial reference memory in the mice. **Nature Protocols**, 2007.

TIAN, G.; PARK, S.; LEE, M.J.; HUCK, B.; McALLISTER, F.; HILL, C.P.; GYGI, S.P.; FINLEY, D. An asymmetric interface between the regulatory and core particles of the proteasome. **Nat Struct Mol Biol.** v.18, n. 11, p.1259-67, 2011.

TONIOLO, E.F.; MAIQUE, E.T.; FERREIRA, W.A.Jr.; HEIMANN, A.S.; FERRO, E.S.; RAMOS-ORTOLAZA, D.L.; MILLER, L.; DEVI, L.A.; DALE, C.S. Hemopressin, an inverse agonist of cannabinoid receptors, inhibits neuropathic pain in rats. **Peptides.** v. 56, p. 125-31, 2014.

TSIEN, J. Z., P. T. HUERTA e S. TONEGAWA. The essential role of hippocampal CA1 NMDA receptor-dependent synaptic plasticity in spatial memory. **Cell**, v.87, n.7, Dec 27, p.1327-38. 1996.

VIDAL, M.; CUSICK, M.E.; BARABÁSI, A.L. Interactome networks and human disease. **Cell.** v. 144, n. 6, p. 986-98, 2011.

WALF, A.; FRYE, C.A. The use of the elevated plus maze as an assay of anxiety-related behavior in rodents. **Nat Protoc.**, v. 2(2), p. 322–328, 2007.

XAPELLI, S.; AGASSE, F.; GRADE, S.; BERNARDINO, L.; RIBEIRO, F.F.; SCHITINE, C.S.; HEIMANN, A.S.; FERRO, E.S.; SEBASTIÃO, A.M.; REIS, R.A.M.; MALVA, J.O. Modulation of subventricular zone oligodendrogenesis: a role for

hemopressin? **Front Cell Neurosci.** v. 8, p. 59, 2014.

YEN, K.; LEE, C.; MEHTA, H.; COHEN, P. The emerging role of the mitochondrial-derived peptide humanin in stress resistance. **J Mol Endocrinol.** v. 50, n. 1, p.11-9, 2013.

PATENTES

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO. Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP). Emer Suavinho Ferro; Vanessa Rioli. **Processo para isolamento de peptídeos utilizando as endopeptidases EC3.4.24.15 (EP24.15) e EC3.4.24.16 (EP24.16) recombinantes, cataliticamente inativadas por mutação sítio dirigida.** BR PI 0301511-4 A2, 15 março 2005.

HOSPITAL SÍRIO LIBANÊS. Andrea Sterman Heimann, Camila Squarzoni Dale, Devi Lakshmi. **Pharmaceutical composition for treating medical conditions and a method for treating alimentary disorders and related diseases.** PCT/BR2010/000253, 31 julho 2009.