



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO SEMI-ÁRIDO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

**EXPRESSÃO DA ENDOPEPTIDASE 24.15
NOS ÓRGÃOS LINFÓIDES**

CAYO RIKETH MEDEIROS DE OLIVEIRA

Farmacêutico

MOSSORÓ – RN – BRASIL

AGOSTO – 2010

CAYO RIKETH MEDEIROS DE OLIVEIRA

**EXPRESSÃO DA ENDOPEPTIDASE 24.15
NOS ÓRGÃOS LINFÓIDES**

Dissertação apresentada à Universidade Federal Rural do Semi-árido – UFERSA, Campus de Mossoró, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

Orientador: Prof. Dr. José Domingues Fontenele Neto

MOSSORÓ – RN – BRASIL

AGOSTO – 2010

**Ficha catalográfica preparada pelo setor de classificação e
catalogação da Biblioteca “Orlando Teixeira” da UFERSA**

O48e Oliveira, Cayo Riketh Medeiros de.

Expressão da endopeptidase 24.15 nos órgãos linfóides. / Cayo Riketh Medeiros de Oliveira. – Mossoró, RN: 2010.

92f.: il.

Dissertação (Mestrado em Ciência Animal: Área de concentração em Produção e Reprodução Animal) – Universidade Federal Rural do Semi-Árido. Pró-Reitoria de Pós-Graduação.

Orientador: Prof.º Dr. Sc. José Domingos Neto

1. Endopeptidase 24.15. 2. Proteassoma. 3. Macrófagos.
I. Título.

CDD:636.089

Bibliotecária: Marilene Santos de Araújo

CAYO RIKETH MEDEIROS DE OLIVEIRA

**EXPRESSÃO DA ENDOPEPTIDASE 24.15
NOS ÓRGÃOS LINFÓIDES**

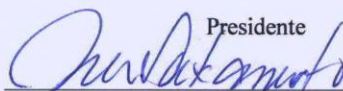
Dissertação apresentada à Universidade Federal Rural do
Semi-árido – UFERSA, Campus de Mossoró, como parte
das exigências para a obtenção do título de Mestre em
Ciência Animal.

APROVADA EM: 20 / 08 / 2010

BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. José Domingues Fontenele Neto (UFERSA)

Presidente


Prof. Dr. Sidnei M. Sakamoto (UFERSA)

Primeiro Membro



Prof. Dr. Wogelsanger Oliveira Pereira (UERN)

Segundo Membro

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

CAYO RIKETH MEDEIROS DE OLIVEIRA – Nascido no Município de Mossoró-RN no dia 25/08/1976, filho de João Manoel Neto e Aldevanete Medeiros de Oliveira, concluiu o ensino fundamental no Colégio Diocesano Santa Luzia e o ensino médio no Colégio GEO Studio. Graduiu-se em Farmácia pela Universidade Federal do Ceará (UFC) em 1999.1, em seguida fez habilitação em Análises Clínicas, concluindo em janeiro de 2001. Foi bolsista do CNPq no departamento de Análises Clínicas na disciplina de Hematologia por quatro anos. Durante a graduação desenvolveu trabalhos com Hemoglobinopatias. No ano 2000 concluiu a especialização em Vigilância Sanitária pela Universidade de Ribeirão Preto (UNAERP) e Em 2005 concluiu a Especialização em Análises Clínicas pela Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN). Em janeiro de 2007 tornou-se docente da Faculdade de Enfermagem Nova Esperança de Mossoró (FACENE/RN) lecionando a disciplina de Bioquímica e, em 2007.2, assumiu também as disciplinas de Parasitologia Humana e Imunologia para o curso de enfermagem. Em agosto do mesmo ano foi aprovado em concurso para professor da disciplina de Bioquímica da Universidade Potiguar (UNP). Em 2008 foi aprovado no concurso Público da Prefeitura Municipal de Mossoró para o cargo de Farmecêutico-bioquímico. Em 2008 foi selecionado pelo Programa em Pós-Graduação em Ciência Animal pela Universidade Federal Rural do Semi-árido (UFERSA).

A toda minha família, em especial a minha mãe que sempre me apoiou na minha caminhada profissional, ao meu pai (em memória), a minha esposa Edelquinn que me incentivava todos os dias e a compreensão dos meus filhos Gabriel, Rafael e Lucas.

Dedico

“O cientista não só tem que fazer
ciência, mas também escrevê-la.”

(Day, 1990)

AGRADECIMENTOS

Apesar de repetitivo, eu não poderia deixar de colocar o Ser Supremo em primeiro lugar. Agradeço a Deus por todos os obstáculos superados e por não ter me abandonado a cada passo dado, a cada oportunidade e vitória concedida. Meu Deus, obrigado por ter me dado mais do que eu imaginava em tão pouco tempo.

Agradeço à UFERSA. Neste momento, em especial, ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal por ter contribuído com mais essa etapa de minha vida acadêmica.

Ao Professor Dr. José Domingues Fontenele Neto, não somente por ter me aceitado, mas, por ter estimulado o meu crescimento sempre acreditando que eu podia fazer mais e melhor extraindo o máximo que eu podia mostrar e por ter me dado plena confiança na execução de todas as etapas deste mestrado, o que certamente me tornou um profissional muito mais dinâmico e seguro, capaz de ir além dos livros.

A CAPES pelo apoio ao projeto via PROCAD 072/2007.

Agradeço a todos os Mestres, independentemente em que fase da vida eles tenham contribuído com minha formação, mas que por serem Professores merecem todo o meu respeito e minha admiração. Hoje eu sei o quanto é difícil e laborioso se dedicar para formar alguém, mas, também sei o quanto é prazeroso e recompensador ter esta que pra mim, é uma das mais bonitas incumbências.

Agradeço a meus amigos Sivestre Brilhante e Klivio Loreno por ter caminhado e me incentivado muito nos momentos mais difíceis. Meus amigos, vocês sabem que esse mestrado é nosso, sem distinção de experimentos, certamente sem vocês teria sido bem mais difícil.

Agradeço aos não somente colegas, mas, também amigos do laboratório, que me auxiliaram sempre que precisei. Hoje vocês são pessoas especiais que carregarei para sempre no coração. O meu muito obrigado é muito pouco diante do que a atitude de doação que vocês tiveram para comigo representou nesta etapa da minha vida. Servulo Eduardo, Raony, Gyslaine e Josivânia, vocês são anjos enviados por Deus para tornarem as coisas mais fáceis pra mim.

Aos meus Pais João Manoel Neto e Aldevanete Medeiros de Oliveira por terem não somente me dado a vida, mas por toda dedicação na minha formação. Ainda que eu

agradecesse infinitas vezes, isso não representaria a minha eterna gratidão. Por isso, não me canso de amá-los.

Ao meus irmãos, Kalyano Riketh, João Victor e João Paulo pelo companheirismo, por me ouvir quando eu precisei e por compartilhar as agonias e os momentos felizes.

A todos os meus familiares, pessoas que realmente vibram com a minha vitória e que representam para mim muitos momentos de alegria.

Agradeço à Edelquinn Vieira de Alemida , minha companheira para todos os momentos, minha melhor amiga e o amor da minha vida. Obrigado por fazer parte da minha vida e me agraciar com sua presença a cada dia. Agradeço pelos tantos conselhos, pelas palavras de conforto nos momentos de dificuldades (que foram muitos!), pelo simples ouvir quando precisei, pela paciência e tolerância para comigo. Você é muito especial e sei que foi Deus quem te mandou para mim. Amo-te.

Agradeço à FACENE/RN pela oportunidade de iniciar a minha docência de nível superior e em especial a Maria da Conceição Santiago (TeTê) pelo incentivo inicial da caminhada do meu mestrado. Agradeço a todos os colegas de trabalho por terem tão bem me acolhido.

Agradeço a Universidade Potiguar, nas pessoas de Wanderley da Silva e Alcivan pelo incentivo da conclusão deste mestrado

Agradeço a todos os meus alunos, pessoas especiais com quem tenho tido o prazer de trocar informações e com quem tanto tenho aprendido.

Agradeço a todos àqueles que considero amigos e que contribuíram direta ou indiretamente para que eu galgasse mais este importante passo na minha vida.

Agradeço aos animais, seres especiais indissociáveis de nossas vidas e que contribuem para o continuar de nossa existência, que são também o conforto, a companhia, alegria, a fonte de renda e de alimento de tantas pessoas.

EXPRESSÃO DA ENDOPEPTIDASE 24.15 NOS ÓRGÃOS LINFÓIDES

OLIVEIRA, C. R. M. **Expressão da Endopeptidase 24.15 nos órgãos linfóides** 92p. Dissertação (Mestrado em Ciências: Morfofisiologia) – Universidade Federal Rural do Semi-árido (UFERSA), Mossoró-RN, 2010.

RESUMO – EP24.15 (endopeptidase 24.15, EC.3.4.24.15) também conhecida por thimet-oligopeptidase é uma metaloendopeptidase que está envolvida no metabolismo de neuropeptídeos, bem como na apresentação de antígenos via MHC-I e mais recentemente como um importante regulador das interações proteína/proteína. O objetivo do presente trabalho é verificar a distribuição tecidual e celular da EP24.15 nos tecidos linfóides (timo, baço e linfonodo) através da técnica de imunohistoquímica. A análise dos resultados revelou que a EP24.15 foi expressa em todos os órgãos estudados, no entanto a distribuição tecidual mostrou áreas com várias células marcadas e outras sem marcação. A distribuição citoplasmática foi mais frequente que a nuclear. O macrófago foi o tipo celular mais frequentemente marcado. Os resultados sugerem que a enzima pode estar envolvida no metabolismo de peptídeos via MHC-I bem como na diferenciação de CTLs.

Palavras-Chave: endopeptidase 24.15, macrófago e MHC classe I.

EP24.15 DISTRIBUTION IN LYMPHOID TISSUE

OLIVEIRA, C. R. M. **EP24.15 DISTRIBUTION IN LYMPHOID TISSUE** 2010. 93p. Dissertation (Master in Science: Morphophysiology a) - Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA), Mossoró-RN, 2010.

Abstract – EP24.15 (endopeptidase 24.15, EC.3.4.24.15) also known as thimet-oligopeptidase is a metal dependent peptidase involved in the metabolism of neuropeptides as well as MHC-I peptides and more recently important as regulator of protein/protein interactions. The aim of this work is to verify the tissue and cellular distribution of EP24.15 in the lymphoid tissues (thymus, spleen, lymph nodes) by means of immunohistochemistry technique. The analysis revealed that EP24.15 is expressed throughout the studied organs, nevertheless the tissue distribution showed some areas that contained several labeled cells and others devoid of labeling. The cytoplasmic labeling was more frequent if compared to nuclear one. Macrophage is the cell type more frequently labeled. The results suggest that it can be involved in the MHC-I peptide metabolism as well as CTLs differentiation.

Keywords: endopeptidase 24.15, Macrophage

LISTA DE ABREVIACÕES

Cm	– centímetro
μl	– microlitro
μg	– micrograma
μm	– micrômetro
ηM	– nanomolar
ηM	– nanomolar
ANP	- peptídeo natriurético atrial
APC	– célula apresentadora de antígeno
Ar	– arteríola
ATP	– adenosina tri-fosfato
BH	– hidrolase bleomicina
Ca	– cápsula
CaM-KII	– calmodulina
Cd	– grupo de diferenciação
Ce	– cordões esplênicos
Cg	– centro germinativo
CH	– corpúsculo de Hassal
CM	– camada muscular
CMu	– camada mucosa

Co	– córtex
CS	– camada serosa
CTL	– linfócito T citotóxico
CTECs	– células epiteliais tímicas cortical
EP24.15	– endopeptidase 24.15
EP24.16	– endopeptidase 24.16
ETs	– endotelinas
GnRH	– hormônio liberador de gonadotrofina
H	– histidina
kD	– quilo Dalton
LAP	– leucina aminopeptidase
LH	– hormônio luteinizante
M	– molar
Me	– medula
MHC	– complexo principal de histocompatibilidade
mg	– miligrama
ml	– mililitro
Mm	– mili molar
n	– núcleo
nm	– nanômetro
NI	– nódulo linfático

Pa	– paracórtex
PBS	– tampão fosfato salino
Pb	– polpa branca
PKA	– proteína quinase A
PSA	– aminopeptidase puromicina-sensível
Pv	– polpa vermelha
Rm	– região medular
Sm	– seios medulares
Si	– sinusóide
TBS	– tris base salino
TCR	– receptor de células T
TTBS	– tris base salino tween
TNF	– fator de necrose tumoral
Ub	– ubiquitina
Zm	– zona do manto
Zn	– zinco

LISTA DE FIGURAS

Figura 01: Fotomicrografia do timo de ratos, corados em HE em pequeno aumento. Podem ser observadas as áreas do timo: cápsula (Ca), córtex (Co), medula (Me), corpúsculo de Hassal (**detalhe da Figura 1A**). A barra de escala: 200µm e detalhe da figura 1 A : 80 µm.

.....28.

Figura 02: Fotomicrografia do linfonodo de ratos, corados em HE em pequeno aumento (**Figura 2A e B**). Podem ser observadas as áreas do linfonodo: córtex (Co), nódulo linfático (Nl), medula (Me) (**Figura 2A**). Em B apresenta a cápsula (Ca) e o centro germinativo (Cg). A barra de escala A : 200 µm e B : 80 µm.....31.

Figura 03: Fotomicrografia do baço de ratos, corados em HE em pequeno aumento (**Figura 3A e B**). Podem ser observadas as áreas do baço: polpa vermelha (Pv), polpa branca (Pb) e arteríola (Ar) (**Figura 3A**). Em B apresenta a esquerda a zona marginal (Zm) e o nódulo linfático (Nl) e a direita os cordões esplênicos (Ce) e na seta a artéria. A barra de escala A : 200 µm e B : 80 µm.....35.

Figura 04: Principais passos enzimáticos da via proteolítica dependente de ubiquitina/proteassoma. E1 enzima ativador de ubiquitina, E2 enzima. conjugador de ubiquitina, E3 ligase de ubiquitina–proteína, Ub ubiquitina ou grupo ubiquitil.....44.

Figura 05: Estrutura tridimensional do proteassoma 20S de *Thermoplasma acidophilum* e de *Saccharomyces cerevisiae*. Os painéis de cima mostram uma vista de topo dos anéis α da

espécie mencionada. Os painéis de baixo, evidenciam a estrutura em forma de barril formada por 4 anéis empilhados45.

Figura 06: Estrutura cristalográfica da EP24.15 por difração de raio-X.....51.

Figura 07: Representação dos aminoácidos responsáveis pela coordenação do zinco no sítio catalítico da EP24.15 de rato.....52.

Figura 08: A Fotomicrografia A-C mostram o aspecto típico de uma reação controle, na qual houve omissão do anticorpo primário ou substituição por soro de coelho. Contra coloração hematoxilina. A barra de escala A,B e C é equivalente a 200 μm58.

Figura 09: Fotomicrografia do timo de ratos em pequeno aumento, mostrando o padrão típico de imunomarcção da EP24.15 em todas as estruturas do timo. Note que a imunoreação para EP14.15 pode ser observada em várias áreas do timo: cápsula (Ca) (**detalhe da Figura 9A**), córtex (Co), medula (Me). A barra de escala é equivalente a 200 μm61.

Figura 10: Fotomicrografia do timo de ratos, mostrando o padrão típico de imunomarcção da EP24.15. Em **A**, a região do córtex do timo é vista em médio aumento. A imunoreação nos macrófagos predominantemente citoplasmática ($\rightarrow$) e nos núcleos das células endoteliais($\text{—}\blacktriangleright$) também pode ser observado uma imunoreatividade nas células epiteliais reticulares na cápsula do órgão ($\blacktriangleright$). Em **B**, a região do córtex intermediário e profundo do timo é vista em maior aumento. Macrófagos apresentam imunoreação para EP24.15 no núcleo e no citoplasma com o mesmo padrão ($\blacktriangleright$). Algumas células reticulo-epiteliais

mostraram a imunorreação, tanto no citoplasma como no núcleo, este, porém, com marcação mais intensa (→). A barra de escala : A é 80 µm e em B 20µm.....62.

Figura 11: Fotomicrografia do timo de ratos, mostrando o padrão típico de imunomarcção da EP24.15. Em **A**, a região da medula do timo é vista em maior aumento. Note a imunoreação das células epiteliais reticulares (→). Em **B**, observamos os corpúsculos tímicos (de Hassal) (→) estes apresentam reativos para EP24.15. A barra de escala: A e B é de 20 µm.....63.

Figura 12: Fotomicrografia do baço de ratos em pequeno aumento, mostrando o padrão típico de imunomarcção da EP24.15 em todas as estruturas do baço. Note que a imunoreação para EP24.15 pode ser observada em várias áreas do baço: polpa vermelha (Pv), polpa branca (Pb) e cápsula (Ca). A barra de escala de 1cm é equivalente a 200 µm.....65.

Figura 13: Fotomicrografia do baço de ratos, mostrando o padrão típico de imunomarcção da EP24.15. Em **A**, a região da polpa branca (Pb) do baço é vista em médio aumento. A imunoreação nos macrófagos predominantemente citoplasmática e nos núcleos das células endoteliais (→) (**detalhe da Figura 13A**). Em **B**, a região da polpa branca (Pb) é vista em maior aumento. Macrófagos apresentam imunoreação para EP24.15 no citoplasma (→). A barra de escala: A é 80 µm e em B 20µm.....66.

Figura 14: Fotomicrografia do baço de ratos, mostrando o padrão típico de imunomarcção da EP24.15. Em **A**, a região da polpa vermelha (Pv) do baço é vista em médio aumento. Observamos na região dos cordões esplênicos, imunoreação nos macrófagos pleomórficos (→). Em **B**, a região da polpa vermelha (Pv) é vista em maior aumento. Macrófagos da

região sinusóide (Si) apresentam imunoreação para EP24.15 no citoplasma e no núcleo (→). A barra de escala: A é 80 µm e em B 20µm.....67.

Figura 15: Fotomicrografia do linfonodo de ratos em pequeno aumento, mostrando o padrão típico de imunomarcção da EP24.15 em todas as estruturas do linfonodo. Note que a imunoreação para EP14.15 pode ser observada em várias áreas do linfonodo: cápsula (Ca), córtex (Co), paracórtex (Pa), medula (Me). Note que na cápsula a reação predominou em fibroblastos (→) (**detalhe da Figura 15A**). A barra de escala de 1cm é equivalente a 200 µm.....70.

Figura 16: Fotomicrografia do linfonodo de ratos, mostrando o padrão típico de imunomarcção da EP24.15. Em **A**, observamos a cápsula (Ca), centro germinativo (Cg), zona do manto (Zm), córtex (Co) é vista em médio aumento. Macrófagos foi o tipo celular com maior marcação (→). Em **B**, a região do nódulo linfático (NI) é vista em maior aumento. Macrófagos apresentam imunoreação para EP24.15 no centro germinativo (Cg)(→) e na zona do manto (Zm); note que células reticulares apresentaram marcação citoplasmática. A barra de escala: A é 80 µm e em B 20µm.....71.

Figura 17: Fotomicrografia do linfonodo de ratos, mostrando o padrão típico de imunomarcção da EP24.15. Em **A**, observamos a região da medula (Me), cordões esplênicos (Ce), seios medulares (Sm) é vista em médio aumento. Macrófagos foi o tipo celular com maior marcação (►), também ocorreu marcação nas células reticulares (→). Em **B**, a região da medula (Me) é vista em maior aumento. Macrófagos apresentam imunoreação para EP24.15(→), linfócitos apresentam imunomarcção nuclear e citoplasmática (►). A barra de escala: A é 80 µm e em B 20µm.....72.

Figura 18: Fotomicrografia do linfonodo de ratos, mostrando o padrão típico de imunomarcacão da EP24.15. Em **A**, observamos a região da medula (Me) que é vista em maior aumento. Macrófagos com maior marcação ($\rightarrow$), também ocorreu marcação nas células reticulares ($\blacksquare$). Em **B**, a região da medula (Me) é vista em maior aumento. Linfócitos grandes apresentam imunoreacção para EP24.15($\rightarrow$).A barra de escala: A e B é de 20 μm 73.

SUMÁRIO

1.INTRODUÇÃO.....	21
2.OBJETIVOS.....	23
2.1 OBJETIVO GERAL.....	23
2.2 - OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	23
3.REVISÃO DE LITERATURA.....	24
3.1 - SISTEMA IMUNOLÓGICO.....	24
3.2 – TIMO.....	25
3.3 LINFONODO.....	29
3.4- BAÇO.....	32
3.5- COMPLEXO PRINCIPAL DE HISTOCOMPATIBILIDADE.....	36
3.6- PROCESSAMENTO DE ANTÍGENOS.....	39
3.7-PROTEASSOMO.....	40
3.8- IMUNOPROTEASSOMA.....	42
3.9- COMUNICAÇÃO CELULAR.....	46
3.10- PEPTÍDEOS.....	47
3.11- PEPTIDASE.....	48
3.12 - ENDOPEPTIDASE 24.15 (E.C 3.4.24.15).....	50
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	56
4.1 -ANIMAIS.....	56
4.2- PROCESSAMENTO HISTOLÓGICO.....	56
4.3 - IMUNOHISTOQUÍMICA PARA MICROSCOPIA DE LUZ.....	57
5. RESULTADOS.....	59
5.1 - ANÁLISE POR IMUNOHISTOQUÍMICA.....	59

5.1.1 – Timo.....	59
5.1.2 – Baço.....	64
5.1.3 - Linfonodo.....	68
6. DISCUSSÃO.....	74
7. CONCLUSÕES.....	78
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	79

1. INTRODUÇÃO

O sistema imunológico em geral está presente no sangue e na linfa com células circulantes, em coleções celulares anatomicamente definidas nos órgãos linfóides e disseminadas em quase todos os tecidos. A habilidade do sistema imunológico para enfrentar desafios e desempenhar as funções protetoras de maneira eficaz depende de várias propriedades de suas células. (ABBAS, 2008).

Os órgãos linfóides são classificados em primários, onde os linfócitos expressam inicialmente os receptores de antígenos e atingem a maturidade fenotípica e funcional, e em órgão secundários, onde as respostas dos linfócitos aos antígenos estranhos são iniciadas e desenvolvidas. Entre os órgãos linfóides primários dos mamíferos, encontramos a medula óssea, que dá origem a todos os linfócitos e competência aos linfócitos B, e o timo, onde as células T se desenvolvem e atingem um estado de competência funcional. Os órgãos e tecidos linfóides periféricos incluem os linfonodos, o baço, o sistema imunológico cutâneo e o sistema imunológico associado às mucosas. Além disso, agregados de linfócitos mal definidos são encontrados nos tecido conjuntivo e em praticamente todos os órgãos, exceto no sistema nervoso central (GENESER, 2003).

Estudos mostram que os órgãos do sistema imune possuem função fisiológica correlacionada com as moléculas do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) e a apresentação de antígenos às células T. De fato, as moléculas do MHC são componentes integrais dos ligantes que a maioria das células T reconhece, pois os receptores de antígenos de células T são específicos para complexos de peptídeos antigênicos e moléculas MHC do hospedeiro. Existem dois tipos principais de produtos dos genes MHC, chamados de moléculas da classe I e moléculas da classe II, correlacionados a tipos diferentes de antígenos. As moléculas da classe I apresentam peptídeos aos linfócitos citotóxicos CD8+, enquanto as moléculas da classe II os apresentam às células T auxiliares CD4+. Assim, o conhecimento da estrutura e biossíntese das células MHC e da associação de peptídeos antigênicos a elas é fundamental para compreendermos como as células T reconhecem antígenos estranhos (ROIT et al., 2003).

Segundo ABBAS (2008), vários métodos de análise têm sido usados para estudar as interações antígenos-MHC. Os primeiros estudos dependiam de ensaios funcionais de células T auxiliares e CTLs que respondiam às células apresentadoras de antígenos incubadas com diferentes antígenos. Determinando-se que tipos de peptídeos derivados de antígenos protéicos complexos poderiam ativar as células T de animais imunizados com esses antígenos, era possível definir as características dos peptídeos que permitem que eles fossem apresentados pelas células apresentadoras de antígenos.

Os peptídeos que se ligam as moléculas do MHC apresentam características estruturais em comum que promovem esta interação. Uma dessas características é o tamanho do peptídeo, as moléculas da classe I podem acomodar peptídeos que possuem de 8 a 11 aminoácidos. A ligação dos peptídeos as moléculas do MHC é feita por meio de uma interação não-covalente mediada por aminoácidos tanto nos peptídeos quanto nas fendas das moléculas do MHC. Os antígenos protéicos são clivados proteoliticamente nas células apresentadoras de antígenos para gerar os peptídeos que serão ligados e exibidos pelas moléculas MHC (PAMER & CRESSWELL, 1998). O complexo de proteases do citosol, chamado proteassoma, degrada as proteínas do citosol em peptídeos que são subsequentemente apresentados por moléculas MHC classe I (SARIC et al., 2001).

A endopeptidase 24.15 é uma metalopeptidase que está presente no citoplasma da célula (GIOLI et. al., 2003), participando da degradação de peptídeos citoplasmático pós proteassoma e diversos trabalhos associam a peptidase em questão à apresentação de antígenos pelas moléculas de MHC-I (SILVA et al., 1999, PORTARO et al., 1999; YORK et al., 2003; KIM et al., 2003;). O presente trabalho, portanto objetiva verificar a expressão desta enzima em órgãos do sistema imunológico.

2- OBJETIVO GERAL

Verificar a distribuição tecidual da EP 24.15 por imuno-histoquímica, nos órgãos linfóides de ratos.

3.1- OBJETIVO ESPECÍFICOS

- 1) Verificar o padrão de expressão da EP 24.15 em órgãos linfóides primário: Timo.
- 2) Verificar o padrão de expressão da EP 24.15 em órgãos linfóides secundário: Baço e linfonodo.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1- SISTEMA IMUNOLÓGICO

O sistema imunológico forma a segunda e a terceira linhas da defesa contra patógenos invasores. A primeira linha de defesa é a barreira epitelial, ou seja, a pele e as mucosas, que forra e reveste completamente as superfícies do corpo. Uma vez vencida esta barreira física por um corte, rompimento ou abrasão, ou até mesmo quando substâncias estranhas são capazes de penetrá-la, mas ainda não o fizeram, a segunda e terceira linhas de defesa podem tornar-se ativadas, o sistema imunológico inato e adaptativo (ABBAS, 2008).

O sistema imunológico inato é inespecífico e é composto por um sistema de macromoléculas presente no sangue denominado complemento; grupos de células (macrófagos e neutrófilos,) que fagocitam invasores; outro grupo de células, células “natural killer” (células NK), que destroem células tumorais, células infectadas por vírus, bactérias e parasitos (BENJAMINI et al., 2002).

O sistema imunológico adaptativo é responsável pela eliminação dos antígenos específicos. Enquanto um macrófago é capaz de fagocitar a maioria das bactérias, o sistema imunológico adaptativo não somente reage contra um componente antigênico específico de um agente patogênico, como sua capacidade de reagir contra aquele componente em particular aumenta com defrontações subseqüentes. Apesar de estes dois sistemas diferirem em seu modo de responder, eles estão intimamente relacionados um ao outro, e cada um afeta as atividades do outro (GARTNER & HIATT, 2007).

A resposta do sistema imunológico adaptativo apresenta quatro propriedades distintas: especificidade, diversidade, memória e reconhecimento do próprio/não próprio, isto é, a capacidade de distinguir as estruturas que pertencem ao próprio organismo, e as que são estranhas. Os linfócitos T, linfócitos B e macrófagos especializados denominados células apresentadoras de antígeno (APCs) dão início e participam da resposta imunológica

adaptativa. Estas células comunicam-se umas com as outras através de moléculas sinalizadoras (citocinas), que são liberadas em resposta quando são encontrados os antígenos. A resposta imunológica dependente da formação de anticorpos é denominada resposta imunológica humoral, enquanto a resposta citotóxica é denominada resposta imunológica celular (BENJAMINI et al., 2002).

3.2- TIMO

O timo é um órgão linfoepitelial situado no mediastino anterior, atrás do esterno e na altura dos grandes vasos do coração. Possui origem embriológica dupla mesoderma e endoderma. É formado por lobos incompletos, envoltos por uma cápsula de tecido conjuntivo denso não modelado. A cápsula origina septos, que dividem o parênquima em lóbulos incompletos, contínuos uns com os outros. O córtex contém uma densa coleção de linfócitos T imaturos, macrófagos e células reticulares epiteliais. Enquanto a medula, de coloração mais clara, possui uma população mais esparsa de linfócitos (figura 01). Células epiteliais não-linfóides, que possuem um citoplasma abundante, estão espalhadas pelo timo, assim como macrófagos e células reticular epitelial derivadas da medula óssea. Alguns dessas células reticulares epitelial expressam marcadores celulares, como o CD8, que são encontrados tipicamente em linfócitos T. Na medula do timo estão estruturas conhecidas como corpúsculos de Hassall, que são compostos de espirais compactadas de células epiteliais que podem ser remanescentes de células em degeneração (figura 01). O timo tem um suprimento vascular abundante e vasos linfáticos eferentes que drenam para os linfonodos do mediastino (GARTNER & HIATT, 2007).

O timo é o local da capacitação das células T. Os linfócitos T no timo, também chamados de timócitos, são linfócitos T em vários estágios de diferenciação. Em geral, as células mais imaturas da linhagem de células T entram no córtex do órgão através dos vasos sanguíneos. O desenvolvimento começa no córtex e, conforme os timócitos vão se diferenciando, eles migram para a medula, de forma que a medula contém principalmente células T desenvolvidas. Só as células T competentes deixam o timo e entram no sangue e nos tecidos linfóides periféricos (ABBAS, 2008).

O timo produz vários fatores de crescimento protéicos que estimulam a proliferação e a diferenciação de linfócitos T, atuando localmente por secreção parácrina. Dentre estes fatores estão a timosina alfa, timopoetina e timulina (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2008).

De acordo com GARTNER & HIATT (2007), no timo encontramos seis tipos diferentes de células reticulares epiteliais. As células tipo I, II e III localizam-se no córtex enquanto que as IV, V e VI localizam-se na medula. As células do tipo I separam o córtex da cápsula de tecido conjuntivo e das trabéculas, envolvem os elementos vasculares corticais. Estas células formam junções de oclusão umas com as outras, deste modo isolando completamente o córtex tímico do restante do corpo. O núcleo das células tipo I é polimorfo e tem um núcleo bem definido.

As células tipo II estão localizadas no córtex, intermediário. Estas células têm prolongamentos longos, largos, semelhantes a bainhas, que formam junções tipo desmossomo umas com as outras. Estes prolongamentos formam um retículo celular, que subdivide o córtex tímico em pequenos compartimentos cheios de linfócitos. O núcleo das células tipo II é grande, pouco corado com heterocromatina escassa. O citoplasma, também claro, é muito rico em tonofilamentos. As células tipo III estão localizadas no córtex profundo e na junção corticomedular. O citoplasma e o núcleo destas células são mais densos do que os das células reticulares epiteliais do tipo I e tipo II. O retículo endoplasmático rugoso das células tipo III mostra cisternas dilatadas, o que é indicativo de síntese protéica. As células reticulares epiteliais também têm prolongamentos largos, semelhantes a bainhas, que delimitam compartimentos cheios de linfócitos (GARTNER & HIATT, 2007).

As células do tipo II e III, assim como as APCs derivadas da medula óssea, também apresentam antígenos próprios, moléculas MHC I e moléculas MHC II para as células T em desenvolvimento. Os linfócitos T em capacitação cujo receptor de célula T (TCRs), reconhecem proteínas próprias, ou cujas moléculas $CD4^+$ ou $CD8^+$ não são capazes de reconhecer as moléculas MHC I ou MHC II, sofrem apoptose antes de poderem deixar o córtex. É interessante observar que muitas das células T em diferenciação morrem no córtex, sendo fagocitadas por macrófagos residentes, denominados macrófagos de corpo

corável. As células sobreviventes penetram na medula do timo como linfócitos T capacitados, e de lá (ou da junção corticomedular), eles são distribuídos para os órgãos linfáticos secundários através do sistema vascular (ABBAS, 2008).

A medula do timo cora-se muito menos intensamente do que o córtex, porque sua população de linfócitos não é tão abundante, e por conter um grande número de células reticulares epiteliais derivadas do endoderma. Na medula há três tipos de células reticulares epiteliais (JOHNSON, 1991).

As células tipo IV são encontradas em íntima associação com as células tipo III do córtex e participam da formação da junção corticomedular. O núcleo destas células tem uma malha grosseira de cromatina, e seu citoplasma tem coloração escura e é rico em tonofilamentos. As células tipo V formam o retículo celular da medula. O núcleo destas células é polimorfo, com uma malha de cromatina bem definida.

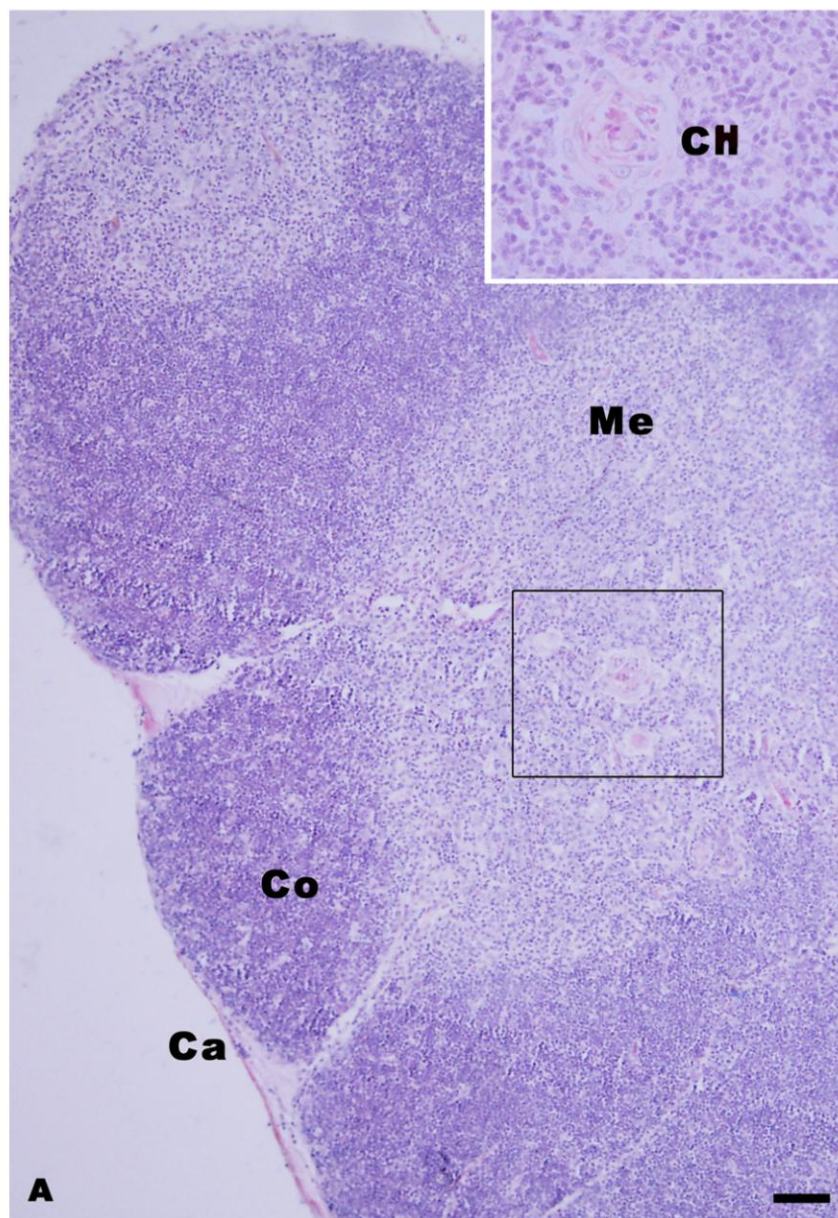


Figura 01: Fotomicrografia do timo de ratos, corados em HE em pequeno aumento. Podem ser observadas as áreas do timo: cápsula (Ca), córtex (Co), medula (Me), corpúsculo de Hassal (**detalhe da Figura 1A**). A barra de escala: 200 μ m e detalhe da figura 1 A : 80 μ m.

3.3- LINFONODOS

Os linfonodos estão localizados em várias regiões do corpo, encontram-se interpostos no trajeto dos vasos linfáticos e nas cavidades do corpo. Seu parênquima é composto por coleções de linfócitos T e B, APCs e macrófagos. Estas células linfóides reagem contra presença de antígenos montando uma resposta imunológica para macrófagos que fagocitam bactérias e outros microorganismos que chegam ao linfonodo através da linfa (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2008).

De acordo com GENESER (2003), os linfonodos, são órgão linfóides secundários, todos eles controlados e supervisionados pelos linfócitos, e são o local onde os linfócitos encontram os antígenos estranhos e podem ser ativados como etapa inicial da resposta imunológica. O linfonodo é envolto por uma cápsula de tecido conjuntivo denso, rico em colágeno, que em sua superfície externa é contínuo ao tecido conjuntivo circundante. Em um dos bordos se distingue uma fenda, ou hilo, onde a cápsula é mais espessa, numerosos vasos linfáticos aferentes atravessam a cápsula em distintos locais da superfície convexa, enquanto escassos vasos linfáticos eferentes abandonam o gânglio linfático pelo hilo, onde também penetram os vasos sanguíneos no órgão (figura 02).

A partir da superfície interna da cápsula se estendem quantidades variáveis de trabéculas ramificadas de tecido conjuntivo denso para o interior do tecido linfóide. O corpo do linfonodo, subdividindo a região externa do córtex em compartimentos incompletos, que se estendem até a proximidade do hilo e ao entrarem no corpo do nodo, são envolvidos por uma bainha de tecido conjuntivo derivado da cápsula. Suspensa da cápsula e das trabéculas há uma malha tridimensional de tecido conjuntivo reticular, que forma a estrutura de sustentação de todo o linfonodo. As células predominantes na cortical superficial são os linfócitos B, ocorrendo também alguns plasmócitos, macrófagos, células reticulares e células foliculares dendríticas. A região cortical profunda ou paracortical não apresenta nódulos linfáticos e nela predominam os linfócitos T, ao lado de células reticulares, e alguns plasmócitos e macrófagos (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2008).

Histologicamente, o linfonodo é subdividido em três regiões: córtex, paracórtex e medula (Figura 02). Todas estas três regiões têm abundantes sinusóides, espaços dilatados revestidos por endotélio através dos quais a linfa percorre (JOHNSON, 1991).

No córtex externo, mais periférico, estão localizados os nódulos linfáticos primários, que são agregações esféricas de linfócitos B. Frequentemente, os centros dos nódulos linfáticos estão corados mais fracamente e contêm centros germinativos, sendo denominados nódulos secundários. Os nódulos secundários formam-se somente em resposta a um desafio antigênico; acredita-se que estes sejam os locais onde são gerados as células B da memória e os plasmócitos. A região do nódulo linfático periférica ao centro germinativo é composta por um acúmulo denso de pequenos linfócitos, que estão migrando do local de origem nos nódulos secundários. Esta região periférica é denominada coroa ou manto (GARTNER & HIATT, 2007).

Na medula, o tecido linfóide apresenta condensações sobre a forma de cordões, os cordões medulares, estes separados dos seios medulares. Os cordões medulares apresentam-se ramificados e contêm pequenos linfócitos, plasmócitos e grande quantidade de macrófagos (GENESER, 2003).

Os vasos linfáticos aferentes perfuram a superfície convexa da cápsula do nodo e distribui a linfa no seio subcapsular, localizado abaixo da cápsula. Este seio é contínuo com os seios corticais (seios paratrabeculares), paralelos às trabéculas, e destes a linfa vai para os seios medulares. Os seios medulares são maiores, mais irregulares e mais numerosos do que os corticais, o que confere a medula o aspecto eosinófilo mais claro. Dos seios medulares, a linfa vai para os vasos linfáticos eferentes. Todos estes seios possuem uma malha de células reticulares estreladas cujos prolongamentos estão em contato com os de outras células e com o epitélio pavimentoso simples semelhante a um endotélio. Quando a linfa penetra no linfonodo, a velocidade de seu fluxo é reduzida, o que dá aos macrófagos residentes nos seios (ou têm prolongamentos que penetram nele) mais tempo para fagocitar material estranho. Desta maneira, são removidos 99% das impurezas presentes na linfa (JOHNSON, 1991).

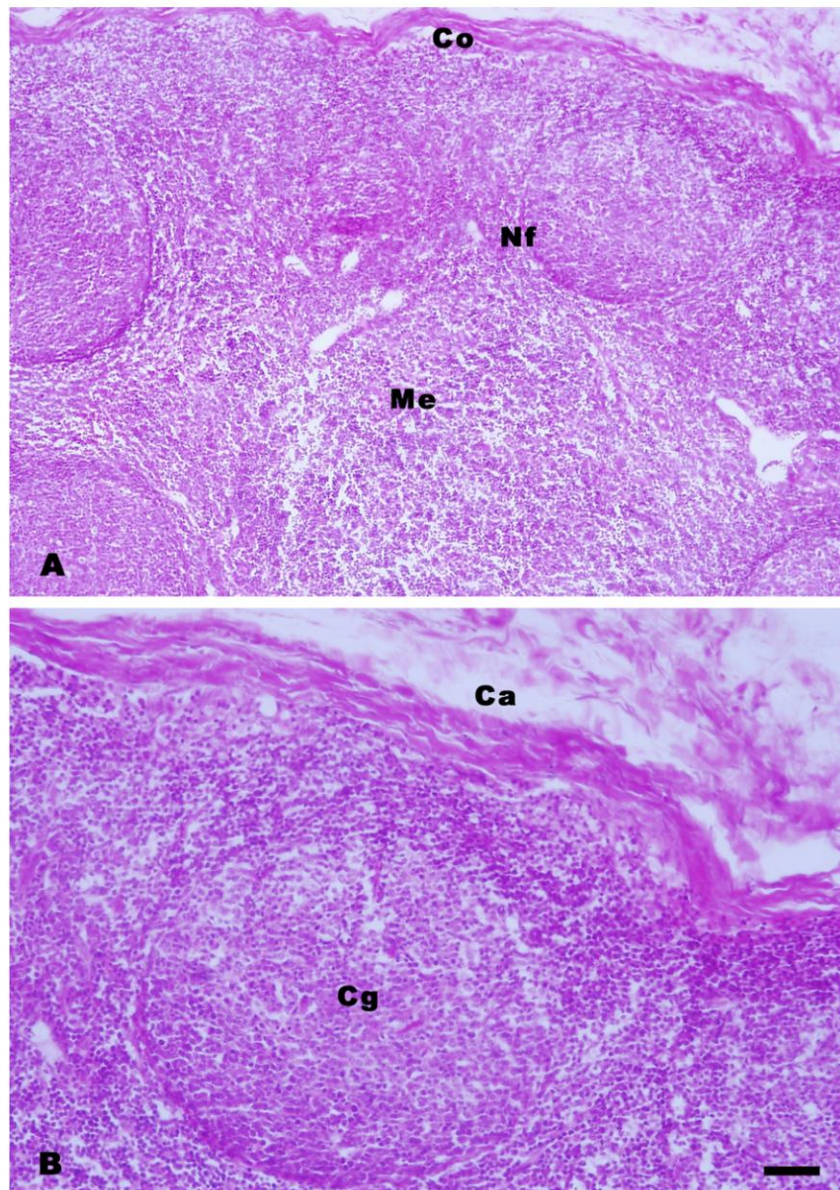


Figura 02: Fotomicrografia do linfonodo de ratos, corados em HE em pequeno aumento (**Figura 2A**). Podem ser observadas as áreas do linfonodo: córtex (Co), nódulo linfático (Nf), medula (Me) (**Figura 2A**). Em B apresenta a cápsula (Ca) e o centro germinativo (Cg). A barra de escala A : 200 μ m e B : 80 μ m.

Os linfonodos também funcionam como locais de reconhecimento de antígenos, porque as APCs que entram em contato com antígenos migram para o linfonodo mais próximo e apresentam seu complexo epítipo-HC a linfócitos. Além disso, antígenos circulando pelo linfonodo são capturados por células dendríticas foliculares, e linfócitos presentes no linfonodo, ou que migram para o linfonodo, reconhecem o antígeno. Quando um antígeno é reconhecido e uma célula B torna-se ativada, esta célula B migra para um nódulo linfático primário e prolifera formando um centro germinativo. O nódulo linfático primário passa a ser denominado nódulo linfático secundário. As células recém-formadas se diferenciam em células B da memória e plasmócitos, saem do córtex e formam os cordões da medula. Cerca de 10% dos plasmócitos recém-formados permanecem na medula e liberam anticorpos nos seios medulares (GARTNER & HIATT, 2007).

3.4- BAÇO

O baço, o maior órgão linfático do corpo, é um órgão linfóide secundário, está localizado no peritônio no quadrante superior esquerdo da cavidade abdominal. Do mesmo modo que os linfonodos, o baço tem características de um filtro complexo, mas encontra-se interposto na corrente sanguínea. O baço é o principal local de respostas imunológicas a antígenos do sangue e elimina do sangue hemácias danificadas. Durante o desenvolvimento fetal, o baço é um órgão hematopoiético; quando necessário, ele pode retomar essa função no adulto. Além disso, em alguns animais (mas não o ser humano), o baço também age como um reservatório de hemácias, que, havendo necessidade, podem ser lançadas na circulação (GARTNER & HIATT, 2007).

O baço é envolto por uma cápsula de tecido conjuntivo denso fibroelástico não modelado, contendo ocasionalmente fibras musculares lisas, está envolvida pelo peritônio visceral. O epitélio pavimentoso simples do peritônio dá ao baço uma superfície lisa. A partir da cápsula se estendem trabéculas de tecido conjuntivo denso para o interior do parênquima, ao qual confere rigidez, e que se divide em grande quantidade de porções

comunicadas entre si. Na porção da superfície medial voltada para o estômago se encontra uma fenda alongada, denominado hilo, onde a cápsula é mais espessa, e este local no qual entram as artérias e as fibras nervosas que as acompanham, e do qual sai veias e vasos linfáticos esplênicos (Figura 03) (GENESER, 2003).

O parênquima denomina-se polpa do baço ou polpa esplênica. Mediante o corte transversal de um baço fresco distingue-se a maior parte da polpa como uma massa mole, cor vermelho-escuro, a polpa vermelha. A cor vermelha se deve a uma grande quantidade de eritrócitos nos sinusóides e nos cordões esplênicos. Dispersas na polpa são observadas pequenas zonas ovais ou arredondadas, de cor branco-acizentadas, de cerca 1 mm de diâmetro, as polpas brancas, constituídas por tecido linfóide difuso e folicular (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2008).

O baço recebe sangue arterial pela artéria esplênica, a qual penetra pelo hilo e que, pouco antes, se divide em vários ramos esplênicos que penetram nas trabéculas como artérias trabeculares. Estas artérias continuam na polpa branca, onde são denominadas artérias centrais, cujas ramificações quase todas terminam na zona marginal entre as polpas vermelha e branca, o tronco principal continua até a polpa branca, onde o sangue passa aos sinusóides esplênicos que se esvaziam nas veias da polpa, que passam para as trabéculas como veias trabeculares. Estas formam a veia esplênica no hilo, que abandona o baço (JOHNSON, 1991).

A polpa branca é constituída por tecido linfóide que, sob a forma de bainhas linfóides periarteriais, rodeia os vasos arteriais desde que abandonam as trabéculas que quase até a formação dos capilares. As bainhas são cilíndricas e envolvem a artéria central, são compostas principalmente por linfócitos. Ao longo das bainhas linfóides, são observadas expansões como folículos linfáticos, primários ou secundários. Os folículos deslocam as artérias centrais para uma posição excêntrica na bainha periarterial. Os folículos primários e secundários contêm em sua maior parte linfócitos B (GARTNER & HIATT, 2007).

Na sua parte mais externa, a polpa branca limita-se com a polpa vermelha através de uma zona de transição, a zona marginal, onde as células mostram-se menos agrupadas.

Esta zona é constituída por plasmócitos, linfócitos T e B, macrófagos e as APCs. Além disso, numerosos pequenos canais vasculares, os seios marginais, estão presentes na zona marginal, especialmente envolvendo os nódulos linfáticos. Delicados vasos sanguíneos, que se irradiam da arteríola central, dirigem-se para a polpa vermelha, retornam e lançam seu sangue nos seios marginais (GARTNER & HIATT, 2007).

A polpa vermelha assemelha-se a uma esponja, sendo que os espaços da esponja representam os seios e o material entre os espaços representam os cordões esplênicos ou cordões de Billroth. Os cordões esplênicos são constituídos por uma rede frouxa de fibras reticulares, cujos interstícios estão permeados por sangue extravasado. As fibras reticulares estão envolvidas por células reticulares estreladas, que isolam as fibras de colágeno tipo III do sangue, impedindo a reação entre as plaquetas e o colágeno (coagulação). Os macrófagos são particularmente numerosos nas vizinhanças dos sinusóides (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2008).

O revestimento endotelial dos seios esplênicos é incomum, pois suas células são fusiformes paralelas ao eixo longitudinal do sinusóide. Além disso, são comuns os espaços (2 a 3 μ m de largura) entre células vizinhas. Os seios estão envolvidos por fibras reticulares (contínuas com as dos cordões esplênicos), que envolvem os seios como delgadas cordas individuais. As fibras reticulares dispõem-se perpendicularmente ao eixo longitudinal dos seios e estão revestidas por uma lâmina basal. Portanto, os seios esplênicos têm uma lâmina basal descontínua.

Quando entra na zona marginal, o sangue passa por uma zona rica em macrófagos. Estas células fagocitam os antígenos, bactérias e outras partículas estranhas presentes no sangue. O material não eliminado na zona marginal é removido na polpa vermelha na periferia dos seios esplênicos. Os macrófagos destroem plaquetas envelhecidas e observam as hemácias quando estas migram dos cordões esplênicos e, passando entre as células endoteliais, vão para os seios. Como as hemácias mais desgastadas pelo uso perdem a sua flexibilidade, elas não mais conseguem passar pelos espaços entre as células endoteliais e são fagocitadas pelos macrófagos (ABBAS et. al., 2008).

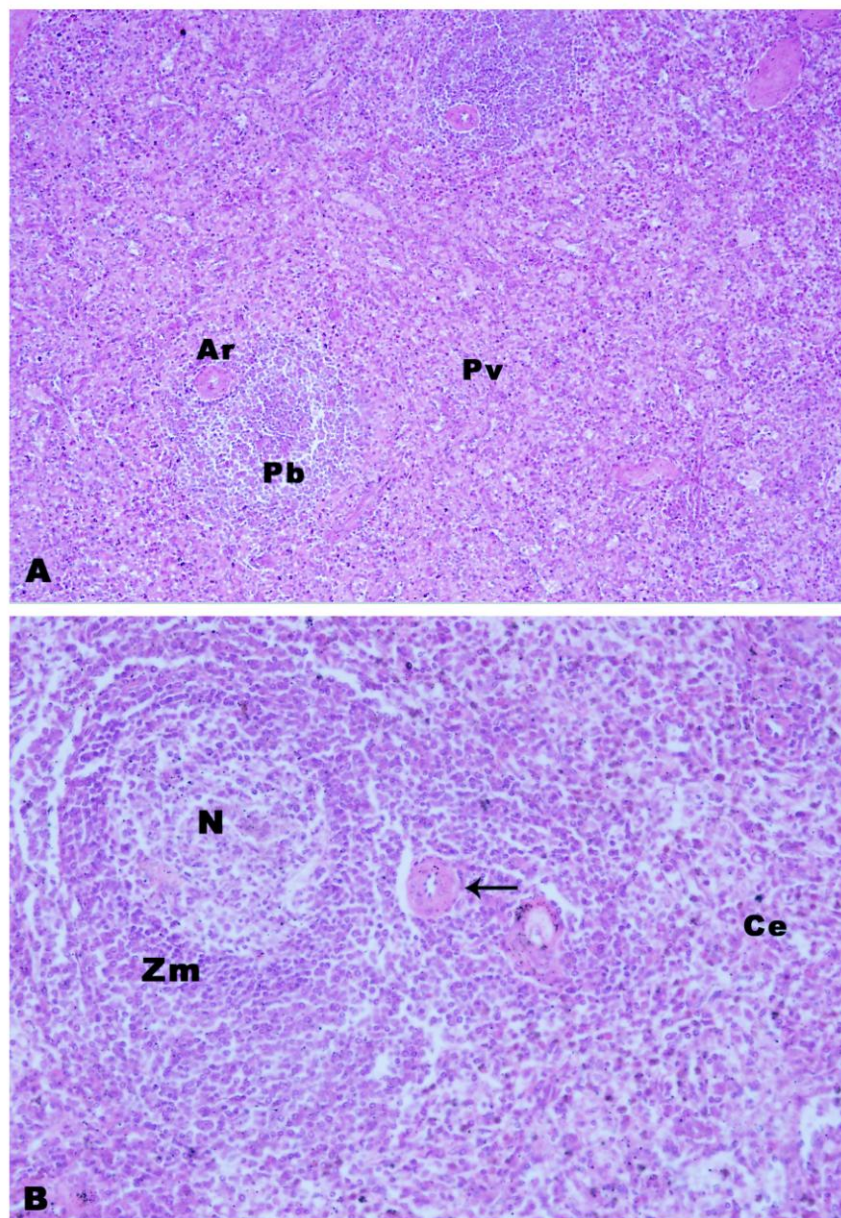


Figura 03: Fotomicrografia do baço de ratos, corados em HE em pequeno aumento (**Figura 3A**). Podem ser observadas as áreas do baço: polpa vermelha (Pv), polpa branca (Pb) e arteríola (Ar) (**Figura 3A**). Em B apresenta a esquerda a zona marginal (Zm) e o nódulo linfático (Nl) e a direita os cordões esplênicos (Ce) e na seta a artéria. A barra de escala A : 200 μ m e B : 80 μ m.

3.5 -COMPLEXO PRINCIPAL DE HISTOCOMPATIBILIDADE

O complexo principal de histocompatibilidade (MHC) foi descoberto como um *locus* extenso com genes altamente polimórficos que determinavam o resultado de transplante de órgãos entre pessoas diferentes. Atualmente sabemos que a função fisiológica das moléculas do MHC é a apresentação de antígenos às células T. De fato, as moléculas do MHC são componentes integrais dos ligantes que a maioria das células T reconhece, pois os receptores de antígenos de células T são específicos para complexos antigênicos e moléculas MHC do hospedeiro (PAMER & CRESSWELL, 1998). Existem dois tipos principais de produtos dos genes MHC, chamados de moléculas da classe I e moléculas da classe II, que testam tipos diferentes de antígenos cistosólicos intracelulares e extracelulares que tenham sido endocitados, respectivamente. As moléculas da classe I apresentam antígenos aos linfócitos citolíticos CD8⁺ (CTLs), enquanto as moléculas da classe II os apresentam às células T auxiliares CD4⁺. Assim, o conhecimento da estrutura e biossíntese das células MHC e da associação de antígenos a elas é fundamental para compreendermos como as células T reconhecem antígenos estranhos (ABBAS et. al., 2008).

As moléculas MHC da classe I consistem em duas cadeias polipeptídicas ligadas de forma não-covalente; uma cadeia α codificada pelo MHC (ou cadeia pesada) de 44 a 47 kD e uma subunidade de 12-kD, que não é codificada pelo MHC, chamada de β_2 -microglobulina. Cada cadeia α esta orientada de tal forma que três quartos de todo o peptídeo se estendem para o meio extracelular, um pequeno segmento hidrofóbico atravessa a membrana celular e os resíduos da região carboxiterminal estão localizados no citoplasma. O seu tamanho é suficiente ($\sim 25 \text{ \AA} \times 10 \text{ \AA} \times 11 \text{ \AA}$) para ligar peptídeos contendo 8 a 11 aminoácidos em uma conformação flexível, prolongada. As extremidades da fenda de ligação de peptídeos das moléculas da classe I são fechadas, impedindo a ligação de peptídeos maiores. Assim sendo, proteínas globulares nativas precisam ser “processadas” para gerar fragmentos pequenos suficientes para se ligarem às moléculas do MHC e para serem reconhecidas pelas células T. Os resíduos polimórficos das moléculas

da classe I estão confinados aos domínios $\alpha 1$ e $\alpha 2$, onde contribuem para as variações na ligação de peptídeos e o reconhecimento pelas células T dos diversos alelos da classe I. O segmento $\alpha 3$ da cadeia se dobra para formar um domínio de Ig cuja sequência de aminoácidos é a mesma em todas as moléculas da classe I. Esse segmento contém uma alça que serve de sítio de ligação para o CD8 (ROIT et al., 2003).

Com a descoberta de que as moléculas do MHC são as moléculas que apresentam os antígenos ao sistema imunológico adquirido, um grande esforço tem sido feito para elucidar a base molecular das interações peptídeo-MHC e as características dos peptídeos que permitem que eles se liguem às moléculas do MHC (YORK et al, 1999). Essas questões são importantes não só para entendermos a biologia do reconhecimento de antígenos pelas células T, mas também para definir as propriedades de uma proteína que a tornam imunogênica. Para que uma proteína seja imunogênica para um ser vivo, ela deve conter peptídeos que possam ligar as moléculas MHC daquele organismo (YORK et al, 1999).

Vários métodos de análise têm sido usados para estudar as interações peptídeo-MHC. Os primeiros estudos dependiam de ensaios funcionais de células T auxiliares e CTLs que respondiam às células apresentadoras de antígenos incubadas com diferentes peptídeos. Determinando-se que tipos de peptídeos derivados de antígenos protéicos complexos poderiam ativar as células T de animais imunizados com esses antígenos, era possível definir as características dos peptídeos que permitem que eles fossem apresentados pelas células apresentadoras de antígenos (PETER & OSSENDORP, 2004).

A natureza dos peptídeos que ligam ao MHC gerados *in vivo* de proteínas intactas foi analisada expondo-se as células apresentadoras de antígenos, a antígenos protéicos purificando e as moléculas de MHC a partir dessas células, por meio da cromatografia por afinidade, e removendo os peptídeos ligados para espectroscopia de massa ou sequenciamento de aminoácidos. O mesmo método pode ser usado para definir os peptídeos endógenos que são demonstrados pelas células apresentadoras de antígenos isoladas de animais ou de seres humanos (ABBAS, 2008).

A análise pela cristalografia de raio-X dos complexos peptídeo-MHC forneceu informações úteis sobre como os peptídeos se encaixam nas fendas das moléculas de MHC

e sobre os aminoácidos de cada um que participam nessa ligação. Com base em tais estudos, um grande entendimento das características físico-químicas das interações peptídeos-MHC. Também se tornou aparente que a ligação dos peptídeos as moléculas do MHC é fundamentalmente diferente da ligação dos antígenos aos receptores de antígenos dos linfócitos B e T (ABBAS, 2008).

Cada peptídeo contra o qual uma resposta imunológica pode ser gerada deve conter alguns aminoácidos que contribuem para a ligação nas fendas das moléculas do MHC e também deve conter aminoácidos que se projetem das fendas para que possam ser reconhecidas pelas células T. Existem várias características importantes nas interações entre as moléculas do MHC e os peptídeos antigênicos. A análise dos peptídeos retirados de moléculas do MHC livres de células apresentadoras de antígenos demonstrou que muitos peptídeos podem ser retirados de qualquer tipo de moléculas do MHC (PETER & OSSENDORP, 2004).

Os peptídeos que se ligam as moléculas do MHC apresentam características estruturais em comum que promovem esta interação. Uma dessas características é o tamanho do peptídeo - as moléculas da classe I podem acomodar peptídeos que possuem de 8 a 11 aminoácidos. A ligação dos peptídeos as moléculas do MHC é feita por meio de uma interação não-covalente mediada por aminoácidos tanto nos peptídeos quanto nas fendas das moléculas do MHC. Os antígenos protéicos são clivados proteoliticamente nas células apresentadoras de antígenos para gerar os peptídeos que serão ligados e exibidos pelas moléculas MHC. Várias proteínas envolvidas no processamento de antígenos protéicos e na apresentação de peptídeos às células T são codificadas pelos genes localizados no MHC. Os genes que codificam subunidades de um complexo de proteases do citosol, chamadas de proteassomas, que degradam as proteínas do citosol em peptídeos que são subsequentemente apresentados por moléculas da classe I do MHC (SILVA et al., 1999).

3.6-PROCESSAMENTO DE ANTÍGENOS

As APCs apresentam antígenos a linfócitos T jamais expostos a eles durante a fase efetora para desencadear os mecanismos que eliminam os antígenos. A maioria dos linfócitos T reconhece apenas peptídeos, enquanto os linfócitos B podem reconhecer peptídeos, proteínas, ácidos nucleicos, polissacarídeos, lipídios e pequenas substâncias químicas. Como resultado, as respostas imunes mediadas pelos linfócitos são induzidas somente por antígenos protéicos e não-protéicos (PETER & OSSENDORP, 2004).

Os linfócitos T reconhecem antígenos peptídicos estranhos e respondem a eles somente quando os antígenos estão fixados às superfícies das APCs. Os macrófagos são APCs que fagocitam ativamente grandes partículas, desempenhando importante papel na apresentação de antígenos derivados de organismos infecciosos fagocitados, como bactérias, parasitas e vírus. Na fase efetora da imunidade celular, os linfócitos T efetores diferenciados reconhecem antígenos microbianos em fagócitos e ativam os macrófagos para destruir os microorganismos (ROIT et al., 2003).

Todas as células nucleadas podem apresentar peptídeos associados a MHC da classe I, derivados de antígenos protéicos citosólicos, a linfócitos T CD8⁺ porque todas as células nucleadas expressam moléculas MHC da classe I. A maioria dos antígenos protéicos presentes no citosol é sintetizada endogenamente, como proteína virais em células infectadas por vírus e proteínas que sofreram mutação em células tumorais. Todas as células nucleadas são suscetíveis a infecções virais e a mutações causadoras de câncer. Portanto, é importante que o sistema imune seja capaz de reconhecer antígenos citosólicos abrigados em qualquer tipo celular. Os linfócitos T CD8⁺ diferenciados, que funcionam com CTLs, são capazes de reconhecer peptídeos associados à classe I e de eliminar qualquer célula expressando antígeno. A expressão universal de moléculas da classe I permite que CTLs restritas à classe I reconheçam e eliminem qualquer tipo de célula infectada por vírus ou célula tumoral. Os antígenos particulados fagocitados também podem ser reconhecidos por CTLs CD8⁺ porque algumas proteínas podem ser transportadas de vesículas fagocitárias ao citosol (ROIT et al., 2003).

As vias de processamento de antígenos convertem antígenos protéicos derivados do espaço extracelular ou do citosol em peptídeos e transportam esse peptídeos em moléculas do MHC para exibir a linfócitos T. O conhecimento de biologia celular do processamento antigênico tem aumentado desde a década de oitenta, com a descoberta e caracterização das moléculas e organelas que geram peptídeos a partir de proteínas intactas e promovem a montagem e o transporte de peptídeos nas moléculas do MHC. As vias das classes I e II do MHC para processamento e apresentação de antígenos usam organelas subcelulares e enzimas que tem funções de degradação protéica generalizada e de reciclagem que não são usadas exclusivamente para exibição de antígenos ao sistema imune. Em outras palavras, as vias de apresentação de antígenos do MHC das classes I e II evoluíram como adaptações de funções celulares básicas. As vias celulares de processamento antigênico são elaboradas para gerar peptídeos que tenham as características estruturais exigidas para associar moléculas do MHC e colocar esses peptídeos na mesma localização celular que as moléculas do MHC apropriadas com fendas disponíveis para ligação a peptídeos. A ligação de peptídeos a moléculas do MHC ocorre antes da expressão na superfície celular e é componente da biossíntese e montagem de moléculas do MHC (DOAN et al.,2006).

3.7- PROTEASSOMO

Os peptídeos associados ao MHC da classe I são produzidos pela degradação proteolítica de proteínas citosólicas, pelo transporte dos peptídeos gerados no retículo endoplasmático (RE) e pela ligação de moléculas da classe I recém-sintetizadas. O principal mecanismo para a geração de peptídios a partir de antígenos protéicos citosólicos é a proteólise pelo proteassomo. Muitas linhas de evidência estabeleceram conclusivamente ser necessária a degradação das proteínas citosólicas no proteassomo para a entrada na via da classe I de processamento de antígenos (FERRO et al., 2004).

A existência de degradação das proteínas intracelulares foi sugerida por SCHOENHEIMER (1942). Em 1953 surge uma publicação que mostra que a proteólise

intracelular é dependente de energia metabólica (SIMPSON, 1953). Nos anos 70 tornou-se evidente que a degradação de proteínas intracelulares é altamente seletiva e está envolvida na regulação da concentração de certas enzimas (SCHIMKE, 1975). De início foi difícil de compreender a necessidade da proteólise intracelular, uma vez que o que estava em causa era a hidrólise de ligações peptídicas das proteínas, que se pensava serem moléculas estáveis. Hoje em dia é evidente que o controle do nível de determinadas proteínas no interior das células durante certos processos celulares, bem como a eliminação de proteínas com erros de síntese, proteínas não funcionais e polipeptídios desnaturados, cuja acumulação poderia tornar-se tóxica, só pode ocorrer se existir proteólise seletiva. A descoberta da via proteolítica dependente de ubiquitina veio revolucionar a forma de olhar a degradação de proteínas intracelulares (RAMOS, 2002).

As proteínas multi-ubiquitiladas, após desenrolamento da sua estrutura, são degradadas pelo proteassoma 26S, uma protease multimérica dependente de ATP com ~2000 kDa, constituída por dois complexos regulatórios 19S e por um complexo catalítico de ~700 kDa, designado por proteassoma 20S. Os complexos regulatórios 19S, posicionados em ambas as extremidades do proteassoma 20S, compostos por várias ATPases e outras subunidades, são necessários para o reconhecimento específico de proteínas ubiquitiladas, seu desenrolamento e translocação para o interior da câmara catalítica. Na maioria dos casos o proteassoma degrada as suas proteínas-substrato reduzindo-as a pequenos peptídeos. Dado a sua estrutura, substratos e protease podem coexistir, nos mesmos compartimentos, uma vez que, só após marcação com a ubiquitina, o substrato está preparado para sofrer hidrólise no interior do proteassoma. Os proteassomas 20S apresentam uma estrutura muito conservada e encontram-se presentes desde arqueobactérias até mamíferos. Este complexo proteolítico é essencial para a viabilidade das células eucariotas. O complexo eucariota é composto por 14 subunidades diferentes que, de acordo com a análise de homologias entre as sequências, podem ser agrupadas em sete do tipo α e sete do tipo β . Estas subunidades estão dispostas em forma de um cilindro composto por quatro anéis heptaméricos com as subunidades α ocupando os anéis periféricos e as subunidades β os anéis centrais. Este cilindro é atravessado por um túnel

estreito que faz a comunicação entre três cavidades interiores. A cavidade central possui os centros catalíticos voltados para o interior (RAMOS, 2002).

Os proteassomas eucariotas possuem pelo menos três atividades catalíticas diferentes, atividade pós-acídica (clivagem da ligação peptídica após um resíduo ácido), tríptica (clivagem após um resíduo básico) e quimotríptica (clivagem após um resíduo hidrófobo), cujos centros catalíticos se localizam em três subunidades β distintas, $\beta 1$, $\beta 2$ e $\beta 5$ respectivamente. Estas subunidades que contêm os centros catalíticos possuem uma treonina no terminal N, este resíduo age como um nucleófilo atacando as ligações peptídicas das proteínas-substrato (RAMOS, 2002).

3.8- IMUNOPROTEASSOMAS

Nos vertebrados as subunidades com atividade catalítica constitutivas do proteassoma podem ser substituídas especificamente por subunidades catalíticas homólogas, LMP2 ($\beta 1i$), MECL ($\beta 2i$) e LMP7 ($\beta 5i$) induzidas pelo interferon γ , citocinas e fator de necrose tumoral (TNF), sendo incorporadas durante a síntese e montagem de novos proteassomas no local das subunidades habituais (PETER & OSSENDORP, 2004). A incorporação destas subunidades altera a especificidade da clivagem das ligações peptídicas e coloca o proteassoma num papel central na produção de peptídeos antigênicos a partir de proteínas de agentes patogênicos intracelulares, tais como bactérias ou vírus (DREWS et al., 2007), através destas mudanças o proteassoma passa a ser denominado de imunoproteassoma, especialmente em órgãos linfóides desempenhando um papel crucial na resposta imune mediada por células T (SHAROVA et al., 2009). Em termos fisiológicos o imunoproteassoma está presente em grandes quantidades nos órgãos intimamente ligados com as respostas imunes, como o baço, timo e linfonodo, mas são quase ausentes em outros órgãos, incluindo o cérebro e os rins (ELEUTERI et al. 1997; NODA et al, 2000).

De acordo com SHAROVA et al., (2009), o imunoproteassoma é capaz de hidrolisar proteínas próprias e estranhas. No entanto, o imunoproteassomas, após resíduos básicos ou

hidrofóbicos, que representam o epítipo na região C terminal do complexo MHC classe I. Assim, o imunoproteassoma produz com sucesso epítipos antigênicos de 8 -10 resíduos de aminoácidos e / ou seus precursores mais longos. Epítipos precursores são encurtados por peptidases no citoplasma ou no retículo endoplasmático, onde são transferidos por proteínas especiais, transportadoras (STREHL et al 2005, GOLDBER et al., 2007). No retículo endoplasmático, epítipos antigênicos estão vinculados com moléculas MHC Classe I e transportados em vesículas trans-membrana para superfície celular.

Os imunoproteassomas estão presentes tanto nos órgãos linfóides e órgãos não-linfóides de animais adultos, onde desempenham diferentes papéis sobre a criação de epítipos antigênicos ou seus precursores (SHAROVA, 2006). Nos órgãos linfóides secundários, o complexo MHC classe I e os epítipos antigênicos na superfície de células apresentadoras de antígenos, são muito importantes para a ativação e diferenciação de células T-CD8 em linfócitos T citotóxicos específicos para estes epítipos antigênicos.

O acesso ao interior do proteassoma 20S é bastante restrito, no caso de proteassomas bacterianos existe uma pequena abertura no centro dos anéis externos (anéis α), no entanto, a análise da estrutura do proteassoma 20S de levedura mostra que essa entrada se encontra preenchida pelos terminais N das subunidades α , (Figura 04). Embora peptídeos ou polipeptídeos sem estrutura possam atravessar estas entradas e sofrer hidrólise no interior da cavidade catalítica, o proteassoma 20S existe no citoplasma em estado latente. A entrada de substratos mais complexos e a sua degradação necessita de complexos ativadores 19S que se ligam às extremidades do proteassoma 20S originando o rearranjo dos terminais N das subunidades α que formam um poro de entrada. É nestes complexos ativadores que se encontram os locais de reconhecimento das cadeias poli-ubiquitiladas das proteínas-substrato e as atividades de isopeptidase que libertam a ubiquitina das cadeias deixando-a livre para entrar em novo ciclo de conjugação. O substrato é então desenrolado e translocado através do proteassoma até chegar à cavidade central onde é degradado. As subunidades com atividade ATPásica da partícula 19S são responsáveis por estes processos (DREWS et al., 2007).

Uma função fisiológica importante desta via é a produção de peptídeos antigênicos a partir de proteínas de bactérias ou vírus patogênicos. Os peptídeos apresentados às células citotóxicas T nas moléculas do complexo histocompatibilidade (MHC) de classe I são o resultado de proteólise limitada dos antígenos mediada pelo proteassoma. O interferon γ estimula este processo e induz a troca de subunidades catalíticas do proteassoma 20S. O sistema dependente de ubiquitina/proteassoma degrada indiscriminadamente tanto as proteínas celulares (*self*) como as estranhas (*non-self*). Os peptídeos são então apresentados às células citotóxicas T, mas apenas os derivados das proteínas estranhas estimulam a resposta das células T (RAMOS, 2002).

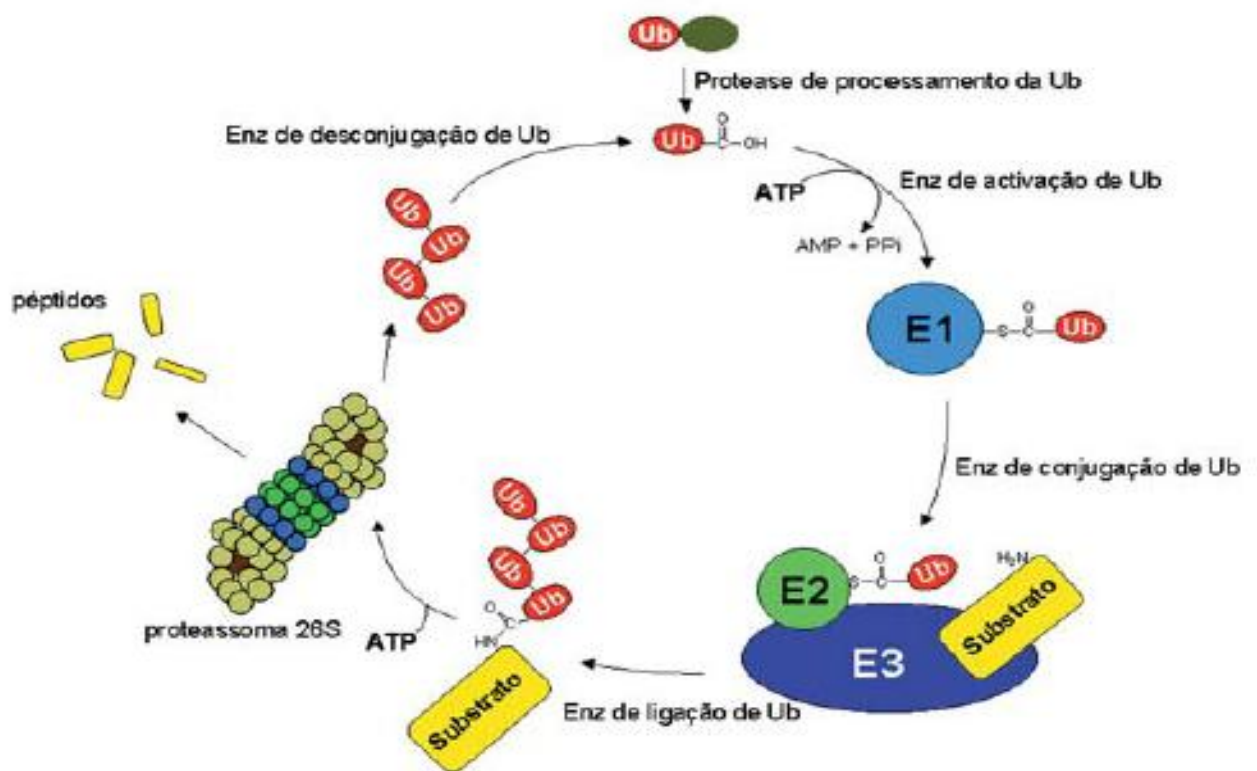


Figura 04: principais passos enzimáticos da via proteolítica dependente de ubiquitina-proteassoma. E1 enzima ativadora de ubiquitina, E2 enzima conjugadora de ubiquitina, E3 ligase de ubiquitina-proteína, Ub –ubiquitina ou grupo ubiquitil (RAMOS,2002).

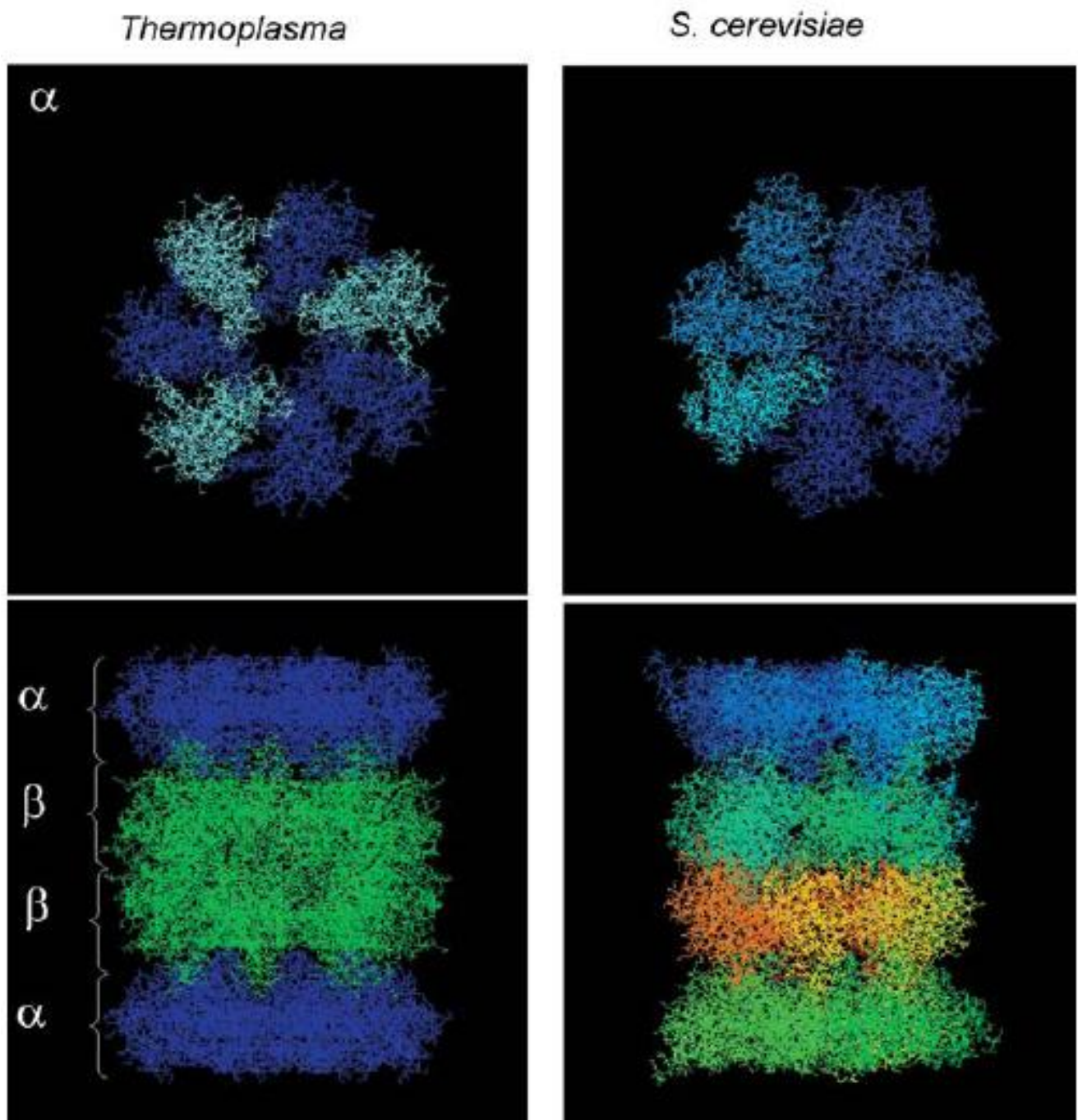


Figura 05: Estrutura tridimensional do proteassoma 20S de *Thermoplasma acidophilum* e de *Saccharomyces cerevisiae*. Os painéis de cima mostram uma vista de topo dos anéis α da espécie mencionada. Os painéis de baixo, evidenciam a estrutura em forma de barril formada por 4 anéis empilhados (RAMOS, 2002).

Estando na base de vários processos celulares importantes, não é surpresa que o mau funcionamento desta via esteja implicado na origem de muitas doenças. Em resposta a danos no DNA ou a agressões celulares, como uma infecção viral.

3.9-COMUNICAÇÃO CELULAR

A comunicação celular um fenômeno central durante o desenvolvimento e fisiologia dos organismos multicelulares (GALLIO et al., 2002). A comunicação celular pode ser feita de diversas maneiras, por exemplo, através de contato direto entre as células, pelo estabelecimento de junções do tipo gap, ou através de moléculas sinalizadoras que são secretadas (HARDIE, 1992). As moléculas sinalizadoras podem ser agrupadas em duas classes: As moléculas lipossolúveis, permeáveis à membrana plasmática (e.g. hormônios esteróides) e outra das moléculas hidrossolúveis que atuam através da interação com receptores específicos. Nessa última categoria encontram-se os neuropeptídeos (GALLIO et al., 2002).

A sinalização celular pode ocorrer basicamente de três maneiras: autócrina, parácrina ou endócrina. A sinalização autócrina ocorre quando a molécula sinalizadora liberada atua sobre a sua própria célula que a liberou. A sinalização parácrina ocorre quando a estimulação é em células vizinhas enquanto que a endócrina é aquela na qual a molécula sinalizadora atinge a corrente sanguínea atuando em um órgão ou tecido à distância (LODISH et al., 1999).

Uma vez que as cascatas de sinalização intracelulares dependem diretamente de interações entre proteínas, o estudo do metabolismo de peptídeos citoplasmáticos vem ganhando importância (FERRO et al., 2004). Até recentemente o conceito de peptídeos livres no citoplasma era questionado, mas tem sido demonstrado por vários autores que há uma grande quantidade de peptídeos gerados por proteólise intracelular mediada por proteassomo, esses peptídeos podem interferir em interações protéicas (revisão em FERRO et al., 2004). Como exemplo desta interferência foi verificado que o peptídeo Ht31 derivado

da cAMP-kinase da tireóide humana interfere com a localização da a proteína quinase A (PKA), o peptídeo inibitório relacionado a autocamitide-2 (AIP) é um inibidor específico da Proteína quinase II dependente de calmodulina (CaM-KII), outras como quiasas como c-JUN e fosfatases como RapA e RapB tem função alterada por pequenos peptídeos citoplasmáticos (FERRO et al., 2004). A localização preliminar de enzimas (peptidases) citoplasmáticas como endopeptidase 24.15, neurolisina (EP24.16), enzima de degradação de insulina (EC3.4.24.56), nardilisina (EC3.4.24.61) e prolil-oligopeptidase (EC 3.4.21.26), sugere que essas enzimas possuem outras funções, além de processamento e degradação extracelular de neuropeptídeos e hormônios tendo um papel na degradação de peptídeos livres no citoplasma (FERRO et al., 2004).

3.10 - PEPTÍDEOS

Quando um pequeno número de aminoácidos é reunido desta forma a estrutura é chamada de oligopeptídio e quando muitos aminoácidos são reunidos, o produto é chamado de polipeptídio. As proteínas podem ter milhares de unidades de aminoácidos. Embora o termo proteína e polipeptídios possam ser, em algumas vezes, intercambiáveis, as moléculas referidas como polipeptídios geralmente têm peso molecular abaixo de 10.000 (LEHNIGER et al., 2005).

Todo este conhecimento começou a ser acumulado principalmente a partir da década de 50, quando vários peptídeos ativos foram descobertos e tiveram as suas estruturas químicas determinadas (MACHADO et al, 2004). Estas descobertas geraram um enorme interesse por esta classe de compostos e por metodologias para seu isolamento, análise, purificação, identificação e quantificação, as quais passaram a ser sistematicamente estudadas e aprimoradas. Em paralelo, deparou-se com a necessidade de sintetizar estas moléculas e análogos (derivados com modificações pontuais) em escalas variadas, pois somente de posse dos sintéticos poder-se-ia realizar os estudos fisiológicos, químicos, físicos, farmacológicos, bioquímicos e clínicos de grande parte dos peptídeos conhecidos. De fato boa parte das fontes naturais, são pobres nestes compostos, o que dificulta os

isolamentos em quantidades suficientes à realização destes estudos (MACHADO et al, 2004).

Os peptídeos sintéticos passaram a servir como provas inequívocas das identidades químicas e dos papéis biológicos dos peptídeos naturais. Além disto, de posse deles poder-se-ia construir curvas padrões (concentração versus absorção ou emissão de luz ou desenvolvimento de coloração) que permitiriam quantificar os peptídeos correspondentes contidos em extratos brutos ou em frações obtidas durante os seus isolamentos (GLADA, et al 1998). Assim, métodos eficientes de síntese foram concebidos, estabelecidos e aprimorados. Conjuntamente, técnicas envolvendo a manipulação, síntese e clonagem de genes foram sendo desenvolvidas (MACHADO et al, 2004).

Os peptídeos com atividade biológica representam uma classe de mediadores endógenos. Este grupo heterogêneo é composto de moléculas que variam em tamanho de 5 a 50 aminoácidos e inclui substâncias como a angiotensina (REGOLI et al., 1974), cininas bradicinina e calidina (BHOOLA et al., 1992) encefalinas (JANECKA et al., 2004), endotelinas (MASAKI, 2004) peptídeo natriurético atrial (ANP) e peptídeos correlatos (D'SOUZA et al., 2004), neurotensina (DAVIS et al., 1992) taquicininas (substância P e neurocinina A e B)(MAGGI, 1995), vasopressina (HUANG e TANG, 2004) e hemopresina (FERRO et al., 2004) entre outros. Todos estes peptídeos atuam através de receptores específicos localizados na superfície de células endoteliais epiteliais, neuronais, músculo liso e esqueléticos e células de defesa (leucócitos, linfócitos e macrófagos) onde ativam uma variedade de respostas intracelulares. As atividades exercidas por estas moléculas são diversas, e incluem controle do tônus e permeabilidade vascular, algesia, neurotransmissão, crescimento celular e modulação da resposta inflamatória.

3.11- PEPTIDASE

As enzimas proteolíticas, também chamadas de peptidases, proteases ou proteinases atuam hidrolisando ligações peptídicas em proteínas ou em peptídeos. O comitê de nomenclatura da união internacional de bioquímica e biologia molecular (NC-IUBMB)

recomenda o uso do termo peptidase, uma vez que estas proteínas catalisam a clivagem de ligações peptídicas. As peptidases estão envolvidas em uma grande variedade de processos fisiológicos e patológicos, como por exemplo: digestão, ativação de zimogênios, regulação da pressão sanguínea, homeostase, imunidade celular e humoral, coagulação sanguínea, inflamação, fertilização, embriogenese, apoptose e outras (BARRETT, et al., 2004). Ocorrem em todos os organismos e representam aproximadamente 2% do total de proteínas presentes em todos os tipos de organismos. Usando análise bioinformática de genomas murinos e humanos, pelo menos 500 a 600 peptidases já foram identificadas, muitas das quais são ortólogas (PUENTE, et al., 2003).

Dois grupos genéricos compõem a família das peptidases: as endopeptidases (que clivam ligações peptídicas internas) e as exopeptidases (que removem aminoácidos terminais). Com base nos mecanismos catalíticos de hidrólise sobre o sítio ativo e na estrutura tridimensional, as endopeptidases são divididas em subclasses conforme semelhanças estatisticamente significativas na sequência de aminoácidos em: metalopeptidases, serino peptidases, cisteíno peptidases, aspártico peptidases, e treonina peptidase (BARRET, 2004). Algumas peptidases têm funções em processos biológicos mais especializados, como a ativação de zimogênio, remodelamento tissular, liberação de peptídeos ativos, ativação de receptores, desenvolvimento embrionário, morfogênese de órgãos, angiogênese, apoptose e outros (BODE, 1991). A atividade destas enzimas é regulada por ativação de zimogênios, proteólise limitada, ativadores, inibidores, receptores celulares e controle genético (BODE, 1991).

O estudo das peptidase tem se expandido consideravelmente após o reconhecimento de que além de suas funções inespecíficas no catabolismo protéico, agem como enzimas de processamento que desempenham clivagem altamente seletiva de substratos específicos e influenciam no comportamento, na sobrevivência e em morte celulares (TURK, 2006). O equilíbrio entre peptidases e inibidores não é regulado em muitos processos fisiopatológicos, como inflamação, infecção, hemorragia e câncer.

3.12 – ENDOPEPTIDASE 24.15

A endopeptidase 24.15, também conhecida como timet oligopeptidase (E.C. 3.4.24.15; EP24.15) endo-oligopeptidase A, oligopeptidase A, Pz-peptidase é uma metaloendopeptidase exibindo o motivo característico de ligação com zinco HEXXH pertencente à família M3 de metalopeptidases (RAWLINGS et al, 2010). A EP 24.15 foi primeiramente isolada da fração citosólica do homogenato do cérebro de ratos por ORLOWSKI et al. (1983), como sendo uma metalopeptidase ativa em pH neutro, inibida por quelantes de cátions divalentes. A presença de Zn^{+2} em sítio catalítico foi determinada por espectroscopia de absorção atômica, a inibição provocada pela remoção do metal do sítio catalítico com quelantes é revertida pela adição de zinco, mesmo em baixas concentrações (TISLJAR & BARRETT, 1990). A EP24.15 possui 687 resíduos de aminoácidos com peso molecular em torno de 78 kDa (PIEROTTI et al., 1990; MCKIE et al., 1993).

A EP 24.15 é de distribuição ubíqua em mamíferos. Em cérebro de rato (ORLOWSKI et al., 1983), a hidrólise revelou vários peptídeos biologicamente ativos com uma especificidade comum por peptídeos unidos a uma carboxila associada a um resíduo básico ou aromático (HORSTHEMKE e BAUER 1982). Os maiores níveis de atividade enzimática foram encontrados nos testículos, cérebro e pituitária. Os menores níveis de atividade enzimática foram encontrados em tecidos periféricos como fígado, rim, pulmão, adrenal e tireóide contendo aproximadamente 10–20% dos níveis encontrados cérebro (CHU e ORLOWSKI, 1985).

A EP 24.15 está localizada no pericário do neurônio, mas está concentrada no núcleo (MASSARELLI, 1999). A análise quantitativa revelou que a enzima encontravam-se preferencialmente no núcleo (FONTENELE-NETO et al., 2001). A enzima estava associada também a outras organelas tais como as mitocôndrias e elementos do citoesqueleto, tanto no pericário quanto nos processos dos neurônios. No núcleo acredita-se que participe no processo final da degradação de fatores de transcrição após proteasoma (FONTENELE-NETO et al., 2001).

A estrutura cristalográfica da EP24.15 foi determinada por difração de raio-X (RAY et al., 2004), apresentando dois domínios compostos principalmente por estruturas em α -hélice, sendo que entre esses dois domínios forma-se um “canal profundo” no qual o sítio ativo fica localizado.

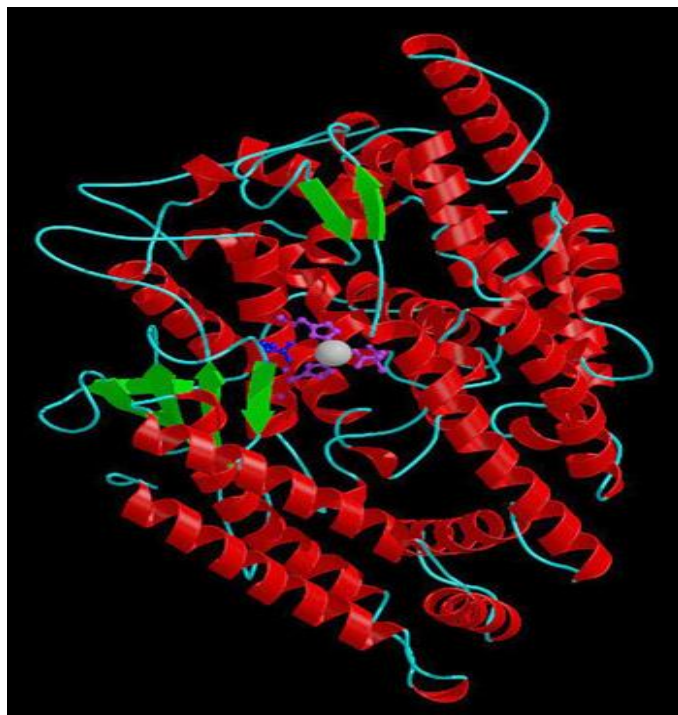


Figura 06: Estrutura cristalográfica da EP24.15 por difração de raio-X (RAY et al., 2004)

A EP24.15 possui uma especificidade restrita a oligopeptídeos de 6 a 17 resíduos de aminoácidos, tendo preferência por ligações peptídicas no C-terminal de aminoácidos hidrofóbicos, não sendo capaz de hidrolisar proteínas (OLIVEIRA et al., 2001). Essa característica de oligopeptidase parece ser decorrente da conformação espacial do substrato empregado, quando se consideram peptídeos entre 7 e 13 resíduos de aminoácidos (CAMARGO et al., 1997), ou ainda por uma limitação física dada pela conformação do sítio catalítico (RAY et al., 2000). Através de mutações sítio dirigidas, CUMMINS et al. (1999) elucidaram quais eram os resíduos responsáveis pela coordenação do zinco no sítio ativo ($^{473}\text{HExxH}^{477}$), mostrando ainda que, além das histidinas, há um terceiro ligante do zinco, o ácido glutâmico 502. A observação deste terceiro ligante a aproximadamente 25

resíduos de aminoácido de distância é uma característica dessa família de metalopeptidases (CUMMINS et al., 1999).

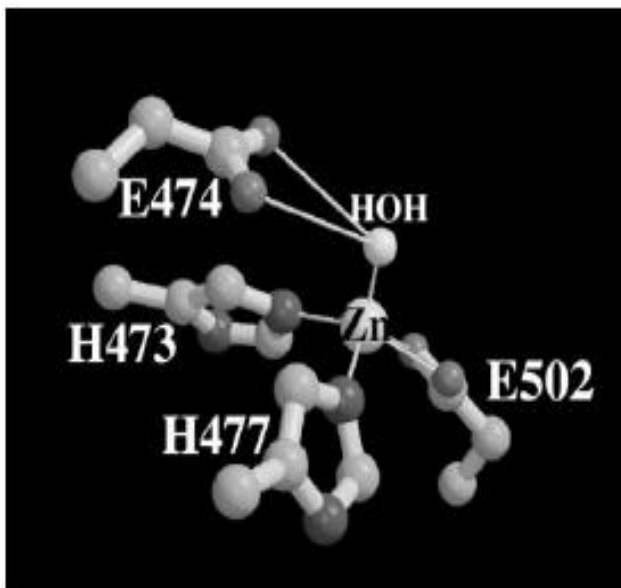


Figura 07: Representação dos aminoácidos responsáveis pela coordenação do zinco no sítio catalítico da EP24.15 de rato (CUMMINS et al., 1999).

Outra característica da EP24.15 é sua sensibilidade a compostos tióis *in vitro*, a adição de ditioneitol (0,5 mM) é capaz de ativar a enzima. Esse mecanismo de tiol ativação foi sugerido como sendo pela ruptura de pontes dissulfeto intermoleculares (SHRIMPION et al., 1997), e não pela participação de cisteínas na catálise, como sugerido anteriormente por GOMES et. al, (1993). A ruptura dessas interações intermoleculares permite que a enzima fique na forma monomérica, tendo o substrato livre acesso ao sítio catalítico (SHRIMPION 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 EP 24.15 é regulada (revisto por SHRIMPION et al., 2002).

A fosforilação da EP24.15 pela proteína quinase A poderia ser um outro mecanismo para regular a sua atividade enzimática (FERRO et al., 1995; TULLAI et al., 2000). Uma vez que formas fosforiladas da EP24.15 foram encontradas em células PC12 (derivadas de

um feocromocitoma, na medula adrenal de rato) após estimulação com *forksolin* (que estimula a atividade da proteína quinase A), e pela demonstração de que extratos de células PC12 tratadas com análogos do AMPc alteram a cinética enzimática (FERRO et al., 1995). Recentemente foi demonstrado por TULLAI et al., (2000) que o aminoácido Ser⁶⁴⁴ é capaz de ser fosforilado pela proteína quinase A *in vitro*, e que a fosforilação da EP24.15 provoca modificações em parâmetros cinéticos apenas de alguns substratos (TULLAI et al., 2000).

A atividade específica da EP24.15 também foi detectada no meio condicionado de células C6 de glioma de rato (FERRO et al., 1993) e em células AtT20 (tumor da hipófise anterior de camundongo; FERRO et al., 1999). O mecanismo de secreção desta enzima não foi esclarecido, mas apesar de não possuir peptídeo sinal, a EP24.15 parece estar parcialmente presente na via secretória de células AtT20 (GARRIDO et al., 1999). O uso do ionóforo de cálcio A23187 em células AtT20, ou a estimulação destas células com o hormônio liberador de corticotrofinas (CRH), é capaz de aumentar a secreção da EP24.15 para o meio de cultivo (FERRO et al., 1999).

Mais recentemente, DEMASI et al. (2008) mostraram que dentro das células, a EP24.15 encontra-se naturalmente S-glutationilada em resíduos de cisteína e que isto tem um profundo impacto sobre a atividade enzimática. Pelo fato da enzima possuir vários resíduos de cisteína expostos, a quantidade de glutathionilação é variável. Assim quanto maior o grau de glutathionilação, maior é a quantidade de oligômeros da enzima e conseqüentemente menor a atividade peptidásica.

Desde que a EP24.15 foi isolada por ORLOWSKI et al. (1983), acredita-se que ela participe do metabolismo e/ou processamento de uma série de neuropeptídeos. Entre os neuropeptídeos clivados por esta enzima estão a bradicinina, a neurotensina, o hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH), a somatostatina, a substância P, assim como as angiotensinas I e II (SHRIMPTON et al., 2002). Foi demonstrado ainda que a EP24.15 é capaz de gerar as respectivas encefalinas a partir de precursores opióides intermediários (CHU & ORLOWSKI, 1985).

A função precisa da EP24.15 não é conhecida, no entanto vem sendo implicada no metabolismo de uma série de neuropeptídeos e como conseqüência, envolvida em vários

processos fisiológicos. Dentre esses, a percepção de dor (MOLINEAUX & AYALLA, 1990; KEST et al., 1991; KEST et al., 1992), a homeostase cardiovascular e renal (ORLOWSKI et al., 1983; CARDOZO & ORLOWSKI, 1993; TELFORD et al., 1995) e a reprodução (PIEROTTI et al., 1991; LEW et al., 1997; WU et al., 1997; SMITH et al., 2000).

A EP24.15 é capaz de degradar o GnRH, bem como o hormônio luteinizante (LH), dessa forma acredita-se que seja importante nos processos relacionados a reprodução (PIEROTTI et al., 1991; LEW et al., 1997; WU et al., 1997; SMITH et al., 2000). Além disso, os maiores níveis de expressão dessa enzima são encontrados no testículo (ORLOWSKI et al., 1983). PINEAU et al. (1999) demonstraram que a EP24.15 está presente em estágios específicos da espermatogênese (estágios VII e VIII, do ciclo no rato). Estando presente nas espermátides alongadas e corpos residuais, tanto no rato quanto no homem (PINEAU et al., 1999). A atividade enzimática da EP24.15 também é encontrada no ovário de ratas, aumentando durante a puberdade, e retornando a níveis pré-púberais quando o animal é adulto. Foi observado também que há uma flutuação dos níveis de atividade da EP24.15 durante o ciclo estral, havendo um aumento de sua atividade enzimática na tarde do pró-estro (PIEROTTI et al., 1991). Qual o papel exato da EP24.15 nas gônadas não está claro, mas os dados sugerem que haja uma participação desta enzima no processo de gametogênese (PIEROTTI et al., 1991; PINEAU et al., 1999).

Como se sabe, a EP24.15 cliva o GnRH-I na ligação Tyr⁵-Gly⁶, e ainda, é conhecida por ter um papel importante na modulação do sinal do GnRH-I para a hipófise (WU et al., 1997; SHRIMPTON et al., 2003). Qualquer modificação nos resíduos Tyr⁵-Gly⁶ confere resistência a clivagem por EP24.15 (FLOURET et al., 1984; KOCH et al., 1974a; KOCH et al., 1974b; LABRIE et al., 1984; WALTERS et al., 2008).

Apesar da EP24.15 estar localizada de forma ubíqua no cérebro, a sua expressão é regulada e a localização da EP24.15 no espaço-temporal é favorável para o direcionamento do GnRH-I para seu processamento. Estudos de microscopia confocal sugerem que a EP24.15 está localizada na camada externa da eminência média, associada tanicites e axônios GnRH-I (WU et al., 1997).

Estudos demonstraram a presença da EP24.15 em útero e vagina de camundongos, com predominância desta enzima no compartimento nuclear, podendo também ser observada no citoplasma sendo com menor intensidade de reação. No epitélio estratificado pavimentoso da vagina verificou-se uma imunoreação mais intensa que as outras regiões da vagina. O endométrio, o miométrio e a serosa apresentaram imunoreação em toda a sua extensão. A camada de tecido conjuntivo frouxo e o mesotélio possuíam a mesma intensidade de imunoreação da camada muscular (Cavalcanti et al., no prelo).

Recentemente tem sido implicada no metabolismo de peptídeos intracelulares desta forma participando da regulação de cascatas de sinalização celular (Fernanda et al 2008, ferro et al 2004), desta forma pode ser importante em sistemas que dependem de uma sincronização mediada por sinalização parácrina, como ocorre durante o desenvolvimento.

Apesar de ter sido descrita como uma enzima processadora de neuropeptídeos, as evidências experimentais acumuladas ao longo dos últimos anos mostram que a maior quantidade de EP24.15 concentra-se no meio intracelular (FONTENELE-NETO et al., 2001), mais especificamente no citoplasma e no núcleo das células. Assim, é muito provável que além das funções já descritas, a EP24.15 participe de processos intracelulares. De fato, diversos trabalhos associam a peptidase em questão à apresentação de antígenos pelas moléculas de MHC-I (SILVA et al., 1999, PORTARO et al., 1999; YORK et al., 2003; KIM et al., 2003;).

4-MATERIAL E MÉTODOS

4.1 ANIMAIS

Foram utilizados 06 ratos (*Rattus norvegicus*) Wistar, de padrão sanitário convencional, com idade média de dois meses e pesando entre 150-200 g. Os animais foram obtidos do biotério da Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA) e mantidos em gaiolas plásticas (490x340x160mm), de acordo com recomendações internacionais de densidade populacional (National Research Council, 1996) e mantido no biotério da Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA), com temperatura ambiente aproximadamente constante (22°C +- 2°C) umidade relativa de 50-75% e fotoperíodo 12 horas claro/12 horas escuro. Os ratos receberam ração granulada e água a vontade. Todos os procedimentos foram realizados com princípios éticos na experimentação animal e previamente submetidos a comissão de Ética em Experimentação Animal (CEUA) da UFERSA.

4.2 – PROCESSAMENETO HISTOLÓGICO

Os animais foram anestesiados com quetamina, em seguida foram perfundidos através da aorta com uma solução fixadora contendo paraformaldeído 4% em tampão fosfato de sódio 0,1 M pH 7,4. Os órgãos do sistema linfóides foram dissecados e fragmentos foram coletados com aproximadamente um centímetro, foram pós fixados na mesma solução fixadora. Os órgãos do sistema linfóides foram submetidos à desidratação através de banhos em uma série crescente de etanol (70, 95 e 100%) e foram então diafanizados em xilol, impregnados em parafina histológica líquida (56°C) e finalmente incluídos em parafina (GIOLOI & PEREIRA,2003).

Os blocos de parafina foram cortados em um micrótomo (6 μ m de espessura) de modo a obter cortes precisos dos diversos órgãos do sistema linfóide. Os cortes foram distendidos em banho-maria a 40°C e colocados em lâminas de vidro cobertas com albumina de Meyer.

4.3-IMUNO-HISTOQUÍMICA PARA MICROSCOPIA DE LUZ

Os cortes foram desparafinizados (xilol), hidratados (etanol 100%, 95%, 70% e H₂O destilada) e lavados com tampão fosfato salino 0,1M pH 7,2 (PBS). Em seguida, os cortes foram submetidos a um processo de recuperação antigênica em tampão citrato de sódio 0,1 M pH 6,0 a 97 °C por 40 minutos. Os cortes foram novamente lavados com PBS e em seguida incubados com H₂O₂ 0,3% por 30 min, para bloquear a peroxidase endógena. Os cortes foram lavados com PBS contendo 0,3% de Triton 100 X (PBS-triton), e posteriormente incubados PBS-triton com soro de cabra 5%, por 30 minutos, em seguida o soro foi escorrido e as lâminas foram novamente incubadas com anticorpo primário específico (anti EP 24.15) por 18 h a 4°C, na diluição de 1:1000 em PBS-triton e 5% de soro de cabra. Os controles negativos foram incubados com soro de coelho ao invés do anticorpo primário nas mesmas condições acima (FONTENE-NETO, 2001).

Os cortes foram lavados com PBS-triton e incubados com anticorpo secundário biotilado, obtido em cabra, anti-IgG de coelho (Sigma Co, St. Louis, MO) na diluição de 1:200 em PBS-triton por 2 h. Os cortes foram novamente lavados e incubados agora por 1 h com o complexo estreptoavidina-biotina peroxidase (*kit* ABC, Vector laboratoties, Burlingame, CA).

A peroxidase foi então revelada utilizando-se uma solução contendo 0,05 % de 3'-3' diaminobenzidina (DAB), 0,03% de H₂O₂ em PBS. As lâminas foram posteriormente coradas em hematoxilina (30 segundos) e em seguida desidratadas em etanol (70, 95 e 100%), banhadas em xilol e finalmente montadas com lamínulas, utilizando-se bálsamo do Canadá. As análises e documentações do material foram realizadas em um microscópio de luz (Olympus CX31) dotado de câmera fotográfica.

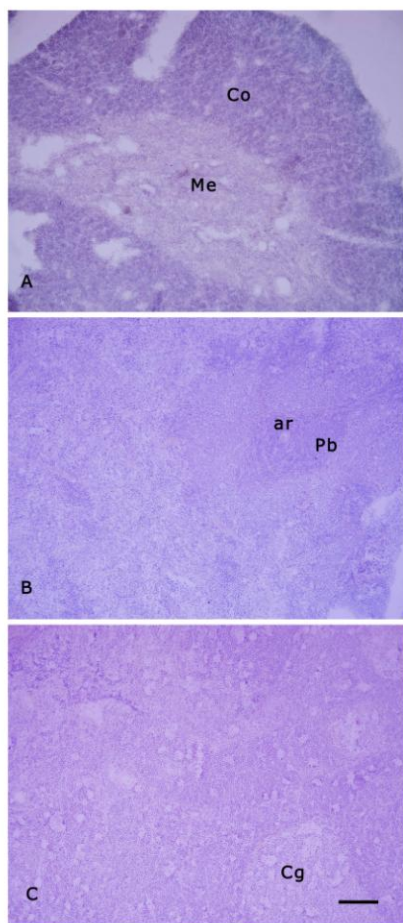


Figura 08: A Fotomicrografia A-C mostram o aspecto típico de uma reação controle, na qual houve omissão do anticorpo primário ou substituição por soro de coelho. Contra coloração hematoxilina. A barra de escala A,B e C é equivalente a 200 μ m.

5- RESULTADOS

A análise por imunohistoquímica nos órgãos linfóides revelou que a enzima EP24.15 é expressa em células nesses órgãos, mas a marcação não foi uniforme, havendo regiões que concentravam células marcadas e regiões sem marcação. A distribuição celular da EP24.15 mostrou que esta era observada principalmente no citoplasma, no entanto algumas células apresentaram a região nuclear densamente corada.

5.1 - ANÁLISE POR IMUNOHISTOQUÍMICA

5.1.1 – Timo

A imunoreação observada no timo revelou que a EP24.15 ocorre em células, distribuídas nas diversas regiões do órgão primário do sistema imune (Figura 09). Logo após a cápsula que é formada de tecido conjuntivo denso não modelado, apresentavam-se células da periferia do córtex intensamente marcadas. Na região mais profunda do córtex, a imunoreação apresentava através de células isoladas. A medula apresentava uma imunoreação intensa em toda a sua extensão, algumas áreas possuíam uma reação mais intensa que outras. O padrão de distribuição da EP24.15 foi diferenciado para cada uma dessas regiões (Figura 09).

A região periférica córtex do timo, apresentou imunoreação nos macrófagos, a maioria com marcação somente no citoplasma (Figura 10A) e células epiteliais reticulares do tipo I, nesta área a imunoreação era continua devido as células formarem junções de oclusão, deste modo toda esta região apresentava marcação para EP24.15, principalmente nuclear (Figura 10B).

A região cortical intensamente povoada de linfócitos T (timócitos), não apresentou imunomarcação uniforme, apenas macrófagos isolados, distribuídos pelo córtex

intermediário e profundo apresentaram imunoreação nuclear e citoplasmática de mesma intensidade (Figura 10B). Algumas células reticulo-epiteliais mostraram a imunorreação, tanto no citoplasma como no núcleo, este, porém, com marcação mais intensa (Figura 10B). Observou também que o endotélio de vasos sanguíneos apresentava imunomarcação, sendo que a marcação para a enzima era vista de maneira forte no núcleo das células endoteliais (Figura 10A).

Na região medular ocorreu uma intensa imunomarcação, principalmente em macrófagos, células epiteliais reticulares do tipo V e tipo VI (Figura 11A). Células reticulares do tipo VI, as mais típicas da medula do timo, são células grandes que coalescem uma em torno da outra, formando os corpúsculos tímicos (de Hassall), estes apresentavam reativos (Figura 11B).

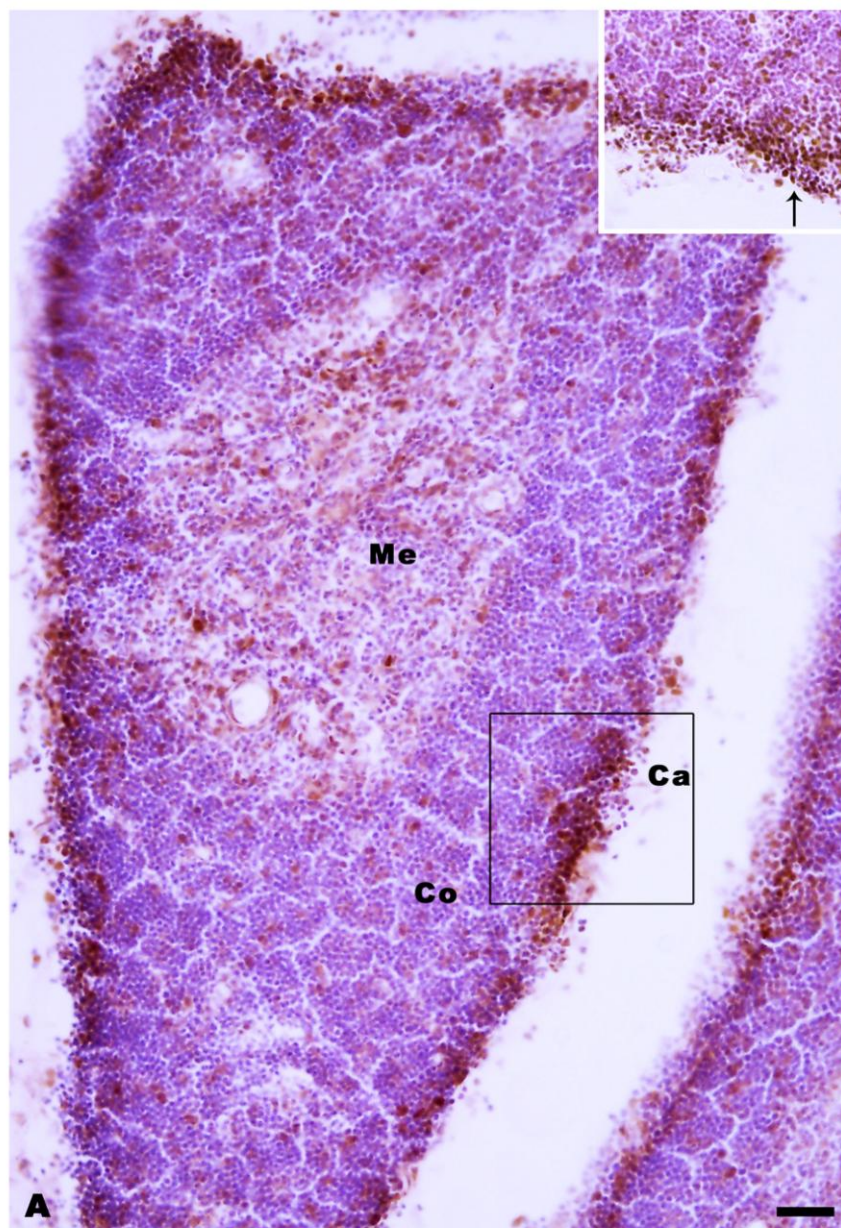


Figura 09: Fotomicrografia do timo de ratos em pequeno aumento, mostrando o padrão típico de imunomarcção da EP24.15 em todas as estruturas do timo. Note que a imunoreação para EP14.15 pode ser observada em várias áreas do timo: cápsula (Ca) (detalhe da Figura 9A), córtex (Co), medula (Me). A barra de escala é equivalente a 200 μ m.

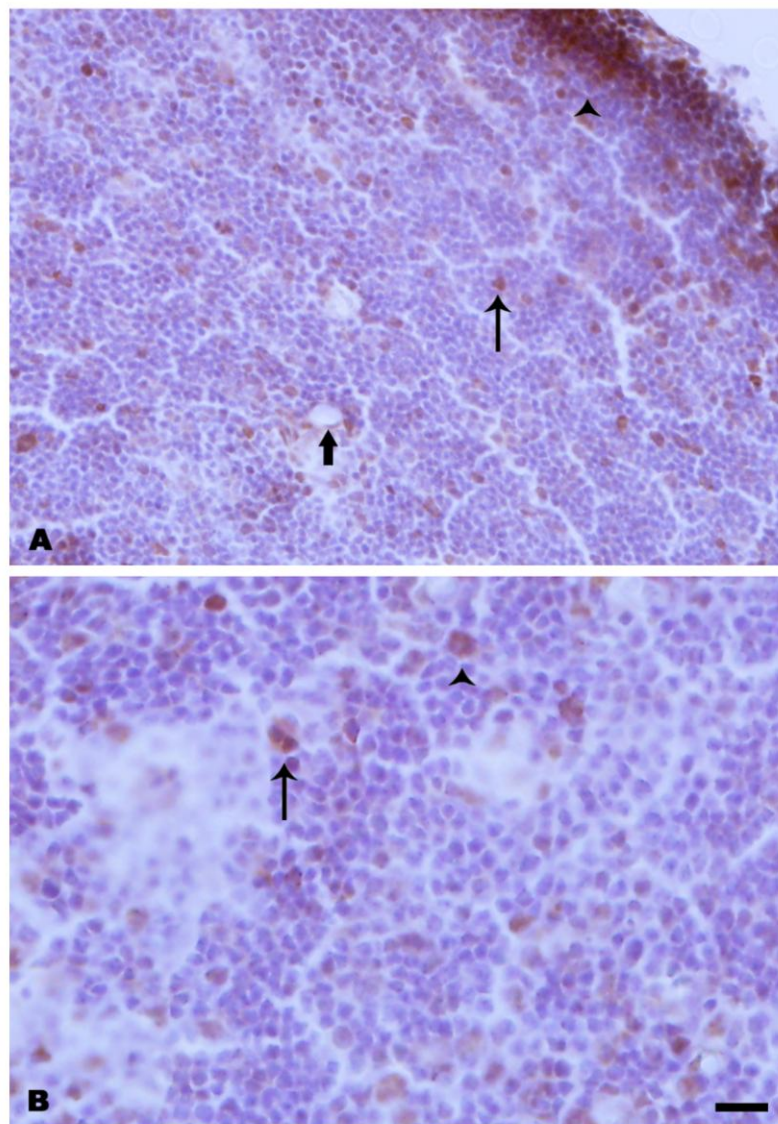


Figura 10: Fotomicrografia do timo de ratos, mostrando o padrão típico de imunomarcacão da EP24.15. Em **A**, a região do córtex do timo é vista em médio aumento. A imunoreacção nos macrófagos predominantemente citoplasmática (→) e nos núcleos das células endoteliais(—▶) também pode ser observado uma imunoreatividade nas células epiteliais reticulares na cápsula do órgão (▶). Em **B**, a região do córtex intermediário e profundo do timo é vista em maior aumento. Macrófagos apresentam imunoreacção para EP24.15 no núcleo e no citoplasma com o mesmo padrão (▶). Algumas células reticulo-epiteliais mostraram a imunorreacção, tanto no citoplasma como no núcleo, este, porém, com marcação mais intensa (→). A barra de escala : A é 80 μm e em B 20 μm .

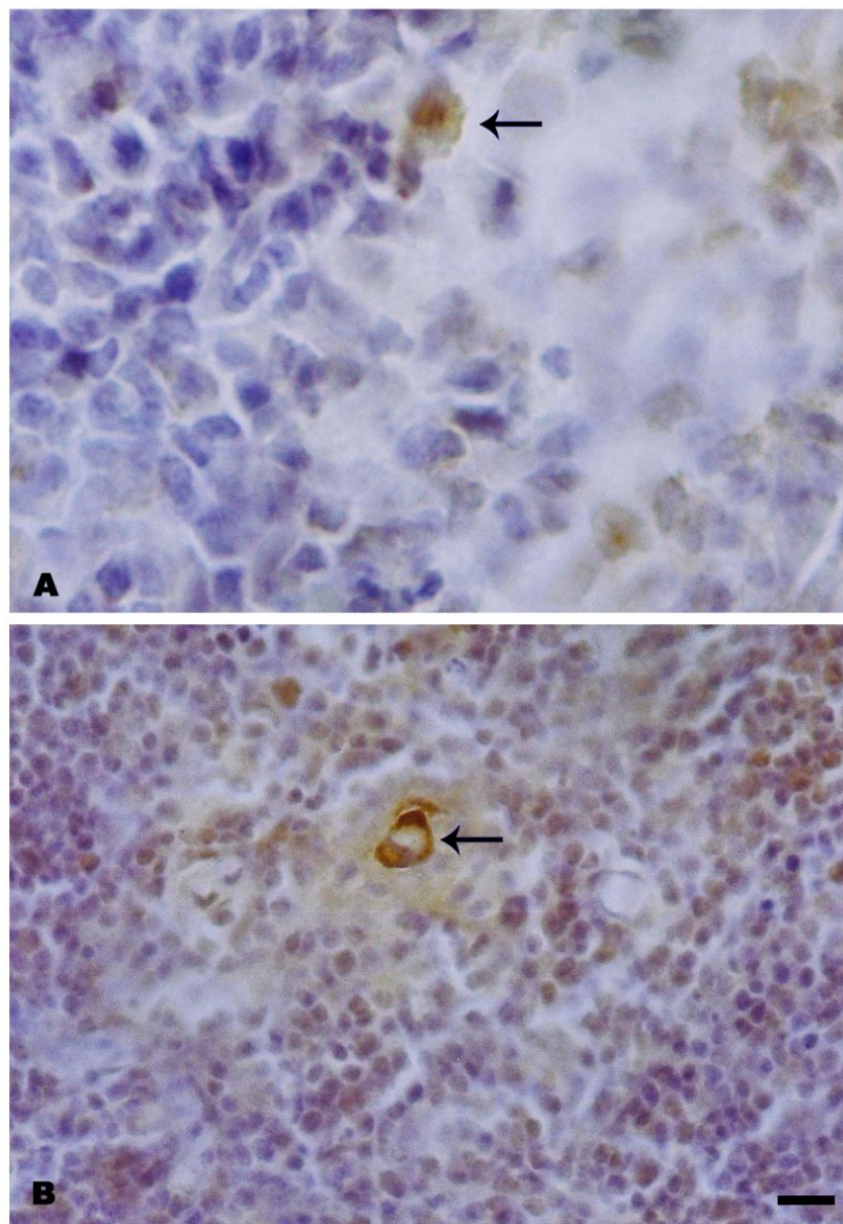


Figura 11: Fotomicrografia do timo de ratos, mostrando o padrão típico de imunomarcagem da EP24.15. Em **A**, a região da medula do timo é vista em maior aumento. Note a imunoreação das células epiteliais reticulares (→). Em **B**, observamos os corpúsculos tímicos (de Hassal) (→) estes apresentam reativos para EP24.15. A barra de escala: A e B é de 20 μ m.

5.1.2- Baço

A imunoreação no baço permitiu verificar a EP24.15 em células, distribuídas nas diversas estruturas desse órgão (Figura 12). Macrófagos e endotélio foram os tipos celulares que apresentaram marcação na polpa vermelha, sendo que a marcação ocorreu em toda sua extensão. Macrófagos isolados foram marcados na polpa branca (Figura 13B).

A polpa vermelha, a imunoreação mais intensa foi observada nos elipsóides (Figura 14A) os quais são formados por macrófagos pleomórficos com imunoreatividade nuclear. A imunoreação também ocorreu nas regiões entre os sinusóides e os cordões esplênicos, nos quais encontramos numerosos macrófagos marcados principalmente na região citoplasmática e outros, porém, com citoplasma e núcleo marcados (Figura 14B). Observaram-se ainda algumas células reticulares com o citoplasma levemente imunorreativo.

Abaixo da cápsula que recobre o baço, macrófagos apareceram marcados, alguns poucos com seus núcleos fortemente imunorreativos e com uma fraca marcação no citoplasma, contudo, uma maior parte apresentou somente o citoplasma com marcação para a EP 24.15 (Figura 14A), sendo que havia oscilações quanto à intensidade da marcação. Na polpa branca a imunomarcação foi menos intensa. O centro germinativo e a zona do manto dos nódulos linfáticos apresentam poucas células imunorreativas, entre estes grandes macrófagos marcados no citoplasma (Figura 13B). Não evidenciamos imunoreação nos linfócitos. Ocorreu marcação nuclear no endotélio da arteríola central destes nódulos (Figura 13A). Observou-se ainda, células reticulares localizadas nas margens do nódulo linfático com uma leve marcação no citoplasma.

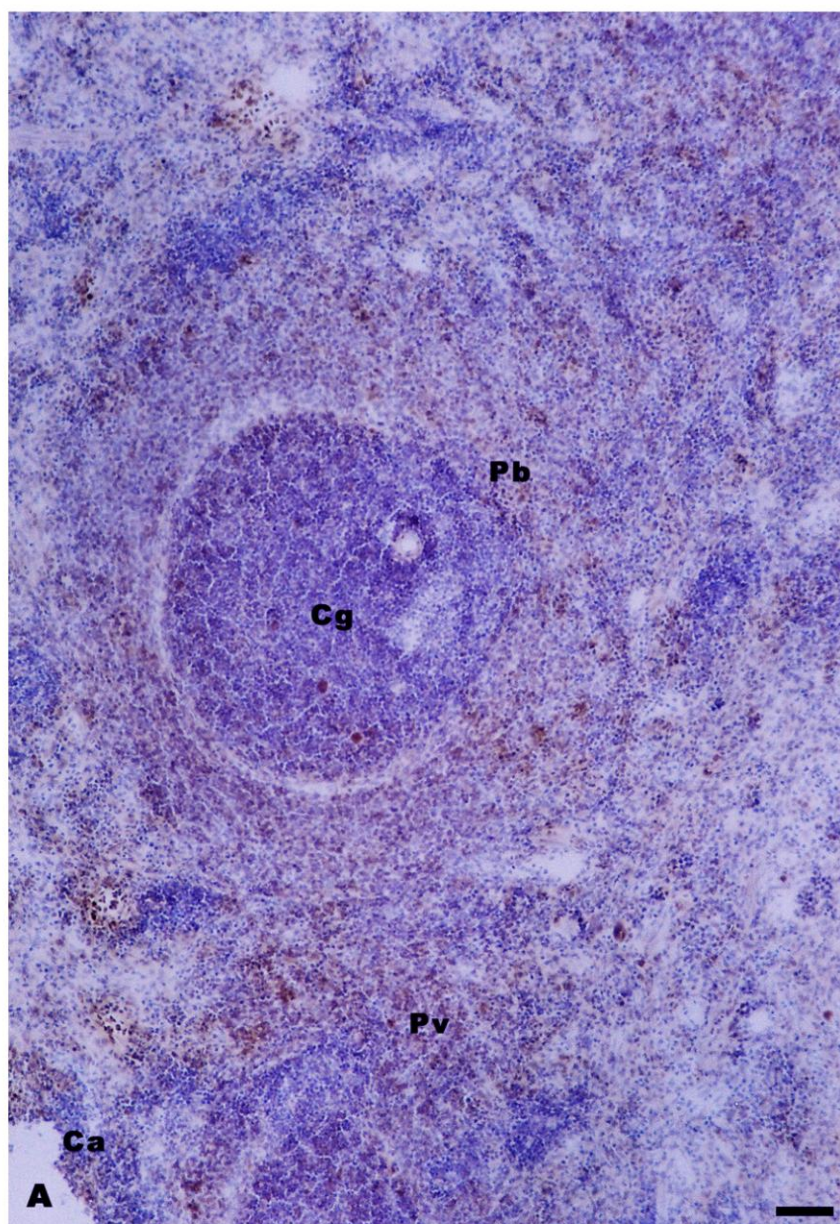


Figura 12: Fotomicrografia do baço de ratos em pequeno aumento, mostrando o padrão típico de imunomarcagem da EP24.15 em todas as estruturas do baço. Note que a imunoreação para EP24.15 pode ser observada em várias áreas do baço: polpa vermelha (Pv), polpa branca (Pb) e cápsula (Ca). A barra de escala de 1cm é equivalente a 200 μ m.

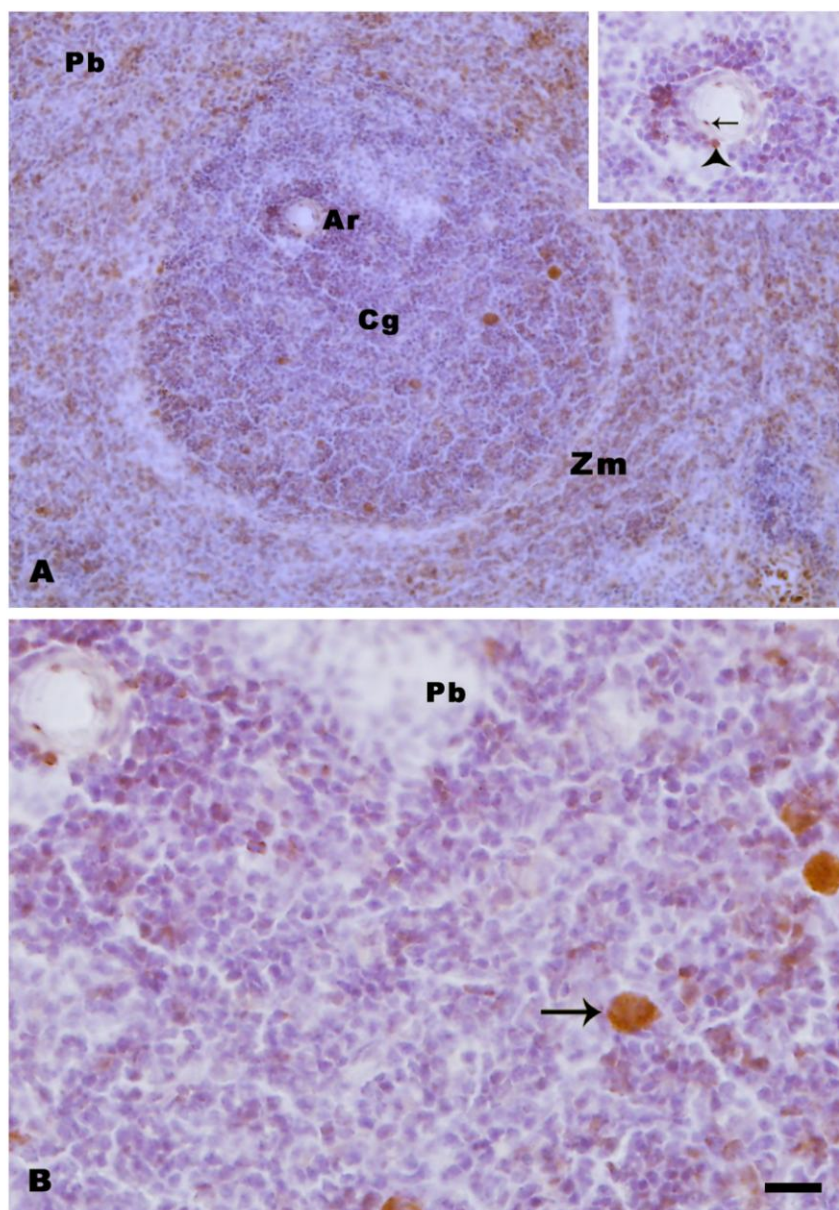


Figura 13: Fotomicrografia do baço de ratos, mostrando o padrão típico de imunomarcagem da EP24.15. Em **A**, a região da polpa branca (Pb) do baço é vista em médio aumento. A imunoreação nos macrófagos predominantemente citoplasmática e nos núcleos das células endoteliais (→) (**detalhe da Figura 13A**). Em **B**, a região da polpa branca (Pb) é vista em maior aumento. Macrófagos apresentam imunoreação para EP24.15 no citoplasma (→). A barra de escala: A é 80 μ m e em B 20 μ m.

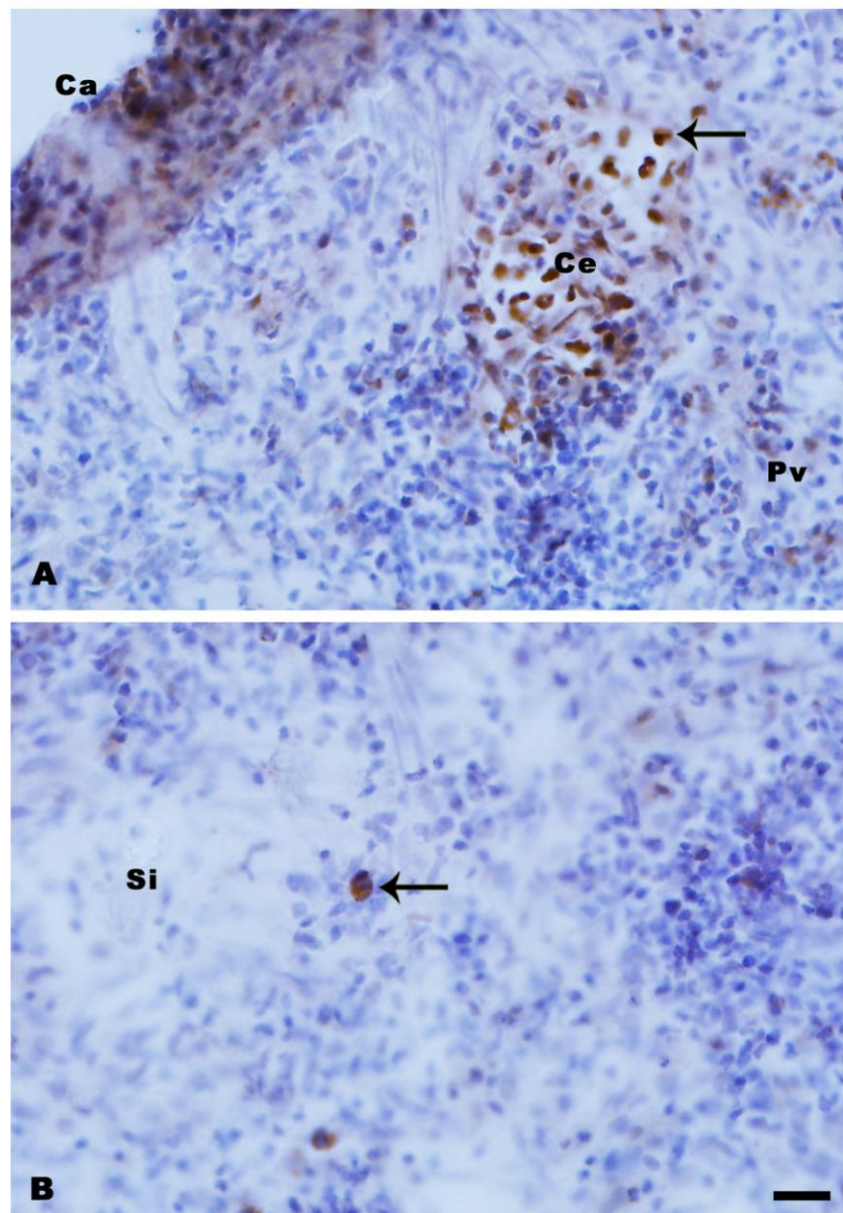


Figura 14: Fotomicrografia do baço de ratos, mostrando o padrão típico de imunomarcacão da EP24.15. Em **A**, a região da polpa vermelha (Pv) do baço é vista em médio aumento. Observamos na região dos cordões esplênicos, imunoreacção nos macrófagos pleomórficos (→). Em **B**, a região da polpa vermelha (Pv) é vista em maior aumento. Macrófagos da região sinusóide (Si) apresentam imunoreacção para EP24.15 no citoplasma e no núcleo (→). A barra de escala: A é 80 μm e em B 20 μm .

5.1.3- Linfonodo

Assim como nos outros órgãos do sistema imune, o linfonodo apresentou uma imunomarcção para EP24.15 em células distribuídas nas suas diversas estruturas. As principais células marcadas foram: macrófagos, células reticulares, fibroblastos e linfócitos. O padrão de distribuição da EP24.15 foi diferenciado para cada uma das regiões (Figura 15A).

Na cápsula de tecido conjuntivo que recobre o linfonodo, observou-se que a reação predominou em fibroblasto. Abaixo da cápsula, uma camada contínua de células mais superficiais na zona cortical, a qual delimita toda a superfície do órgão e seios subcapsulares, mostrou-se que a imunoreação ocorreu nesta região (Figura 15A). Em pontos diversos dessa camada celular, a reação ocorreu com uma intensidade mais acentuada, ao redor dos seios linfáticos subcapsulares, a marcação foi mais intensa e mais freqüente nos macrófagos do que nas outras células dessa faixa celular (Figura 16A).

No córtex externo a imunoreação ocorreu intensamente, na área, constituída por nódulos linfáticos, que apresentam um centro germinativo. Nesta região a imunomarcção foi evidente no centro germinativo no qual observamos macrófagos e células reticulares com marcação citoplasmática (Figura 16B). Raras células na zona do manto demonstraram a reação, sendo elas principalmente macrófagos e algumas células reticulares. A região cortical profunda ou paracortical não apresenta nódulos linfáticos e nela a imunoreação foi evidenciada em poucas células reticulares e macrófagos isolados (Figura 15A).

A imunomarcção da zona medular foi mais intensa que na zona cortical do linfonodo (Figura 17A). De forma geral, toda a zona medular do linfonodo mostrou-se reativa. Essa marcação é uniforme e os cordões medulares aparecem marcados nitidamente (Figura 17A). A grande maioria das células dos cordões celulares mostrou a reação, ao passo que apenas uma mínima parcela da população celular não se mostrou reativa. Observaram-se algumas células reticulares dentro dos seios medulares que mostravam uma reação nuclear (Figura 17B). Não diferente das outras regiões, macrófago foi o tipo celular

predominantemente reativo no tecido linfóide medular (Figura 18A). Linfócitos grandes, próximos aos seios medulares apresentaram somente o citoplasma marcado, tornando assim o citosol bem perceptível graças à forte imunomarcação apresentada (Figura 18B). Outros linfócitos localizados dentro dos seios medulares e próximo às paredes desses espaços mostraram imunorreação forte no núcleo, apresentando também a reação no citoplasma, apesar de fraca quando comparada à marcação do núcleo (Figura 17B). O endotélio dos seios medulares mostrou a reação, mas de maneira pouco intensa.

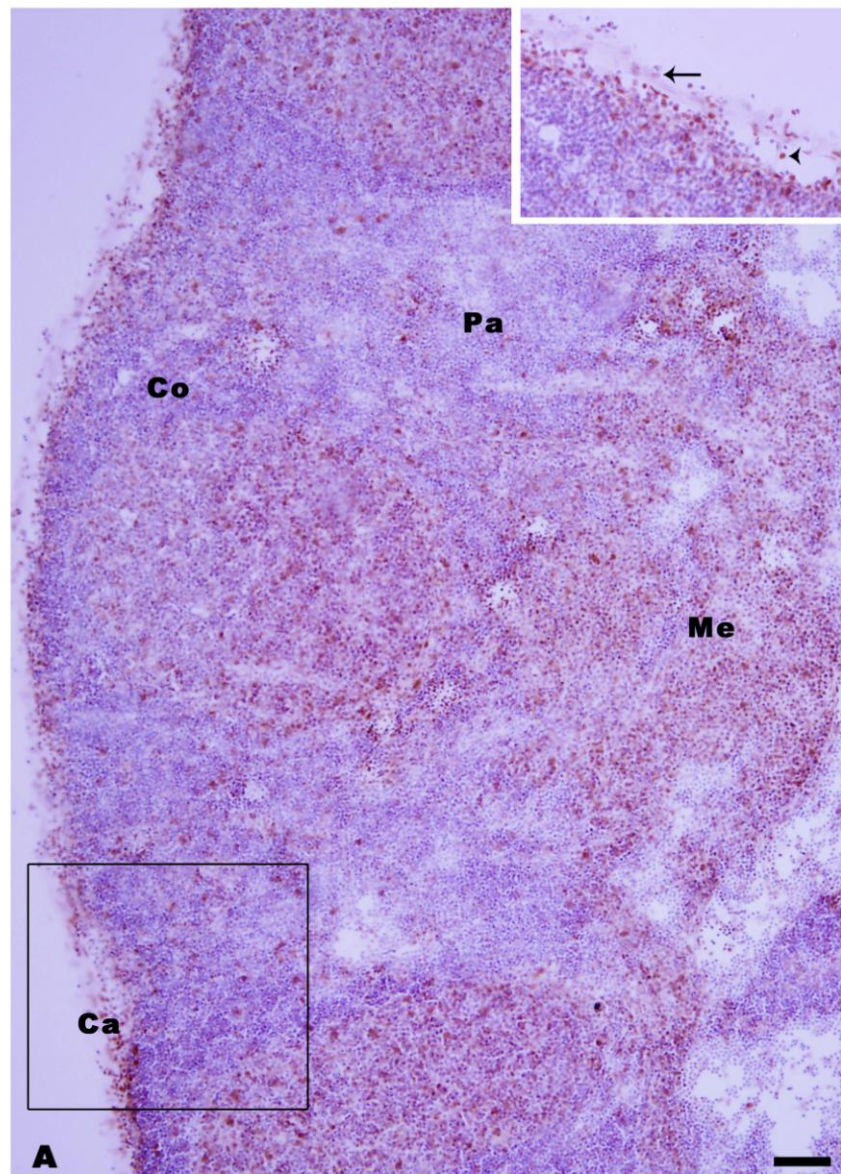


Figura 15: Fotomicrografia do linfonodo de ratos em pequeno aumento, mostrando o padrão típico de imunomarcção da EP24.15 em todas as estruturas do linfonodo. Note que a imunoreação para EP14.15 pode ser observada em várias áreas do linfonodo: cápsula (Ca), córtex (Co), paracórtex (Pa), medula (Me). Note que na cápsula a reação predominou em fibroblastos (→) (**detalhe da Figura 15A**). A barra de escala de 1cm é equivalente a 200 μ m.

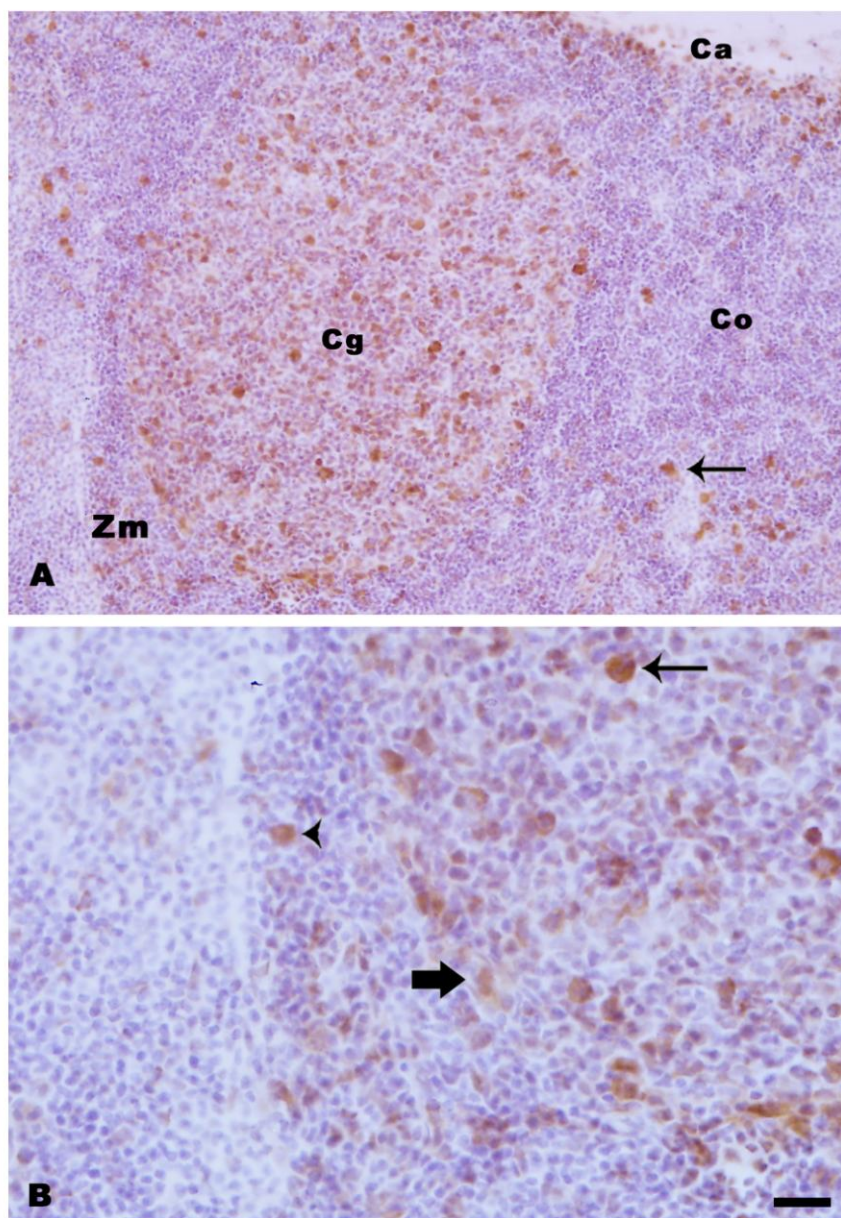


Figura 16: Fotomicrografia do linfonodo de ratos, mostrando o padrão típico de imunomarcção da EP24.15. Em **A**, observamos a cápsula (Ca), centro germinativo (Cg), zona do manto (Zm), córtex (Co) é vista em médio aumento. Macrófagos foi o tipo celular com maior marcação (→). Em **B**, a região do nódulo linfático (NI) é vista em maior aumento. Macrófagos apresentam imunoreação para EP24.15 no centro germinativo (Cg)(→) e na zona do manto (Zm); note que células reticulares apresentaram marcação citoplasmática. A barra de escala: A é 80 μm e em B 20 μm .

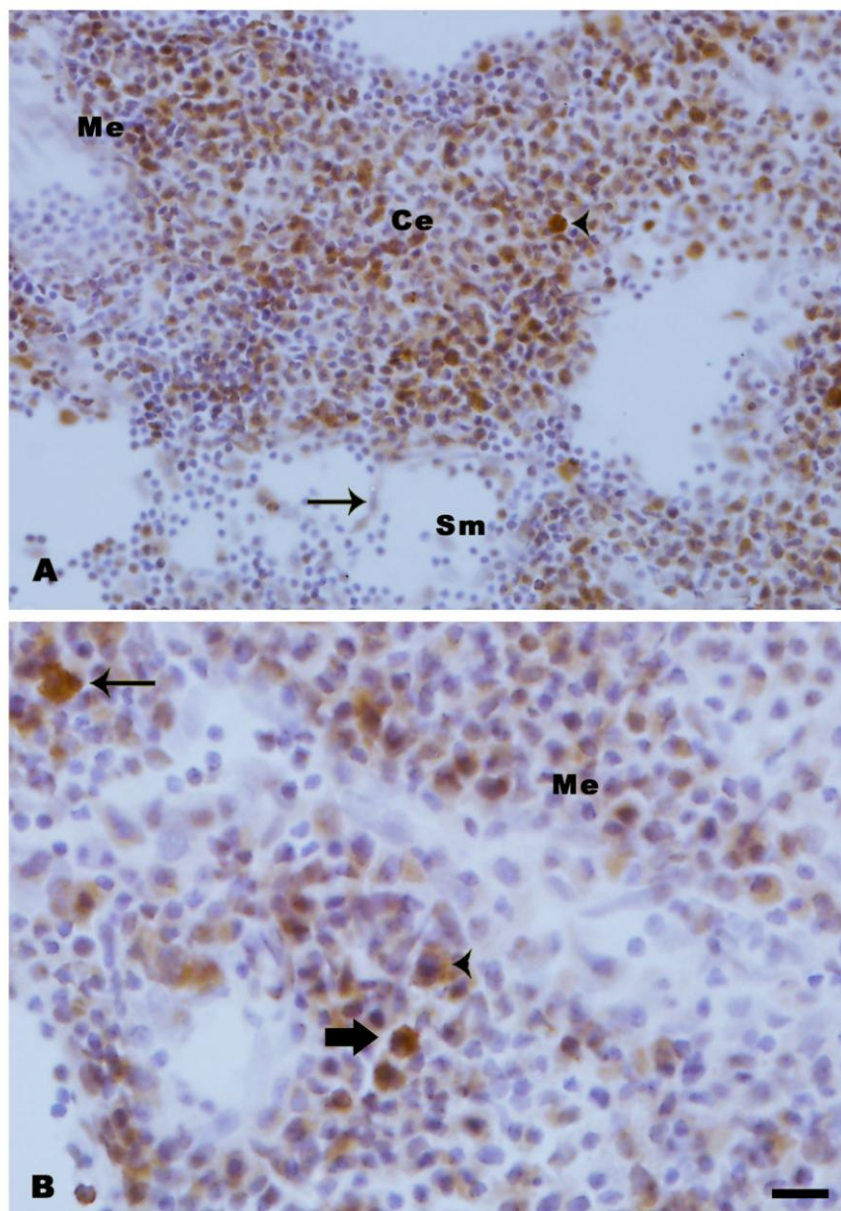


Figura 17: Fotomicrografia do linfonodo de ratos, mostrando o padrão típico de imunomarcção da EP24.15. Em **A**, observamos a região da medula (Me), cordões esplênicos (Ce), seios medulares (Sm) é vista em médio aumento. Macrófagos foi o tipo celular com maior marcação (►), também ocorreu marcação nas células reticulares (→). Em **B**, a região da medula (Me) é vista em maior aumento. Macrófagos apresentam imunoreação para EP24.15(→), linfócitos apresentam imunomarcção nuclear e citoplasmática (►). A barra de escala: A é 80 μm e em B 20 μm .

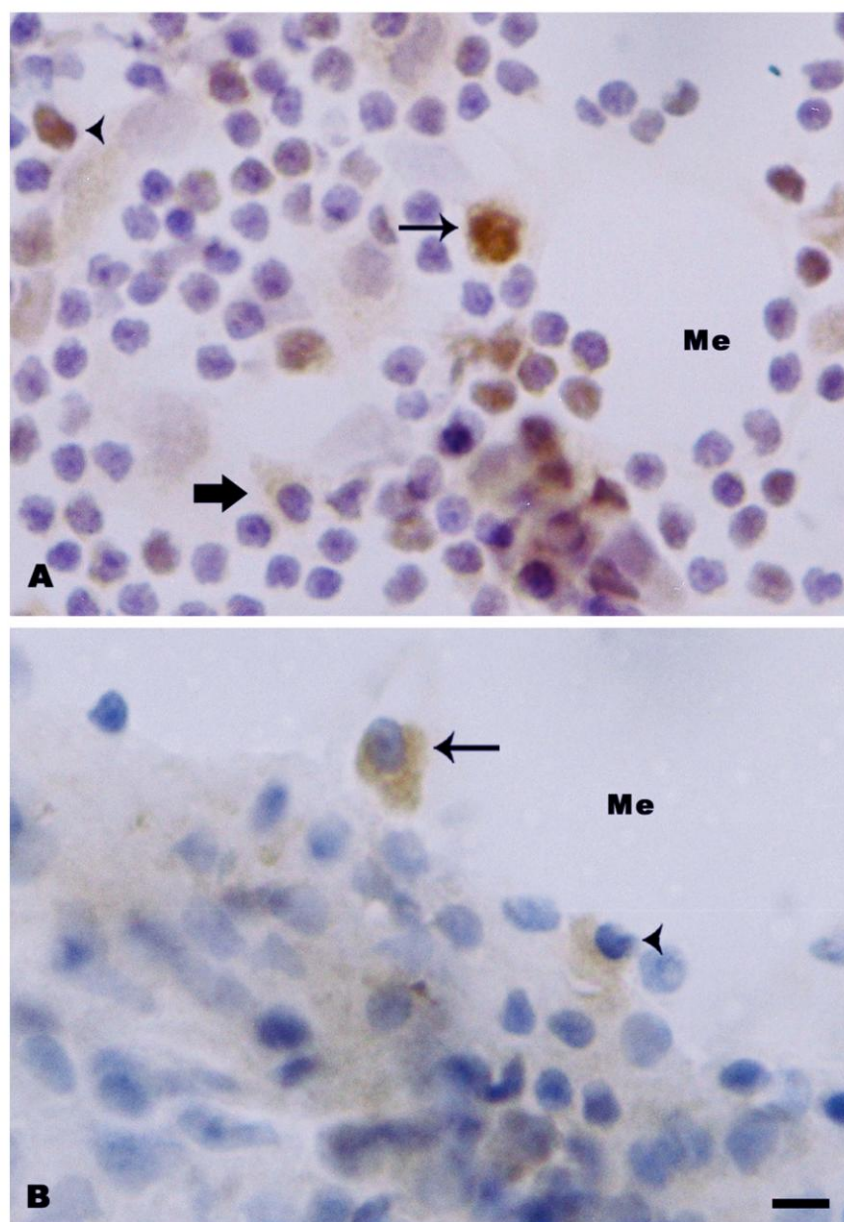


Figura 18: Fotomicrografia do linfonodo de ratos, mostrando o padrão típico de imunomarcção da EP24.15. Em **A**, observamos a região da medula (Me) que é vista em maior aumento. Macrófagos com maior marcação ($\rightarrow$), também ocorreu marcação nas células reticulares ($\blacktriangleright$). Em **B**, a região da medula (Me) é vista em maior aumento. Linfócitos grandes apresentam imunoreação para EP24.15($\rightarrow$). A barra de escala: A e B é de 20 μm .

6- DISCUSSÃO

O presente trabalho demonstra pela primeira vez a localização celular da endopeptidase 24.15 (EP24.15) nos órgãos linfóides de ratos. Os resultados demonstraram que a EP24.15 é expressa nas mais diversas células e órgãos (timo, baço e linfonodos).

A EP24.15 apresentou um padrão de imunoreação celular preferencialmente citoplasmática, apresentando também imunomarcção nuclear, mas em menor proporção. Quando analisou a distribuição celular no fígado da EP24.15 GIOLI et al., (2003) verificaram um padrão de distribuição citoplasmático. No sistema nervoso central, o padrão de distribuição é predominantemente nuclear (HEALY e ORLOWSKI,1992; MASSARELLI et al.,1999;FONTENELE-NETO, 2001).

Macrófago foi o tipo celular que apresentou maior marcação para EP24.15 nos órgãos linfóides. A marcação foi principalmente citoplasmática, assim como observado também por CHOI, et al. (1990) em macrófagos alveolares. A presença da EP24.15 em macrófagos é reforçada pelo trabalho de LESSER et al. (1992), este trabalho descreve a EP24.15 em macrófagos alveolares (de ratos, cobaias e humanos) que produzem e respondem a um grande número de substâncias bioativas incluindo peptídeos quimiotáticos. De acordo com VIETINGHOFF e PAEGELOW (2000), EP24.15 e carboxipeptidase M são capazes de hidrolisar peptídeos vasoativos tais como a bradicinina em macrófagos alveolares e peritoniaias de cobaias. Segundo SILVA et.al.(1999) e PORTARO et.al., (1999) a EP 24.15 participa ativamente da apresentação de antígenos através de MHC classe I, o que torna os macrófagos importantes neste contexto.

O fato da EP24.15 estar amplamente distribuída no sistema imunológico e diversos trabalhos associarem a peptidase em questão à apresentação de antígenos pelas moléculas de MHC-I (SILVA et al., 1999, PORTARO et al., 1999; SARIC,2001; YORK et al., 2003; KIM et al., 2003;) esta tem função de grande importância para o sistema imunológico, uma vez que apresentado atividade citosólica, limitaria a disponibilidade de peptídeos para apresentação de antígeno, influenciando decisivamente a resposta das células T.

ELEUTERI et al, (2000), estudando o timo de bovinos, conseguiu isolar um complexo purificado com propriedades que são comuns ao proteassoma, mas com substituição subunidades catalíticas homólogas, LMP2 ($\beta 1i$), MECL ($\beta 2i$) e LMP7 ($\beta 5i$) mas apresentando arquitetura molecular regulatórios específicos para órgãos linfóides, anteriormente isolado em baço de bovinos. Estes imunoproteassomas são caracterizados por uma eficiência na clivagem de ligações peptídicas após aminoácidos de cadeia ramificada e aromáticas, indicando que estes são envolvidos no processamento intracelular de classe I. Apesar das varias semelhanças os complexos isolados não apresentam propriedades funcionais sobrepostas, o que sugere a presença de mecanismos regulatórios órgãos específicos afetando a composição do complexo proteolítico. Esta hipótese é apoiada por estudos comparativos, realizados com diferentes abordagens experimentais em bovino (CARDOZO et al, 1996) e camundongo ((FRENTZEL et al, 1993). O fato da EP24.15 está expressa no timo, sugere que esta possa esta associada ao imunoproteassoma.

Embora os papéis relativos da EP24.15 e outras peptidases citosólicas na degradação de peptídeos precisem ser mais esclarecidos, pode-se argumentar que a EP24.15 complementa a atividade proteolítica do proteassoma, que pode não ser suficiente para fornecer antígenos para a classe I (PETER & OSSENDORP, 2004). BENINGA et al., (1998) Stoltze et. al,(2000) identificaram outras peptidases citosólicas que completam atividade do proteassoma com a capacidade de decompor resíduos amino-terminal como : a leucina aminopeptidase (LAP), hidrolase bleomicina (BH) e aminopeptidase puromicina-sensível (PSA).

De acordo com NITTA et al, (2010), um tipo de proteassoma, denominado timoproteassoma, é especificamente expresso por células epiteliais tímicas corticais (CTECs) e é necessário para a geração de células T CD8 + , no presente trabalho verificamos uma associação da EP24.15 com as células epiteliais e portanto pode-se especular o seu papel durante ativação células T CD8 +. E segundo JUANG et al, (2010), a seleção e a maturação de células T no timo depende das interações entre receptores de linfócitos (TCR) e complexo de histocompatibilidade (MHC classe I). A seleção de células T é realizada no córtex onde as células progenitoras linfóides são induzidas a se transformar

em timócitos que expressam o receptor de células T, assim como co-receptores CD4 e CD8 (duplo-positivo, DP) (SCOLLAY et al., 1988) e este processo de diferenciação depende da interação com peptídeo de histocompatibilidade principalcomplexo (MHC) expresso no microambiente cortical (BOUSSO et al., 2002, LI et al., 2007). Esse processo é conhecido como a seleção positiva e contribui para a competência imunológica das células T (KISIELOW et al., 1988; VON BOEHMER, 1994; ALLEN, 1994; STARR et al., 2003). NITTA et al, (2010) mostrou que a seleção positiva induzida por timoproteassoma expresso em CTECs é essencial para a formação de um repertório de defesas imunológicas e auto-protecção de Células T CD8 +. A ausência de timoproteassoma em ratos, provoca defeitos graves na respostas das células T CD8 + e na sobrevivência à infecção por vírus influenza. Por outro lado, foram detectados sinais de autoimunidade em camundongos com timoproteassoma deficiente. Assim, a seleção positiva induzida por timoproteassoma e CTECs especificamente regula o repertório diversificado de Células T CD8 +, que é importante para a rejeição de tecidos e eliminação de células infectadas por vírus. Ainda segundo NITTA et al, (2010), a expressão do CTEC e timoproteassoma deve ser considerada para a reconstituição terapêutica de células T através de transplante ou regeneração das células do estroma tímico na prática clínica. De acordo com RAICA et al, (2009), as células epiteliais do corpúsculo de Hassall modulam a diferenciação de timócitos na região medular timo, uma vez que a EP24.15 foi observada nas CTEC e no corpúsculo de Hassall, é possível imaginar que esta enzima possa participar da seleção positiva e maturação das células T.

SHAROVA et al., (2009) estudando homogenato de baço de ratos, verificou a distribuição celular do imunoproteassoma em células da polpa vermelha e na bainha periarterial linfóide da polpa branca, através de imunofluorescência. Os resultados mostraram que tanto os linfócitos T e B como outras células do baço contêm imunoproteassomas com localização citoplasmática. No baço a EP24.15 foi encontrada em macrófagos e em células endoteliais e ambas parecem apresentar modulação via citocinas na expressão de imunoproteassoma (OSTROWSKA et al., 2006), o que reforça a idéia de um papel da EP24.15 no processamento extra lissomal de peptídeos

A imunoreação para EP24.15 também pode se observada em células endoteliais do baço e linfonodos, estudos anteriores sugerem um papel desta na regulação cardiovascular (SHRIMPTON et al., 2002), uma vez que essa enzima é capaz de hidrolisar peptídeos vasoativos tais como a angiotensina-I, neurotensina e bradicinina (SHRIMPTON et al., 2002) e potencializar a vasodilatação induzida por bradicinina (SMITH et al., 2000) com consequente diminuição da isquemia durante a injúria miocárdica por reperfusão (SCHRIEFER et al., 2001). Em experimento estudado por OSTROWSKA et al., (2006) utilizando evento isquêmico para provocar lesão renal de longa duração em ratos, com conseqüência um processo inflamatório local, observou-se uma alta expressão da subunidade LMP7 do imunoproteassoma em células epiteliais do córtex renal e em células endoteliais. Outros estudos sugerem um papel para EP24.15 no metabolismo de peptídeos vasodilatadores periféricos e no leito vascular cerebral (RIOLI et al., 2003). Além disso, foi mostrado que a EP24.15 hidrolisa a angiotensina-I em culturas de células musculares lisas na porção Pro⁷-Phe⁸ gerando o peptídeo vasodilatador angiotensina¹⁻⁷ (CHAPPELL et al., 1994). Essas informações, juntamente com o fato da EP24.15 estar amplamente distribuída em vasos sanguíneos, sugerem um possível papel dessa enzima no equilíbrio cardiovascular.

No sistema imune a EP24.15 parece estar intimamente relacionada a apresentação de antígenos e conseqüente ativação de células T.

7. CONCLUSÕES

O trabalho mostrou que a EP24.15 é expressa no sistema imunológico de ratos. O timo, linfonodo e baço apresentaram uma imunoreação por toda sua extensão e a intensidade da reação variava de acordo com a célula marcada no órgão. Macrófagos foi o tipo celular mais freqüente marcado nos órgãos linfóides. A imunoreação celular para EP24.15 foi preferencialmente citoplasmática, podendo estar localizada no núcleo, sendo que em menor intensidade.

8- REFERÊNCIAS

ABBAS, A. K. *Imunologia celular e molecular*. 4ª ed. Rio de Janeiro: **Revinter**, 2008. 486p.

ALLEN, P.M. Peptides in positive and negative selection: a delicate balance. **Cell** 76, 593–596, 1994

BANNISTER, A. L. AND SCHRIEFER, J. A. Demonstration of Endopeptidase 24.15 in Rabbit Heart: Evidence of Bradykinin's Role in Cardioprotection. **JAMA** Vol 105, N 1 January 2005.

BARRETT, A. J. ; RAWLINGS N. D.; WOESSNER F. J. ; *Handbook of proteolytic enzymes*. 2nd ed. New York: **Academic Press**; 2004.

BENIGNA, J. ; ROCK K. L.; GOLDBERG, A. L. Interferon-gamma can stimulate post-proteasomal trimming of the N terminus of an antigenic peptide by inducing leucine aminopeptidase. **J Biol Chem**, 273:18734-18742, 1998.

BENJAMINI, E. ; COICO, R.; SUNSHINE, G. *Imunologia*. **Guanabara koogan**, 2002.

BHoola, K. D.; FIGUEROA, C. D. ; WORTHY, K. BIOREGULATION OF KINIS: kallikreins, kiniogens and kinases. **Pharmacol Ver**, 44: 4-80, 1992.

BOUSSO, P., BHAKTA, N.R., LEWIS, R.S., and ROBEY, E. Dynamics of thymocyte-stromal cell interactions visualized by two-photon microscopy. **Science** 296, 1876–1880, 2002.

BODE W. ; HUBER R. Proteinase-protein inhibitor interaction. **Biomed Biochim Acta**. 1991;50(4-6):437-46.

BRAZEAU, VALE, W.; BURGUS, R.; LING, N.; BUTCHER, M.; RIVIER, J e GUILLEMIN, R. Hypothalamic polypeptide that inhibits the secretion of immunoreactive pituitary growth hormone. **Science**, v.170, n.68, Jan 5, p.77-9. 1973.

CAMARGO, A. C.; GOMES, M. D.; REICHL, A. P.; FERRO, E. S.; JACCHIERI, S.; HIRATA, I. Y. e JULIANO, L. Structural features that make oligopeptides susceptible substrates for hydrolysis by recombinant thimet oligopeptidase. **Biochem J**, v.324 (Pt 2), Jun 1, p.517-22. 1997.

CARRAWAY, R. e LEEMAN, S. E. The isolation of a new hypotensive peptide, neurotensina, from bovine hypothalami. **J. Biol Chem**, v.248, n.19, Oct 10, p.6854-61. 1973.

CARDOZO, C., ELEUTERI, A. M.; e ORLOWSKI, M. (1996) Changes in catalytic activities of the multicatalytic proteinase complexes (proteasomes) from bovine pituitary, lung and liver associated with changes in the contents of LMP7 and X subunits. **J. Biol. Chem.** 270(38), 22645–22651.

CHAPPELL, M. C.; TALLANT, E. A.; BROSNIHAN, K. B.; FERRARIO, C. M. Conversion of angiotensin-I to angiotensin-(1–7) by thimet oligopeptidase (EC3.4.24.15) in vascular smooth muscle cells. *J Vasc Med Biol.* 5:129–137. 1994.

CHOI HS, LESSER M, CARDOZO C e ORLOWSKI M, Immunohistochemical localization of endopeptidase 24.15 in rat trachea, lung tissue, and alveolar macrophages. **Am J Respir Cell Mol Biol** 3: 619–624. 1990.

CHU, T. G. e ORLOWSKI, M. Soluble metallopeptidase from rat brain: action on enkephalin-containing peptides and other bioactive peptides. **Endocrinology**, v.116, n.4, Apr, p.1418-25. 1985.

CRACK, P. J.; WU, T. J.; CUMMINS, P. M.; FERRO, E. S.; TULLAI, J. W.; GLUCKSMAN, M. J.; ROBERTS, J. L. The association of metalloendopeptidase EC 3.4.24.15 at the extracellular surface of the AtT20 cell plasma membrane. *Brain Res*; 835: 113-124, 1999.

CUMMINS, P. M.; PABON, A.; MARGULIES, E. H.; GLUCKSMAN, M. J. Zinc coordination and substrate catalysis within the neuropeptide processing enzyme

endopeptidase EC 3.4.24.15. Identification of active site histidine and glutamate residues. **J. Biol. Chem.** v. 274, p. 16003-16009, 1999.

D' SOUZA, S. P. ; DAVIS, M. ; BAXTER, F. G. Autocrine and paracrine actions of natriuretic peptides in the heart. **Pharmacol Ther**, 101: 113;29, 2004.

DAVIS, T.P.; GILLESPIE, T.J.; KONINGS, P.N.M. Specificity of neurotensin metabolism by regional rat brain slices. **J Neurochem**, 58: 608-17, 1992.

DEMASI, M.; PIASSA F. G. M.; CASTRO, L. M.; FERREIRA, J.C.; RIOLI, V.; FERRO, E. S. Oligomerization of the cysteinyl-rich oligopeptidase EP24.15 is triggered by S-glutathionylation. *Free Rad. Biol. Med.*, v. 44, p. 1180-1190, 2008.

DREWS, O. ; WILDGRUBER, R. ; ZONG, C. ; SUKOP, U. ; NISSUM, M. ; WEBER, G. ; GOMES, A. V. ; PING, P. Mammalian Proteasome Subpopulations with Distinct Molecular Compositions and Proteolytic Activities. **Molecular & Cellular Proteomics** **6.11** 2021-2031, 2007.

DOAN, T. T. ; MELVOLD, R. ; WALTENBAUGH, C. *Imunologia Médica Essencial*. Rio de Janeiro: **Guanabara Koogan**, 2006.

ELEUTERI, A. M.; KOHANSKI, R. A.; Cardozo, C. e ORLOWSKI, M. (1997). Bovine spleen multicatalytic proteinase complex (proteasome). Replacement of X,Y, and Z subunits by LMP7, LMP2 and MECL1 and changes in properties and specificity. **Journal of Biological Chemistry**, 272, 11824–11831.

ELEUTERI, A. M.; ANGELETTI, M. ; LUPIDI, G. ; TACCONI, R. ; BINI, L. ; FIORETTI, E. ; Isolation and Characterization of Bovine Thymus Multicatalytic Proteinase Complex. **Protein Expression and Purification** 18, 160–168 (2000).

FERRARIO CM, BROSNIHAN KB, DIZ DI, JAISWAL N, KHOSLA MC, MILSTED A, Tallant EA Angiotensin-(1–7): a new hormone of the angiotensin system. **Hypertension** **18** (Suppl III):III-126–III-133. 1991.

FERRO, E. S.; TAMBOURGI, D. V.; GOBERSZTEJN, F.; GOMES, M. D.; SUCUPIRA, M.; ARMELIN, M.C.S.; KIPNIS, T.L.; CAMARGO, A.C.M. Secretion of a neuropeptide-metabolizing enzyme similar to endopeptidase 22.19 by glioma C6 cells. **Biochem Biophys Res Commun** 191:275–281. 1993.

FERRO, E. S.; TAMBOURGI, D. V.; ABREU, P.A.E.; CAMARGO, A.C.M.; RAW, I.; HO, P.L. 1 Characterization of an endooligopeptidase A-like protein in PC12 cells: activity modulation by cAMP but not by basic fibroblast growth factor. **J Cell Biochem** 57:311–320, 1995.

FERRO, E.S. ; TULLAI, J. W. ; GLUCKSMAN, M.J.; ROBERTS, J. L. Secretion metalloendopeptidase 24.15 (EC 3.4.24.15). **DNA Cell Biol** 18: 781–789. 1999.

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.

FLOURET, G.; STETLER-STEVENSON, M. A.; CARONE, F. A.; PETERSON, D. R. Enzymatic degradation of LHRH and analogues. In: Vickery BH. Nestor JJ, Hafez ESE, eds. LHRH and its analogues: a new class of contraceptive and therapeutic agents. Lancaster: **Blackwell Science**, 397-410, 1984.

FONTENELE-NETO, J. D.; MASSARELLI, E. E.; GARRIDO, P. A. G.,; BEAUDET, A.; e FERRO, E. S. Comparative Fine Structural Distribution of Endopeptidase 24.15 (EC 3.4.24.15) and 24.16 (EC 3.4.24.16) in Rat Brain. **J Comp Neurol** 438:399–410, Jul 20. 2001.

FREMTZEL, S., KUHN-HARTMANN, I., GERNOLD, M., GOTT, P., SEELIG, A., and KLOETZEL, P.-M. (1993) The major-histocompatibility-complex-encoded b-type proteasome subunits LMP2 and LMP7. Evidence that LMP2 and LMP7 are synthesized as proproteins and that cellular levels of both mRNA and LMP-containing 20S proteasomes are differentially regulated. **Eur. J. Biochem.** 216,119–126.

GALLIO, M.; STURGILL, G.; RATHER, P. ; KYLSTEN, P. A conserved mechanism for extracellular signaling in eukaryotes and prokaryotes. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v99, n. 19, sep 17, p. 12208;13. 2002.

GARTNER, L. P.; HIATT J. L. Tratando de histologia. Rio de Janeiro: **Elsevier**, 576p.2007.

GENESER, F. Histologia. 3.ed. Rio de Janeiro: **Guanabara Koogan**, 2003.

GIOLI P.L.; FONTENELE-NETO J.D.; BORGES D. R.; KOUYOUMDJIAN M. 2003. Localization of EP24.15, a major liver kininase. **J Histochem Cytochem** 51(1):125-127.

GLADA, M. L. R.; MIRANDA, M. T. M.; MARQUEZ, U. M. L.; **Food Chem.**,61, 177, 1998.

GOLDBERG, A.L. Functions of the proteasome: from protein degradation and immune surveillance to cancer therapy, **Biochem. Soc. Trans.** 35 (2007) 12–17.

GOMES, M. D.; JULIANO, L.; FERRO, E. S.; MATSUEDA, R.; CAMARGO, A. C. Dynorphin-derived peptides reveal the presence of a critical cysteine for the activity of brain endo oligopeptidase A. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, v. 197, n. 2, p. 501-507, 1993.

HARDIE, D. G. Biochemical Messengers. Hormones, neurotransmitters and grow factor. London: **Chapman e Hall**. 1-311, 1992.

HEALY D.P.; ORLOWSKI ,M. 1992. Immunocytochemical localization of endopeptidase 24.15 in rat brain. *Brain Res* 571(1):121-128.

HORSTHEMKE B e 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** 19:2867–2873. 1980.

HORSTHEMKE B e BAUER K, Substrate specificity of an adenohipophyseal endopeptidase capable of hydrolyzing luteinizing hormone-releasing hormone: preferential cleavage of peptide bonds involving the carboxyl terminus of hydrophobic and basic amino acids. **Biochemistry** 21:1033–1036. 1982.

HUANG, L. ; TANG, W. Vasopressor agents: old and new components. **Curr Opin Crit Care**, 10: 183-7, 2004.

JANECKA, A. ; FICHINA, J. ; JANECKI, T. Opioid receptors and their ligands. **Curr Top Med Chem**, 4: 1-17, 2004.

JOHNSON, K. E. Histology and Cell Biology. **Williams & Wilkins medical publication**, 1991.

JUANG, J.; EBERT, P.J.R.; FENG, D.; GARCIA, K.C.; KROGSGAARD, M.; DAVIS, M. M. Peptide-MHC heterodimers show that thymic positive selection requires a more restricted set of self-peptides than negative selection. **JEM**. 207 No. 6: 1223-1234, 2010

JUNQUEIRA L. C. e CARNEIRO J. Histologia Básica, 8º edição, Editora **Guanabara Koogan** S. A. 2008.

KEST, B.; ORLOWSKI, M.; MOLINEAUX, C. J.; BODNAR, R. J. Antinociceptive properties of inhibitors of endopeptidase 24.15. **Int. J. Neurosci.**, v. 56, n. 1-4, p.141-149, 1991.

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

KIM, S.; PABON, A.; SWANSON, T. A.; GLUCKSMAN M. J. Regulation of cell-surface major histocompatibility complex class I expression by the endopeptidase EC 3.4.24.15 (thimet oligopeptidase). **Biochem. J.**, v. 375, p. 111-120, 2003.

KISIELOW, P., TEH, H.S., BLUTH THAMANN, H., E VON BOEHMER, H. (1988). Positive selection of antigen-specific T cells in thymus by restricting MHC molecules. **Nature** 335, 730–733.

KITABGI, P.; CARRAWAY, R. e LEEMAN, S. E. Isolation of a tridecapeptide from bovine intestinal tissue and its partial characterization as neurotensina. **J Biol Chem**, v.251, n.22, Nov 25, p.7053-8. 1976.

KOCH, Y.; BARAM, T.; HAZUM, E.; FRIDKIN, M. Resistance to enzymatic degradation of LHRH analogues possessing increased biological activity. **Biochem Biophys Res Comm**; 74: 488-491, 1974a.

KOCH, Y.; BARAM, T.; SHOBSIENG, P.; FRIDKIN, M. Enzymatic degradation of luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH) by hypothalamic tissue. **Biochem Biophys Res Comm**; 74: 95-103, 1974b.

LABRIE, F.; BELANGER, A.; DUPONT, A. LHRH and its analogues: Basic and clinical aspects. Amsterdam: **Elsevier**, 3-15, 1984.

LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. Princípios de Bioquímica, 3ª edição. São Paulo. **Sarvier**, 2005.

LEW, R. A.; COWLEY, M.; CLARKE, I. J.; SMITH, A. I. Peptidases that degrade gonadotropin-releasing hormone: influence on LH secretion in the ewe. **J. Neuroendocrinol**, v. 9, n. 9, p. 707-712, 1997.

LEW, R. A.; BOULOS E. Bradykinin analogues with beta-amino acid substitutions reveal subtle differences in substrate specificity between the endopeptidases EC 3.4.24.15 and EC 3.4.24.16. **J Pept Sci**, v.6, n.9, Sep, p.440-5. 2000.

LI, J., IWANAMI, N., HOA, V.Q., FURUTANI-SEIKI, M., and TAKAHAMA, Y. (2007). Noninvasive intravital imaging of thymocyte dynamics in medaka. **J. Immunol.** 179, 1605–1615

LINARDI, A.; PANUNTO P. C. Peptidase activities in rats treated chronically with N(omega)-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME). **Biochem Pharmacol**, v.68, n.2, Jul 15, p.205-14. 2004.

LODISH, H.; BERK, A.; MATSUDAIRA, P.; KAISER, A. C.; KRIEGER, M.; SCOTT, P. M. Biologia Molecular São Paulo: **Sarvier**, 842p.1999.

MACHADO, A.; CLEBER W. L.; PATRÍCIA B. P.; CÉSAR R. ; MIRANDA T. M. . Síntese química e enzimática de peptídeos: princípios básicos e aplicações. **Quim. Nova**, Vol. 27, No. 5, 781-789, 2004

MACHADO, M. F.; CUNHA F. M. Substrate phosphorylation affects degradation and interaction to endopeptidase 24.15, neurolysin, and angiotensin-converting enzyme. **Biochem Biophys Res Commun**, v.339, n.2, Jan 13, p.520-5. 2006.

MAGGI, C. A. Tachykinins and calcitonin gene-related peptide (CGRP) as cotransmitters released from peripheral endings of sensory nerves. **Prog Neurobiol**, 45: 1-98, 1995.

MASAKI, T. Historical review: endothelin. **Trends Pharmacol Sci**, 25: 219-24, 2004.

MASSARELLI, E. E.; CASATTI, C. A.; KATO, A.; CAMARGO, A. C.; BAUER, J. A.; GLUCKSMAN, M. J.; ROBERTS, J. L.; HIROSE, S. e FERRO, E. S.. Differential subcellular distribution of neurolysin (EC 3.4.24.16) and thimet oligopeptidase (EC 3.4.24.15) in the rat brain. **Brain Res**, v.851, n.1-2, Dec 18, p.261-5. 1999.

MCKIE, N.; DANDO, P. M.; RAWLINGS, N. D.; BARRET, A. J. Thimet oligopeptidase: similarity to 'soluble angiotensin II-binding protein' and some corrections to the published amino acid sequence of the rat testis enzyme. **Biochem. J.**, v. 295, p. 57-60, 1993.

MENTLEIN, R. e P. DAHMS. Endopeptidases 24.16 and 24.15 are responsible for the degradation of somatostatin, neurotensin, and other neuropeptides by cultivated rat cortical astrocytes. **J Neurochem**, v.62, n.1, Jan, p.27-36. 1994.

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

NODA, C.; TANAHASHI, N.; SHIMBARA, N.; HENDIL, K. B.; e TANAKA, K. (2000). Tissue distribution of constitutive proteasomes, immunoproteasomes and PA28 in rats. **Biochemical and Biophysics Research Communications**, 277, 348–354.

NITTA, T. ; MURATA, S. ; SASAKI, M. ; FUJII, H. ; RIPEN, A. M. ; ISSHIMARU, N. ; KOYASU, S.; TANAKA, K.; TAKAHAMA, Y. Thymoproteasome Shapes Immunocompetent Repertoire of CD8+ T Cells. **J.Immuni**.10.009, 2010

OLIVEIRA, V.; CAMPOS, M.; MELO, R. L.; FERRO, E. S.; CAMARGO, A . C.; JULIANO, M. A.; JULIANO, L. Substrate Specificity Characterization of Recombinant Metallo Oligo-Peptidases Thimet Oligopeptidase and Neurolysin. **Biochemistry**, v. 40, n.14, p. 4417-4425, 2001.

OLIVEIRA, V.; GARRIDO, P. A.; RODRIGUES, C. C.; COLQUHOUN, A.; CASTRO, L. M.; ALMEIDA, P. C.; SHIDA, C. S.; JULIANO, M. A.; JULIANO, L.; CAMARGO, A. C.; HYSLOP, S.; ROBERTS, J. L.; GRUM-TOKARS, V.; GLUCKSMAN, M. J.; FERRO, E. S. Calcium modulates endopeptidase 24.15 (EC 3.4.24.15) membrane association, secondary structure and substrate specificity. **FEBS J**; 272: 2978-2992, 2005.

ORLOWSKI M, MICHAUD C e CHU TG, Asoluble metalloendopeptidase from rat brain. Purification of the enzyme and determination of specificity with synthetic and natural peptides. **Eur J Biochem** 135:81–88. 1983.

ORLOWSKI M, REZNIK S, AYALA J e PIEROTTI AR, Endopeptidase 24.15 from rat testes. Isolation of the enzyme and its specificity toward synthetic and natural peptides, including enkephalincontaining peptides. **Biochem J** 261:951–958. 1989.

OSTROWSKA, H. ; KRUSZEWSKI, K.; KASACKA I. Immuno-proteasome subunit LMP7 is up-regulated in the ischemic kidney in an experimental model of renovascular hypertension. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology** 38 1778–1785, 2006.

PAMER, E. ; CRESSWELL, P. Mechanisms of MHC class I-restricted antigen processing. **Annu. Rev. Immunol.** 16, 323–358, 1998

PETER, M. K. ; OSSENDORP, F. Proteasome and peptidase function in MHC-class-I-mediated antigen presentation. **Current Opinion in Immunology**, 16:76–81,2004

PIEROTTI, A.; DONG, K. W.; GLUCKSMAN, M. J.; ORLOWSKI, M.; ROBERTS, J. L. Molecular cloning and primary structure of rat testes metalloendopeptidase EC 3.4.24.15. **Biochemistry**, v. 29, p. 10323-10329, 1990.

PIEROTTI, A. R.; LASDUN, A.; AYALA, J. M.; ROBERTS, J. L.; MOLINEAUX, C. J. Endopeptidase-24.15 in rat hypothalamic/pituitary/gonadal axis. **Mol Cell Endocrinol** 76:95–103, 1991.

PINEAU C, MCCOOL S, GLUCKSMAN MJ, JEGOU B, PIEROTTI AR. 1999. Distribution of thimet oligopeptidase (E.C. 3.4.24.15) in human and rat testes. **J Cell Sci** 112 (Pt 20):3455-3462

PORTARO, F. C.; GOMES, M. D.; CABRERA, A.; FERNANDES, B. L.; SILVA, C. L.; FERRO, E. S.; JULIANO, L. e DE CAMARGO, A. C. Thimet oligopeptidase and the

stability of MHC class I epitopes in macrophage cytosol. **Biochem Biophys Res Commun**, v.255, n.3, Feb 24, p.596-601. 1999.

PUENTE, X. S.; SÁNCHEZ, L. M.; OVERALL, C. M.; LÓPEZ-OTÍN C. Human and mouse proteases: a comparative genomic approach. **Nat Rev Genet**. 2003;4(7):544-58.

RAMOS, C. P. A via proteolítica dependente de ubiquitina / proteassoma. 2002

RAWLINGS, N. D.; BARRETT, A. J.; BATMAN, A. MEROPS: the peptidase database. **Nucleic Acids Research**, Vol. 38, Database issue D227–D233, 2010.

RAY, K.; HINES, C. S. e RODGERS, D. W. Mapping sequence differences between thimet oligopeptidase and neurolysin implicates key residues in substrate recognition. **Protein Sci**, v.11, n.9, Sep, p.2237-46. 2002.

REGOLI, D.; PARK, W. R.; RIOUX, F. Pharmacology of angiotensin. **Pharmacol Ver**, 26: 69-123, 1974.

REICHLIN, S. Somatostatin. **N Engl J Med**, v.309, n.24, Dec 15, p.1495-501. 1983.

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**. 278:8547–8555. 2003.

ROITT, I. M.; BROSTOFF, J.; MALE, D. *Imunologia*. 5ª ed. São Paulo: Manole, 2003. 423p.

SARIC, T.; GRAEF, C. I.; AKOPIAN, T. N.; ROCK, K. L.; GOLDBERG A. L. Major histocompatibility complex class I-presented antigenic peptides are degraded in cytosolic extracts primarily by thimetoligopeptidase. **J Biol Chem**, 276:36474-36481, 2001.

SARIC, T.; GRAEF C. I. Pathway for degradation of peptides generated by proteasomes: a key role for thimet oligopeptidase and other metallopeptidases. **J Biol Chem**, v.279, n.45, Nov 5, p.46723-32. 2004.

SCHIMKE, R. e DOYLE, D. **Annu. Rev. Biochem.** 39 (1975) 929

SCHOENHEIMER, R. in *The dynamic State of Body Constituents*. Harvard University Press, Cambridge, Massachusetts, 1942 Simpson, M. V. **J. Biol. Chem.** 201 (1953) 143

SCHRIEFER, J. A.; BOUDY, E. P.; HASSEN, A. H. Inhibitors of bradykinininactivating enzymes decrease myocardial ischemia/reperfusion injury following 3 and 7 days of reperfusion. *J Pharmacol Exp Ther.* 298: 970–975. 2001.

SCOLLAY, R., WILSON, A., D'AMICO, A., KELLY, K., EGERTON, M., PEARSE, M., Wu, L., and SHORTMAN, K. (1988). Developmental status and reconstitution potential of subpopulations of murine thymocytes. **Immunol. Rev.** 104, 81–120.

SHAROVA P. N.; LIUDMILA A.; ZAKHAROVA, T. M. ; ASTAKHOVA, Y. D. ; KARPOVA V. I. ; ROCK, A. L. Goldberg, 26S proteasomes and immunoproteasomes produce mainly N-extended versions of an antigenic peptide, **EMBO J.** 20 (2001) 2357–2366.

SHAROVA P.N. Immune proteasomes and immunity, **Ontogenez** 37 (2006) 171–178.

SHAROVA P. N.; LIUDMILA A.; ZAKHAROVA, T. M. ; ASTAKHOVA, Y. D. ; KARPOVA V. I. ; DMITRIEVA, S. B. ; LYUPINA, Y. V. ; EROKHOV, P. A. New approach to study of T cellular immunity development: Parallel investigation of lymphoid organ formation and changes in immune proteasome amount in rat early ontogenesis. **Cellular Immunology** 256, 47–55, 2009.

SHIVAKUMA, B. R.; WANG Z. EP24.15 interacts with the angiotensin II type I receptor and bradykinin B2 receptor. **Cell Biochem Funct**, v.23, n.3, May-Jun, p.195-204. 2005.

SHRIMPTON, C. N.; GLUCKSMAN, M. J.; LEW, R. A.; TULAI, J. W.; MARGULIES, E. H.; ROBERTS, J. L. e SMITH, A. I. Thiol activation of endopeptidase EC 3.4.24.15. A

novel mechanism for the regulation of catalytic activity. **J Biol Chem**, v.272, n.28, Jul 11, p.17395-9. 1997.

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

SHRIMPTON C. N., WOLFSON A. J., SMITH A. I., LEW R. A.; Regulators of the neuropeptidodegrading enzyme, EC 3.4.24.15 (thimet oligopeptidase), in cerebrospinal fluid. **J Neurosci Res**; 74: 474-478, 2003.

SILVA, C. L.; PORTARO, F. C.; BONATO , V. L.; DE CAMARGO, A. C e FERRO, E. S. Thimet oligopeptidase (EC 3.4.24.15), a novel protein on the route of MHC class I antigen presentation. . **Biochem Biophys Res Commun**, v.255, n.3, Feb 24, p.591-5. 1999.

SIMPSON, M. V. **J. Biol. Chem.** 201 (1953) 143

SKIDGEL R.A. Bradykinin-degrading enzymes: structure, function, distribution, and potential roles in cardiovascular pharmacology. **J Cardiovasc Pharmacol** 20(Suppl 9):S4–S9. 1992.

SMITH, A. I.; LEW, R. A.; SHRIMPTON, C. N.; EVANS, R. G.; ABBENANTE, G. A novel inhibitor of endopeptidases EC3.4.24.15 and 3.4.24.16 potentiates bradykinin-induced hypotension. **Hypertension**. 35:626–630. 2000.

STARR, T.K., JAMESON, S.C; HOGQUIST, K.A. Positive and negative selection of T cells. **Annu. Rev. Immunol.** 21, 139–176, 2003.

STOLTZE, L. ; SCHIRLE, M. ; SCHWARZ, G. ; SCHROTER, C. ; THOMPSON M. W. ; HERSH, L. B. ; KALBACHER, H. S. ; RAMMENSEE, H. G. ; SCHILD, H. Two new proteases in the MHC class I processing pathway. **Nat Immunol**, 1:413-418, 2000.

STREHL B.; SEIFERT U.; KRUGER E.; HEINK S.; KLOETZEL P. M. ; Interferon- γ , the functional plasticity of the ubiquitin–proteasome system, and MHC class I antigen processing, **Immunol. Rev.** 207 ,19–30. 2005.

TISLJAR, U. E BARRETT, A. J. A distinct thimet peptidase from rat liver mitochondria. **FEBS Lett**, v.264, n.1, May 7, p84-6. 1990.

TULLAI, J.W. ; CUMMINS, P. M. ; PABON, A. ; ROBERTS, J. L. ; LOPINGCO, M. C. ; SHRIMPTON, C. N. ; SMITH, A. ; MARTIGNETTI, J. A. ; FERRO, E. S. ; GLUCKSMAN, M. J. The neuropeptide processing enzyme EC 3.4.24.15 is modulated by protein kinase A phosphorylation. **J Biol Chem**, 275: 36514–36522, 2000.

VON BOEHMER, H. Positive selection of lymphocytes. **Cell** 76, 219–228, 2004.

WALTERS, K.; WEGORZEWSKA, I. N.; CHIN, Y. P.; PARIKH, M. G.; WU, T. J. Luteinizing hormonereleasing hormone I (GNRH-I) and its metabolite in peripheral tissues. **Exp Biol Med (Maywood)**; 233:123-130, 2008.

WU, T. J.; PIEROTTI, A. R.; JAKUBOWSKI, M.; SHEWARD, W. J.; GLUCKSMAN, M. J.; SMITH, A. I.; KING, J. C.; FINK, G.; ROBERTS, J. L. Endopeptidase EC 3.4.24.15 presence in the rat median eminence and hypophysial portal blood and its modulation of the luteinizing hormone surge. **J. Neuroendocrinol.**, v. 9, n. 11, p. 813-822, 1997.

YAMADA K, IYER SN, CHAPPELL MC, GANTEN D, FERRARIO CM. Converting enzyme determines plasma clearance of angiotensin-(1–7). **Hypertension** 32:496–502. 1999.

YORK, I.A. ; GOLDBERG, A. L.; ROCK, K. L Proteolysis and class I major histocompatibility complex antigen presentation. **Immunol Rev** , 172:29-48, 1999

YORK, I. A.; MO, A. X.; LEMERISE, K.; ZENG, W.; SHEN, Y.; ABRAHAM, C. R.; SARIC, T.; GOLDBERG, A. L.; ROCK, K. L. 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.