



**INSTITUTO SUPERIOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
EGAS MONIZ**

MESTRADO INTEGRADO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**DESENVOLVIMENTO DE NOVOS INIBIDORES PARA
METALOPROTEINASES DE MATRIZ**

Trabalho submetido por
Sara Filpa da Silva Guedes
para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas

novembro de 2016



**INSTITUTO SUPERIOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
EGAS MONIZ**

MESTRADO INTEGRADO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**DESENVOLVIMENTO DE NOVOS INIBIDORES PARA
METALOPROTEINASES DE MATRIZ**

Trabalho submetido por
Sara Filipa da Silva Guedes
para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas

Trabalho orientado por
Professor Doutor Jorge Caldeira

novembro de 2016

Dedicatória

*“For those who said I had too many dreams inside me: they gave me life. Now it’s my
turn to give theirs”*

Agradecimentos

Em primeiro lugar, quero agradecer ao Professor Jorge Caldeira pelo seu apoio e disponibilidade durante todo o período de trabalho e pela oportunidade de integrar na sua equipa. Obrigada por me motivar a contar a minha história.

Muito obrigada aos meus pais por lutarem durante anos para me proporcionarem uma vida cheia de oportunidades como esta. Obrigada por acreditarem em mim, por me ouvirem, apoiarem e, acima de tudo, por não me cortarem as asas. Não podia ter mais orgulho. Agora é a minha vez de vos mostrar o que aprendi.

Em segundo lugar, à minha irmã, por ter sido um exemplo para mim e um modelo a seguir. A tua espontaneidade inspira-me e eu espero continuar a seguir os teus passos “à minha maneira”. Não és apenas a minha irmã mais velha, és como a minha segunda mãe. Obrigada ao meu cunhadinho por tomares tão bem conta dela, decididamente” vais para o céu”.

Obrigada à pessoa que faz de mim o melhor que sou. Pelo apoio, amor, carinho, paciência e acima de tudo por seres o melhor amigo que poderia ter. Palavras para quê? A nossa vida começa agora, e que os nossos sonhos possam finalmente ganhar forma.

Obrigada aos meus amigos por estarem presentes e me apoiarem quando mais preciso e pelas vezes em que me senti um caco e cansada e vocês conseguiram fazer-me rir com as vossas histórias. São a família que escolhi.

E por fim, obrigada às minhas companheiras destes anos de luta e esforço, e por tudo o que partilhámos, rimos e chorámos. Pelas horas de estudo e desespero, pelos jantares e serões...com vocês faria tudo outra vez!

Resumo

As metaloproteinases de matriz pertencem a uma família de endopeptidases zinco-dependentes envolvidas tanto em processos fisiológicos, tais como degradação de proteínas da membrana extracelular, remodelação de tecidos, embriogênese e cicatrização, como em processos patológicos como progressão tumoral e doenças inflamatórias e vasculares utilizando, entre vários substratos, o colagénio. Esta atividade é regulada através de um equilíbrio com os inibidores tecidulares (TIMPs) que, quando atinge um desequilíbrio pode conduzir a um excesso de degradação dos componentes da ECM e conseqüentemente a vários efeitos patológicos. Ao longo de vários anos têm sido desenvolvidos vários inibidores exógenos, como o *Batimastat* e *Marimastat*, de modo a controlar a atividade excessiva das MMPs e assim encontrar uma terapêutica para as diversas patologias, como por exemplo a cárie dentária.

No tratamento da cárie dentária são utilizadas resinas de ligação à dentina, utilizando a matriz desmineralizada de colagénio da dentina como esqueleto. Durante a mineralização da dentina, as MMPs podem ligar-se às as fibras de colagénio expostas, podendo ficar presas à matriz calcificada e conseqüentemente degradar o colagénio e a gelatina ligados à resina, resultando na diminuição da duração da restauração dentária.

O objetivo deste trabalho experimental foi a realização de testes enzimáticos de modo a testar a capacidade inibitória de nove compostos sintetizados em laboratório, para quatro concentrações diferentes (1mM, 0,1mM, 0,05mM e 0,01mM) relativamente às cinco MMPs mais abundantes na dentina – MMP-1, MMP-2, MMP-8, MMP-9, MMP-13 - e posteriormente. Após análise dos resultados pode-se concluir que, em geral, os compostos apresentaram efeitos inibitórios sobre as enzimas e diferentes especificidades para as mesmas.

Palavras-chave: metaloproteinases da matriz | matriz extracelular | inibidores das metaloproteinases de matriz | restauração dentária

Abstract

Matrix metalloproteinases belong to a family of zinc dependent endopeptidases involved in both physiological processes, such as degradation of extracellular membrane proteins, tissue remodeling, embryogenesis and healing, as well as pathological processes such as tumor progression and inflammatory and vascular diseases, using various substrates such as collagen. This activity is regulated through a balance with tissue inhibitors (TIMPs) and, when reaches an imbalance, it can lead to an excess of degradation of the ECM components and consequently to various pathological effects. Over the years several exogenous inhibitors such as *Batimastat* and *Marimastat* have been developed in order to control the excessive activity of MMPs and thus to find a therapy for the various pathologies, such as dental caries.

In the treatment of dental caries, dentin binding resins are used, using the demineralized matrix of dentin collagen as a skeleton. During dentin mineralization, the MMPs may bind to the exposed collagen fibers and may become attached to the calcified matrix and consequently degrade the resin-bound collagen and gelatin, resulting in decreased duration of dental restoration.

The objective of this experimental work was to carry out enzymatic tests to test the inhibitory capacity of nine compounds synthesized in the laboratory for four different concentrations (1mM, 0.1mM, 0.05mM and 0.01mM) in relation to the five most abundant MMPs in the dentin - MMP-1, MMP-2, MMP-8, MMP-9, MMP-13. After analysis of the results it can be concluded that, in general, the compounds showed inhibitory effects on the enzymes and different specificities for them.

Key words: matrix metalloproteinases | extracellular matrix | matrix extracellular inhibitors | dental restoration

Índice

Capítulo I	13
1. Metaloproteinases de matriz.....	13
2. Classificação das MMPs	14
2.1. Colagenases	14
2.2. Gelatinases	14
2.3. Estromelisinases	15
2.4. Matrilisinases.....	16
2.5. MMPs membranares	17
2.6. Outras MMPs	17
3. Inibidores das metaloproteinases	18
4. As MMPs na restauração dentária.....	21
Capítulo II.....	23
1. Ensaio enzimático	23
2. Resultados e discussão	28
2.1. Controlo do substrato	28
2.2. Controlo da interação substrato-enzimas	30
2.3. Controlo da interação substrato-inibidor	33
2.4. Determinação da velocidade inicial	35
3. Conclusão.....	47
Capítulo III	49
Bibliografia	49

Índice de Figuras

Figura 1. Estrutura básica da colagenases (adaptado de Tan & Liu, 2012)	14
Figura 2. Estrutura básica das gelatinases (adaptado de Tan & Liu, 2012).....	15
Figura 3. Estrutura básica das matrilisinas (adaptado de Tan & Liu, 2012)	16
Figura 4. Estrutura básica das MMPs tipo-membrana (adaptado de Tan & Liu, 2012)	17
Figura 5. Estrutura do dente (adaptado de Matthew Hoffman, 2015).....	21
Figura 6. Estrutura do composto C1.....	23
Figura 7. Estrutura do composto C2.....	23
Figura 8. Estrutura do composto C3.....	23
Figura 9. Estrutura do composto C4.....	24
Figura 10. Estrutura do composto C5.....	24
Figura 11. Estrutura do composto C6.....	24
Figura 12. Estrutura do composto C7.....	24
Figura 13. Estrutura do composto C8.....	24
Figura 14. Estrutura do composto C9.....	25
Figura 15. Estrutura molecular do substrato cromogénio utilizado no kit colorimétrico para a detecção da atividade inibitória, de fórmula Ac-Pro-Leu-Gly- [2-mercapto-4-metil-pentanoil]- Leu-Gly-OC ₂ H ₅ . A seta marca a ligação a ser hidrolisada	27
Figura 16. Estrutura molecular do produtos da reação incluindo um tiol que irá reagir com o DTNB.....	27
Figura 17. Estrutura molecular dos produtos da reação do tiol com o DTNB formando um produto corado (acido 2-nitro-5-tiobenzoico)	27
Figura 18. Gráfico do controlo de estabilidade do substrato da placa 1.....	29
Figura 19. Gráfico do controlo de estabilidade do substrato da placa 2.....	29
Figura 20. Gráfico do controlo de estabilidade do substrato da placa 3.....	29
Figura 21. Gráfico do controlo de estabilidade do substrato da placa 4.....	30
Figura 22. Gráfico da velocidade inicial para a MMP-1 nas placas 1, 2, 3 e 4.....	30
Figura 23. Gráfico da velocidade inicial para a MMP-2 nas placas 1, 2, 3 e 4.....	31
Figura 24. Gráfico da velocidade inicial para a MMP-8 nas placas 1, 2, 3 e 4.....	32
Figura 25. Gráfico da velocidade inicial para a MMP-9 nas placas 1, 2, 3 e 4.....	32
Figura 26. Gráfico da velocidade inicial para a MMP-13 nas placas 1, 2, 3 e 4.....	33
Figura 27. Gráfico de interação entre o substrato e os compostos C5, C6, C7, C8 e C9	34
Figura 28. Gráfico de interação entre o substrato e os compostos C1, C2, C3 e C4.....	34
Figura 29. Gráfico da atividade enzimática da MMP-1 na presença dos compostos em estudo. 38	
Figura 30. Gráfico da atividade enzimática da MMP-2 na presença dos compostos em estudo. 39	
Figura 31. Gráfico da atividade enzimática da MMP-8 na presença dos compostos em estudo. 40	
Figura 32. Gráfico da atividade enzimática da MMP-9 na presença dos compostos em estudo.	41
Figura 33. Gráfico da atividade enzimática da MMP-13 na presença dos compostos em estudo	42

Índice de Tabelas

Tabela 1. Velocidades iniciais (mOD/min) determinadas para cada enzima e composto da placa 1.....	35
Tabela 2. Velocidades iniciais (mOD/min) determinadas para cada enzima e composto da placa 2.....	36
Tabela 3. Velocidades iniciais (mOD/min) determinadas para cada enzima e composto da placa 3.....	37
Tabela 4. Velocidades iniciais (mOD/min) determinadas para cada enzima e composto da placa 4.....	37
Tabela 5. Percentagem de inibição enzimática das várias enzimas pelo composto C1.....	43
Tabela 6. Percentagem de inibição enzimática das várias enzimas pelo composto C2.....	43
Tabela 7. Percentagem de inibição enzimática das várias enzimas pelo composto C3.....	43
Tabela 8. Percentagem de inibição enzimática das várias enzimas pelo composto C4.....	43
Tabela 9. Percentagem de inibição enzimática das várias enzimas pelo composto C5.....	44
Tabela 10. Percentagem de inibição enzimática das várias enzimas pelo composto C6.....	44
Tabela 11. Percentagem de inibição enzimática das várias enzimas pelo composto C7.....	44
Tabela 12. Percentagem de inibição enzimática das várias enzimas pelo composto C8.....	45
Tabela 13. Percentagem de inibição enzimática das várias enzimas pelo composto C9.....	45

Lista de Abreviaturas

ABS – absorvância

CAT – domínio catalítico

DMSO – dimetilsulfóxido

DTNB – ácido 5,5'-ditiobis-(2-nitrobenzóico)

ECM – matriz extracelular

GPI – glicosilfosdatidilinositol

HPX – domínio de hemopexina

MMP – metaloproteinase de matriz

MT-MMP – metaloproteinases membranares

NNGH – ácido N-isobuti-N-(4-metoxifenilsulfonil)glicilhidroxâmico

TIMP – inibidor tecidual das metaloproteinases da matriz

V₀ – velocidade inicial

Zn²⁺ – íão zinco

Capítulo I

1. Metaloproteinases de matriz

As metaloproteinases de matriz (MMPs) pertencem a uma família de endopeptidases designadas por metzincinas, e possuem um papel importante no metabolismo celular, nomeadamente na degradação de constituintes da matriz extracelular (ECM) sendo assim responsáveis tanto por processos fisiológicos – embriogénese, remodelação de tecidos e cicatrização - como patológicos – cancro, doenças inflamatórias, artrite reumatoide, periodontite e doenças vasculares (Fanjul-fernández, Folgueras, Cabrera, & López-otín, 2010; Klein & Bischoff, 2011).

Estas enzimas utilizam como substratos o colagénio, a elastina, a fibronectina e a laminina, encontrando-se subdivididas em classes, não só de acordo com a especificidade para cada um desses substratos, mas também devido a pequenas diferenças estruturais entre si e à sua presença em determinados tecidos e processos fisiológicos (Fanjul-fernández et al., 2010).

De um modo geral, as MMPs são secretadas como zimogénios, correspondente à sua forma inativa, e são constituídas por um pro-domínio (pro-MMP) com cerca de 80 aminoácidos e um resíduo de cisteína, um domínio catalítico (CAT) com cerca de 170 aminoácidos que contém a região de ligação ao ião de zinco (Zn^{2+}), um domínio C-terminal de hemopexina (HPX) constituído por aproximadamente 200 aminoácidos e pela região *hinge*, que liga o domínio CAT ao domínio HPX. A sequência do domínio HPX é reconhecida pelo substrato, pelo que a ausência deste domínio impossibilita a degradação do colagénio, tal como ocorre na MMP-7, MMP-23 e MMP-26. A ligação do ião Zn^{2+} do domínio HPX ao resíduo de cisteína do pro-domínio resulta no estado de latência da enzima, sendo que para a sua ativação é necessária a remoção do pro-domínio de modo a expor o ião Zn^{2+} (Fanjul-fernández et al., 2010; Johnson, 1998; Klein & Bischoff, 2011; Nagase & Woessner, 1999; Ramnath & Creaven, 2004; Siefert & Sarkar, 2012)

2. Classificação das MMPs

Existem cerca de vinte e quatro tipos de metaloproteinases presentes no ser humano que devido às suas diferenças são agrupadas em seis grupos de acordo com a sequência que apresentam, com a organização do seu domínio e pela preferência do substrato: collagenases, gelatinases, estromelinas, matrilisinas, MMPs membranares e outras MMPs (Fanjul-fernández et al., 2010; Visse & Nagase, 2003).

2.1. Collagenases

Esta família engloba quatro metaloproteinases, sendo estas a MMP-1, MMP-8, MMP-13 e MMP-18 ou, respetivamente, collagenases 1, 2, 3 e 4. A principal característica das enzimas deste grupo é a sua capacidade para clivar o colagénio tipo I, II e III num local específico a $\frac{3}{4}$ do terminal-N, originando dois fragmentos de $\frac{3}{4}$ e $\frac{1}{4}$ de comprimento do original que rapidamente desnaturam à temperatura corporal e tornam-se suscetíveis à degradação por parte das gelatinases. A sua capacidade colagenolítica provém da cooperação entre os domínios de HPX e CAT, uma vez que a remoção do domínio HPX incapacita-as de degradar colagénio nativo (Fanjul-fernández et al., 2010; Klein & Bischoff, 2011; Lema & Armiento, 2006).



Figura 1. Estrutura básica da collagenases (adaptado de Tan & Liu, 2012)

2.2. Gelatinases

Este grupo é constituído pela MMP-2 e MMP-9 (colagenases A e B respetivamente) e degradam facilmente o colagénio desnaturado. A grande característica que as difere das outras famílias de MMPs é a presença de um domínio de três resíduos de fibronectina II inserido no domínio CAT, que lhes confere a capacidade para clivar um maior espetro de substratos, tais como colagénio (IV, V, VII, X, XI e XV), gelatina, elastina, proteoglicanos, fibronectina, laminina e fibrilina-1 (Fanjul-fernández et al., 2010; Klein & Bischoff, 2011; Lema & Armiento, 2006).

Estas enzimas inibem a degradação proteolítica da membrana dos vasos sanguíneos, permitindo assim a migração de células endoteliais que irão assim formar novos vasos, contribuindo deste modo para o crescimento tumoral e formação de metástases. (Klein & Bischoff, 2011)



Figura 2. Estrutura básica das gelatinases (adaptado de Tan & Liu, 2012)

2.3. Estromelisininas

As estromelisininas são constituídas pelas MMP-3, MMP-10 e MMP-11 (estromelisininas 1, 2 e 3 respetivamente) e apesar da sua capacidade na degradação de vários substratos, incluindo proteoglicanos, laminina, fibronectina, caseína, gelatina, colagénio tipo IV, IX e X, estas enzimas não conseguem degradar o colagénio nativo, uma vez que possuem uma constituição mais básica que as gelatinases. Participam também na ativação de algumas pro-MMPs devido à sua capacidade de remoção o pro-domínio (Fanjul-fernández et al., 2010; Klein & Bischoff, 2011; Lema & Armiento, 2006).

A estromelisinina 1 está implicada no desenvolvimento da artrite, da asma, da doença de Alzheimer e de vários tipos de cancros. Esta enzima é expressa pelas células do estroma durante o desenvolvimento da glândula mamária. A estromelisininas 2 possui uma grande semelhança com a MMP-3, tanto a nível estrutural como ao nível da especificidade para os substratos, apesar da MMP-3 apresentar uma maior eficiência enzimática. (Klein & Bischoff, 2011)

Existe ainda uma terceira estromelisinina, a MMP-11, que nalgumas literaturas é inserida no grupo das “Outras MMPs” uma vez que difere das restantes duas a nível sequencial e da especificidade para o substrato. (Fanjul-fernández et al., 2010)

2.4. Matrilisinas

Este grupo de metaloproteinases, constituído pela MMP-7 e MMP-26 (matrilisinas 1 e 2 respetivamente) apresenta uma particularidade que as difere das restantes, sendo esta a ausência do terminal carboxílico do domínio de hemopexina, apresentando apenas o domínio CAT ligado ao ião de zinco, resultando na sua incapacidade em degradar colagénio intactos. No entanto desempenham importantes funções de degradação de componentes da ECM, tais como colagénio tipo IV e laminina, assim como em moléculas da superfície celular como o fator de necrose pro-tumoral (no caso da matrilisinas 1). Estas enzimas, à semelhança das restantes acima mencionadas, têm sido detetadas em vários tipos de cancro (Fanjul-fernández et al., 2010; Lema & Armiento, 2006).

A matrilisina 1 é também capaz de clivar o pro-domínio da MMP-2 e da MMP-9 e é secretada pelas células epiteliais da glândula exócrina e está envolvida na remodelação do tecido uterino pós-parto, na imunidade inata e aterosclerose, estando também implicada em processos de inflamação, nomeadamente a nível da migração e neutrófilos através do epitélio (Klein & Bischoff, 2011; Lema & Armiento, 2006).

A MMP-26, ou matrilisina 2, possui uma maior limitação na capacidade em clivar substratos comparativamente com a matrilisina 1, sendo assim incapaz de degradar substratos como o colagénio, a laminina e a elastina. É expressa a nível do útero, rim e placenta e cliva substratos como a fibronectina e o fibrinogénio e atua na ativação da proMMP-9 em condições patológicas. Apresenta uma alteração estrutural única comparativamente às restantes MMPs, sendo esta a presença de um resíduo de histidina que conduz a um mecanismo de *switch* de cisteína não funcional e conseqüentemente à incapacidade em manter a conformação da pro-MMP no estado latente (Klein & Bischoff, 2011; Lema & Armiento, 2006).



Figura 3. Estrutura básica das matrilisinas (adaptado de Tan & Liu, 2012)

2.5. MMPs membranares

As metaloproteinases membranares possuem domínios de ligação à membrana e dividem-se em dois grupos, sendo que o primeiro engloba a MMP-14, a MMP-15, a MMP-16 e a MMP-24 (MT1, MT2, MT3 e MT5, respetivamente) e denominam-se de proteínas transmembranares tipo I, e o segundo grupo corresponde à MMP-17 e à MMP-25 (MT4 e MT6, respetivamente) e são designadas por proteínas ancoradas ao glicosilfosfatidilinositol (GPI) (Fanjul-fernández et al., 2010; Lema & Armiento, 2006).

O primeiro grupo é caracterizado pela presença de uma sequência hidrofóbica ligada a uma cauda citoplasmática que as conecta à membrana. São expressas em vários tecidos em condições fisiológicas, mas também em condições patológicas como o cancro. Sabe-se ainda que a MT1-MMP desempenha um importante papel na angiogénese e a sua elevada expressão está relacionada com o aumento da invasão celular. Do mesmo modo, o segundo grupo de MT-MMPs também se liga à membrana citoplasmática, mas contrariamente ao primeiro grupo essa ligação é feita por ancoragem a GPI's, por sua vez ligados ao domínio HPX (Fanjul-fernández et al., 2010; Klein & Bischoff, 2011).

Estas enzimas regulam funções de proliferação, diferenciação, migração e apoptose celular, sendo consideradas grandes mediadores de proteólise pericelular, e possuem a capacidade de ativar a proMMP-2 (à exceção da MMP-17).



Figura 4. Estrutura básica das MMPs tipo-membrana (adaptado de Tan & Liu, 2012)

2.6. Outras MMPs

Este grupo inclui as restantes MMPs que não se identificam com os restantes grupos e é composto pela MMP-12, MMP-19, MMP-20, MMP-21, MMP-22, MMP-23, MMP-27 e MMP-28 (Fanjul-fernández et al., 2010; Lema & Armiento, 2006).

3. Inibidores das metaloproteinases

A presença de inibidores das metaloproteinases de matriz é muito importante para a manutenção de um equilíbrio entre a degradação dos constituintes da ECM pelas MMPs e a sua renovação, uma vez que um excesso de atividade destas enzimas pode resultar em diversas patologias, como as descritas anteriormente (Amar, Fields, & Amar, 2016; Visse & Nagase, 2003).

Existem vários inibidores das metaloproteinases de matriz que se dividem em dois grupos: inibidores endógenos e inibidores exógenos, sendo que o primeiro grupo é ainda subdividido em inibidores específicos e não-específicos.

Os principais inibidores endógenos não-específicos das MMPs são a α_2 -macroglobulina e a α_1 -antiprotease, que inibem a maioria das proteinases por proteólise e posterior incorporação das mesmas no seu interior. A α_2 -macroglobulina é produzida no fígado e está presente no plasma sanguíneo e devido ao seu elevado tamanho apresenta algumas restrições de atividade (Baker, Edwards, & Murphy, 2002; Wojtowicz-praga, Dickson, & Hawkins, 1997).

Os inibidores tecidulares da atividade das MMPs (TIMPs) são inibidores específicos que ocorrem naturalmente no organismo. Até à data estão identificados quatro TIMPs nos vertebrados: TIMP-1, TIMP-2, TIMP-3 e TIMP-4. Estas proteínas estão presentes da ECM e a sua expressão é regulada durante o desenvolvimento e remodelação tecidual. São constituídos por dois domínios: um domínio N-terminal, que apresenta quatro resíduos de cisteína e é um potente inibidor por si só através da interação com o domínio CAT das MMPs; e um domínio C-terminal que estabelece ligação com o domínio de HPX das MMPs e apresenta ainda duas zonas de ligação enzimática distintas para a gelatinase-A e para a estromelina-1 (Visse & Nagase, 2003; Woessner, 1991; Wojtowicz-praga et al., 1997).

Todos os TIMPs possuem capacidade de inibição de todas as MMPs humanas descobertas até à data (à exceção do TIMP-1 relativamente à MT1-MMP) e ligam-se ao local de ligação ao zinco da enzima, formando complexos irreversíveis através de uma ligação não covalente de estequiometria equimolar. Estes inibidores atuam quer sobre MMPs ativadas, quer sobre o seu processo de ativação, e medeiam a proteólise dos componentes da ECM; deste modo, alterações a nível destes inibidores alteram

diretamente a atividade das enzimas, sendo uma condição muito importante em situações de alterações fisiológicas (Murphy & Docherty, 1992; Ramnath & Creaven, 2004; Visse & Nagase, 2003; Wojtowicz-praga et al., 1997).

Uma vez que estas enzimas estão na base de inúmeras doenças humanas, não só em doenças crônicas como também em agudas, surge a necessidade de desenvolver inibidores exógenos capazes de controlar a sua expressão, sendo ainda um desafio conseguir obter-se moléculas com alta seletividade para as MMPs, o que resulta em vários efeitos adversos e sendo a principal razão para a falha de muitos dos ensaios clínicos realizados. (Dormán et al., 2010)

Os inibidores das metaloproteinases devem ser capazes de competir com o local ativo das enzimas e possuir um grupo funcional capaz de estabelecer ligação ao íon zinco do domínio catalítico, cadeias laterais que se liguem aos diferentes subgrupos e uma estrutura que mimetize a dos substratos. (Dormán et al., 2010)

Inibidores peptidomiméticos mimetizam a estrutura do colagénio, ligando-se reversivelmente ao sítio ativo da enzima, por um processo de quelação com o íon de zinco, inativando-a. Existem vários compostos característicos deste grupo, incluindo carboxilatos, aminocarboxilatos, sulfidrilos e derivados do ácido fosfórico, sendo que a maioria são derivados do hidroxamato. Deste grupo de inibidores destacam-se o *Batimastat* e o *Marimastat* (Ramnath & Creaven, 2004).

O *Batimastat* é uma hidroxamato de baixo peso molecular e foi o primeiro inibidor das MMPs a ser desenvolvido e testado em ensaios clínicos, onde se concluiu não apresentar biodisponibilidade quando administrado por via oral devido à sua baixa solubilidade. No entanto, apesar de apresentar boas concentrações plasmáticas quando administrado por outras vias (intrapleural e intraperitoneal), possui baixa seletividade para as MMPs (Ramnath & Creaven, 2004; Wojtowicz-praga et al., 1997).

O *Marimastat* por outro lado, apresenta boa biodisponibilidade quando administrado por via oral. No entanto, apesar de ser bem tolerado pelo organismo, é necessária uma elevada dose para alcançar efeitos terapêuticos satisfatórios. É um hidroxamato com uma estrutura que mimetiza o colagénio e, tal com o *Batimastat*, apresenta baixa seletividade para estas enzimas (Ramnath & Creaven, 2004; Wojtowicz-praga et al., 1997).

Apesar dos inibidores acima referidos apresentarem ensaios clínicos favoráveis na redução de alguns cancros metastáticos, demonstram baixa especificidade para as MMPs, havendo a necessidade de sintetizar novos inibidores. Surgem assim os inibidores não peptídicos, com seletividades específicas para determinados grupos de MMPs relativas a uma dada patologia, que atuam ao nível da conformação do local ativo da enzima. O *BAY 12-9566* é um composto bifenílico que apresenta boa biodisponibilidade quando administrado por via oral e inibe de forma eficaz a MMP-2, a MMP-3 e a MMP-9, estando comprovado o seu efeito na redução da progressão tumoral. O composto *AG 3340*, para além das enzimas inibidas pelo composto anterior, produz também efeito inibitório sobre a MMP-13, apresentando da mesma forma resultados anti-tumorais. (Ramnath & Creaven, 2004)

Existem ainda inibidores derivados das tetraciclinas que inibem a atividade das collagenases 1 e 3, da estromelinas 1 e das gelatinases através do bloqueio da ativação das enzimas, redução da sua expressão e impedindo sua a degradação proteolítica que posteriormente resultaria na sua ativação. (Ramnath & Creaven, 2004)

4. As MMPs na restauração dentária

Os dentes são estruturas rijas presentes na boca e que possuem funções de acordo com a sua estrutura, sendo o objetivo comum transformar o alimento ingerido de modo a facilitar a digestão do mesmo. A dentição definitiva é constituída, em situações normais, por 32 dentes distribuídos em dois arcos, um superior e outro inferior, sendo que em cada um estão presentes dentes incisivos, cuja função é cortar os alimentos, dentes caninos que rasgam os alimentos e dentes molares responsáveis pela trituração. De um modo geral, todos são constituídos por uma ou duas raízes (no caso dos molares), que é responsável pela fixação do dente ao osso alveolar, e pela coroa que corresponde à parte exposta. Os dentes são revestidos por três diferentes camadas. Na polpa encontram-se inúmeros nervos e vasos sanguíneos, sendo esta estrutura responsável pela formação da dentina. O esmalte, constituído essencialmente por fosfato de cálcio e sendo uma substância muito resistente. (Zhang & Kern, 2009)

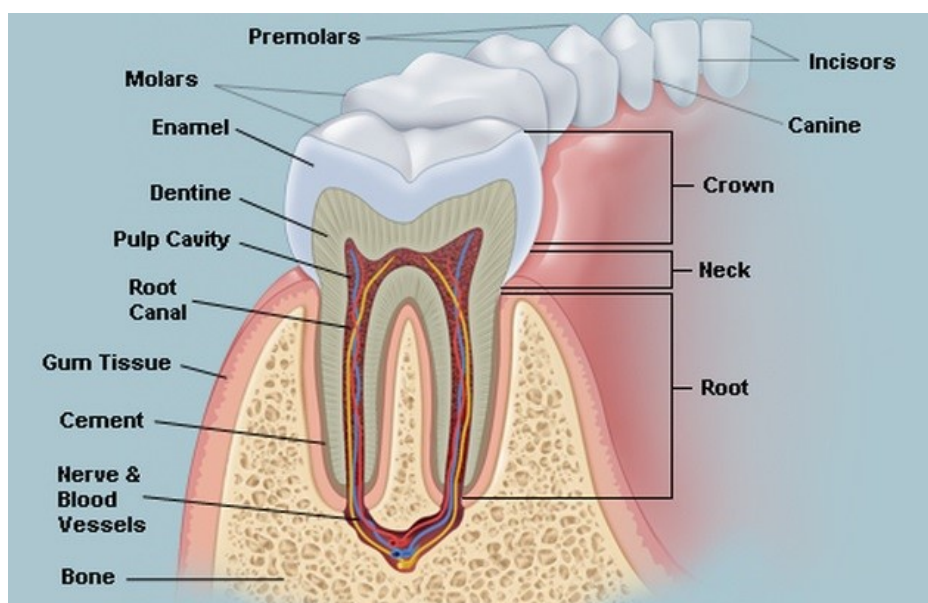


Figura 5. Estrutura do dente (adaptado de Matthew Hoffman, 2015)

A dentina é constituída essencialmente por 30% de tecido rico em colagénio, dos quais 90% corresponde a colagénio tipo I e 10% a proteínas não colagénicas, e cristais de hidroxiapatite inorgânica (70%), incorporados numa matriz extracelular. Durante a secreção dessa matriz, os odontoblastos produzem algumas MMPs, como a MMP-2, 9 e 3, que permanecem inativas e que contribuem para a normal formação da dentina,

podendo ficar presas na matriz calcificada devido à rápida mineralização da dentina. Com o avançar da idade e devido a fatores patológicos a composição da dentina pode sofrer alterações e poderão surgir cáries, que provocam a desmineralização dentária com consequente destruição. A intervenção bacteriana ajuda na progressão da cárie para a dentina, libertando ácidos orgânicos que solubilizam a hidroxiapatite devido à diminuição do pH, diminuição essa que é contrabalançada pela secreção de saliva. É de referir que a saliva contém várias proteases que podem também participar na degradação da matriz. Quando esse equilíbrio deixa de existir a cárie progride, resultando na exposição das MMPs presas à matriz e a sua posterior ativação devido ao ambiente ácido presente. A contínua secreção salivar torna o pH neutro, o que contribui para a atividade das enzimas que degradam assim a dentina exposta. Deste modo torna-se necessária intervenção médica de modo a travar a progressão da doença, uma vez que é naturalmente irreversível (Chaussain et al., 2013; Mazzoni et al., 2015; Salo, 2004; Tjäderhane et al., 2012; Zhang & Kern, 2009).

Na restauração das cáries dentárias são utilizadas resinas que se infiltram na dentina graças ao ácido fosfórico utilizado que se insere, formando a “camada híbrida”, permitindo a desmineralização da matriz da dentina. Esta camada é constituída por fibrinas de colagénio tipo I e proteoglicanos envolvidos por polímeros. A maioria dos adesivos tem propriedades adesivas suficientemente boas para contrariar a polimerização e estabelecem de imediato ligações fortes. No entanto, a duração da estabilidade desta ligação entre o adesivo e a dentina é incerto uma vez que estas ligações deteorizam com o tempo. Devido às propriedades ácidas destes adesivos, as enzimas presas na dentina podem ser ativadas, provocando a degradação das fibras de colagénio presentes na ligação estabelecida pela resina e diminuindo assim a duração da eficácia do tratamento (Mazzoni et al., 2015; Mazzoni, Scaffa, & Carrilho, 2012; Saboia et al., 2014; Zhang & Kern, 2009).

Capítulo II

1. Ensaio enzimático

O objetivo deste trabalho foi a realização de testes enzimáticos de modo a determinar o poder inibitório de novos inibidores.

Foi feita, por outros colegas, uma análise computacional de uma biblioteca de compostos de modo a determinar possíveis afinidades para as MMPs. Posteriormente foram destacados os mais promissores e a síntese química destes novos compostos inibidores foi efetuada na Faculdade de Ciências e Tecnologias da Universidade Nova de Lisboa por uma aluna dessa instituição.

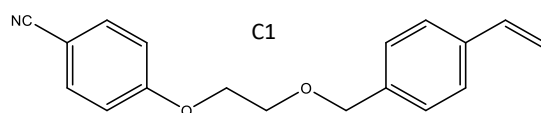


Figura 6. Estrutura do composto C1

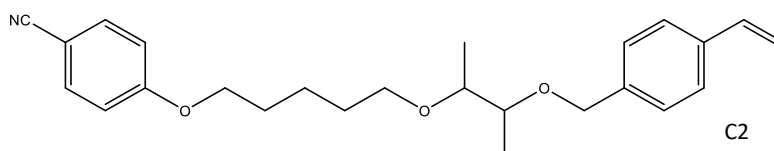


Figura 7. Estrutura do composto C2

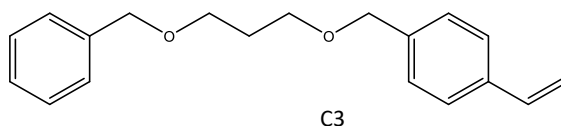


Figura 8. Estrutura do composto C3

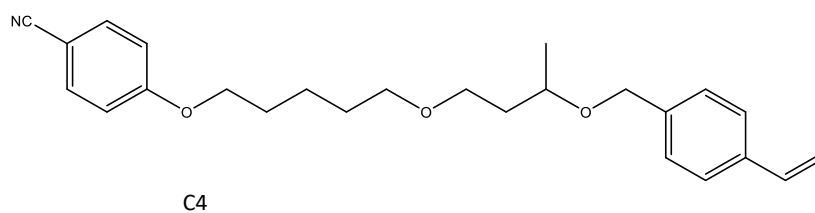


Figura 9. Estrutura do composto C4

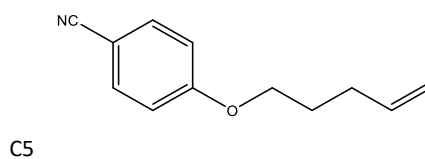


Figura 10. Estrutura do composto C5

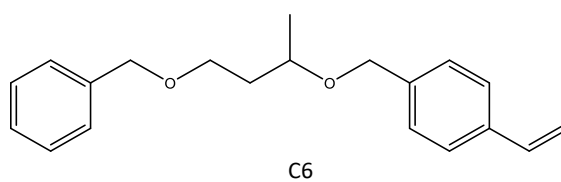


Figura 11. Estrutura do composto C6

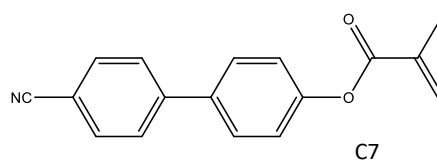


Figura 12. Estrutura do composto C7

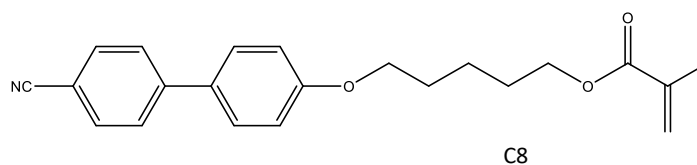


Figura 13. Estrutura do composto C8

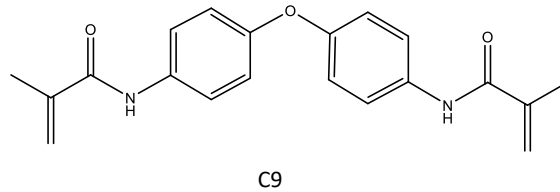


Figura 14. Estrutura do composto C9

Após a síntese, os compostos foram testados por ensaios imunoenzimáticos através do *MMP Inhibitor Profiling Kit, Colorimetric*, adquirido da *Enzo® Life Sciences*, desenhado para examinar a especificidade dos inibidores para as várias MMPs. Este kit é constituído por várias MMPs na forma humana recombinante (*Escherichia coli*), pelo substrato cromogénico a 25mM em DMSO, pelo inibidor comercial ácido N-isobutil-N-(4-metoxifenilsulfonil)glicil-hidroxâmico (NNGH), pelo o buffer e contém ainda uma microplaca com 96 poços.

Os ensaios foram realizados recorrendo a cinco enzimas, sendo estas a MMP-1, -2, -8, -9 e -13, uma vez que são as mais abundantes na dentina, e os inibidores sintetizados foram estudados a quatro concentrações diferentes: 1 mM, 0,1 mM, 0,05 mM e 0,01 mM, o que perfaz um total de quatro ensaios. Estas concentrações foram escolhidas de modo a evitar a possibilidade de ocorrer polimerização dos compostos para concentrações mais elevadas e o risco de não se verificar nenhum efeito inibitório a concentrações mais baixas.

Foi feita a preparação das soluções de inibidores diluindo sensivelmente 10mg de cada um numa solução de DMSO a 1%. As soluções das MMPs e substrato foram preparadas de acordo com a descrição do manual do kit e todas, inclusive as soluções dos inibidores, foram conservadas no gelo até a sua utilização e apenas foram retiradas aquando necessário de modo a evitar muitos ciclos de congelação/descongelação, tal como aconselhado no mesmo manual, uma vez que as enzimas são sensíveis a variações de temperatura.

De modo a otimizar as quantidades totais de inibidores, MMPs, buffer e substrato a utilizar e principalmente devido aos elevados custos de obtenção do kit, nomeadamente do substrato, foi elaborado um esquema da ordem de aplicação dos mesmos nos poços

das placas (em anexo) e realizado um pré-ensaio com corantes para se certificar que os materiais e a técnica utilizada estavam em perfeitas condições.

Para cada placa foi realizado um controlo de estabilidade substrato, de modo a verificar se o substrato se degrada ou não na ausência de outros reagentes, sendo que é esperada a ausência de cor amarela no poço correspondente; um controlo de atividade enzimática, esperando-se que as enzimas apresentem atividade na presença de substrato, degradando-o, sendo prevista uma cor amarela intensa no final do ensaio; e o controlo de interação substrato-inibidor para averiguar se existe algum tipo de interação entre o substrato e o composto em estudo, nomeadamente degradação do substrato e consequente cor do poço amarela. Não foi realizado nenhum controlo do inibidor comercial, uma vez que o objetivo destes ensaios foi testar os inibidores em estudo e não outros, acrescentando o fato do substrato ser o fator limitante e deste modo o seu gasto foi minimizado.

Para a realização do ensaio procedeu-se ao enchimento dos vários poços das placas respeitando a ordem de colocação dos componentes. Primeiramente adicionou-se o buffer, seguindo-se as várias MMPs e posteriormente o inibidor a testar, nos casos em que se aplicava. Por fim adicionou-se o substrato e logo de seguida colocou-se a microplaca no leitor de microplacas *Microplate Reader Benchmark* da *BioRad*, a um comprimento de onda de 415 nm e com incubação de 37°C, e procedeu-se à leitura da absorvância a cada minuto, durante 30 minutos, de forma a obter valores até à estabilização da reação.

Após a leitura das placas é possível observar a olho nu em que poços ocorreu degradação do substrato e a extensão dessa reação, devido à presença da cor amarela de diversas intensidades.

O substrato cromogénico consiste num tiopéptido de fórmula Ac-Pro-Leu-Gly-[2-mercapto-4-metil-pentanoil]-Leu-Gly-OC₂H₅ cuja estrutura molecular se encontra na figura 15.

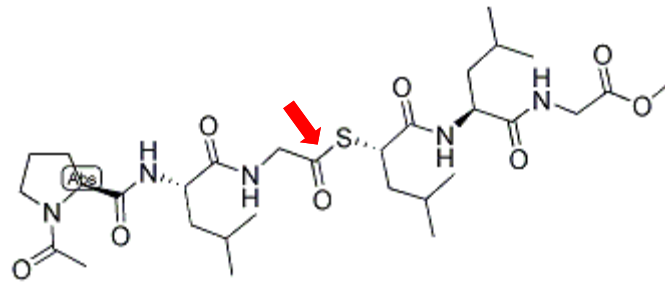


Figura 15. Estrutura molecular do substrato cromogénio utilizado no kit colorimétrico para a deteção da atividade inibitória, de fórmula Ac-Pro-Leu-Gly- [2-mercapto-4-metil-pentanoil]-Leu-Gly-OC₂H₅. A seta marca a ligação a ser hidrolisada

Na presença da enzima ocorre uma hidrólise da ligação peptídica no local de clivagem, substituindo-a por uma ligação do tipo tioéster, produzindo um grupo sulfidrílo, que por sua vez reage com o DNTB ([ácido 5,5'-ditiobis(2-nitrobenzóico)]).

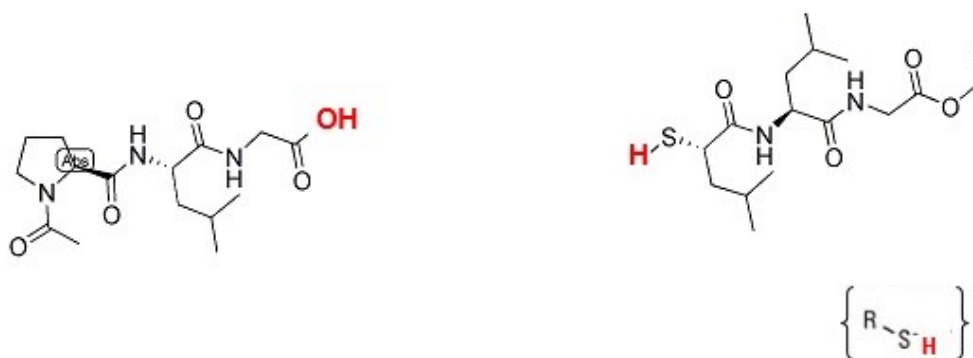


Figura 16. Estrutura molecular dos produtos da reação incluindo um tiol que irá reagir com o DTNB.

O DNTB é um composto presente no tampão Brij que quantifica os grupos sulfidrilos livres presentes numa amostra. formando-se uma mistura de ácido 2-nitro-5-tiobenzóico e dissulfureto, sendo que o primeiro composto emite luz amarela cuja absorvância é detetada a 412 nm.

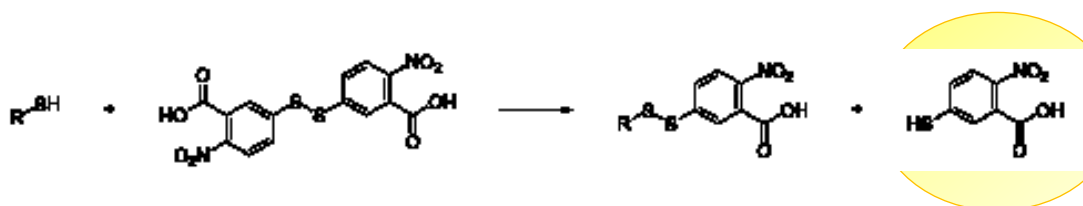


Figura 17. Estrutura molecular dos produtos da reação do tiol com o DTNB formando um produto corado (ácido 2-nitro-5-tiobenzóico)

2. Resultados e discussão

O objetivo da execução do ensaio em estudo foi apurar o poder inibitório dos inibidores em estudo relativamente à atividade das metaloproteinases de matriz. Para tal, e como já foi dito anteriormente, foram realizados quatro ensaios e testados os nove inibidores sintetizados. Pretende-se assim que estes inibidores possuam capacidade de inibir a conversão do substrato em produto no centro ativo das enzimas e que se forme um complexo entre estas e o inibidor, não ocorrendo a formação da cor amarela nos poços das placas.

Com os resultados obtidos de absorvância a 415nm *versus* tempo de incubação traçaram-se gráficos onde foram utilizados os pontos obtidos nos primeiros minutos antes da estabilização da reação, isto é, na zona onde o comportamento da reta é linear, de modo a obter um coeficiente de correlação linear próximo da unidade e uma vez que corresponde à zona onde a concentração de substrato é constante sendo assim possível determinar a velocidade zero (V_0) da reação através do declive da reta nesses pontos.

2.1. Controlo do substrato

Relativamente ao controlo do substrato, este foi realizado de modo a verificar se há ou não auto-degradação e é esperado assim um declive próximo de zero. Observando os resultados obtidos nas quatro placas é possível verificar que, no caso dos controlos de substrato 1 da placa 1 e substrato 2 da placa 2 os valores de absorvância obtidos foram muito superiores comparativamente aos restantes controlos de substrato. Uma vez que os restantes controlos presentes nas mesmas placas (substrato 2 da placa 1 e substrato 1 da placa 2), esta discrepância pode resultar da presença de impurezas nesses poços das placas; caso contrário, os restantes resultados dessas placas também deveriam apresentar-se alterados. No entanto, uma vez que estes valores são muito inferiores aos obtidos nos testes de inibição enzimática e os declives são próximos do esperado, podemos concluir que o substrato é estável.

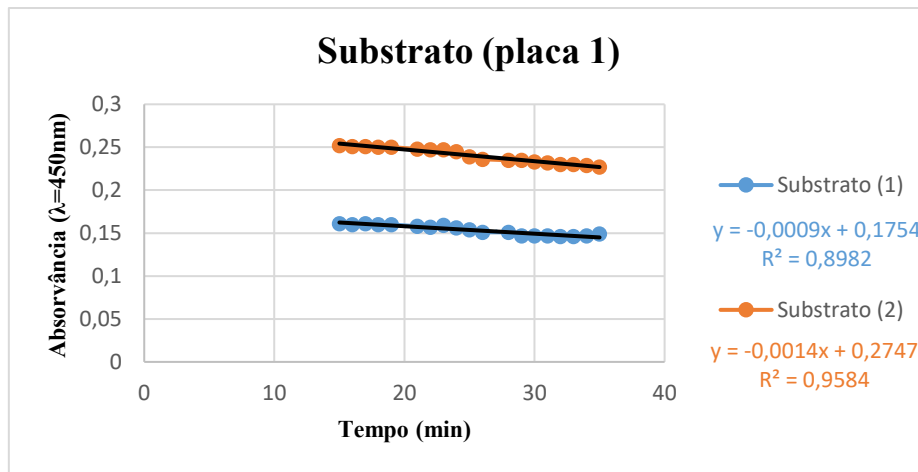


Figura 18. Gráfico do controle de estabilidade do substrato da placa 1

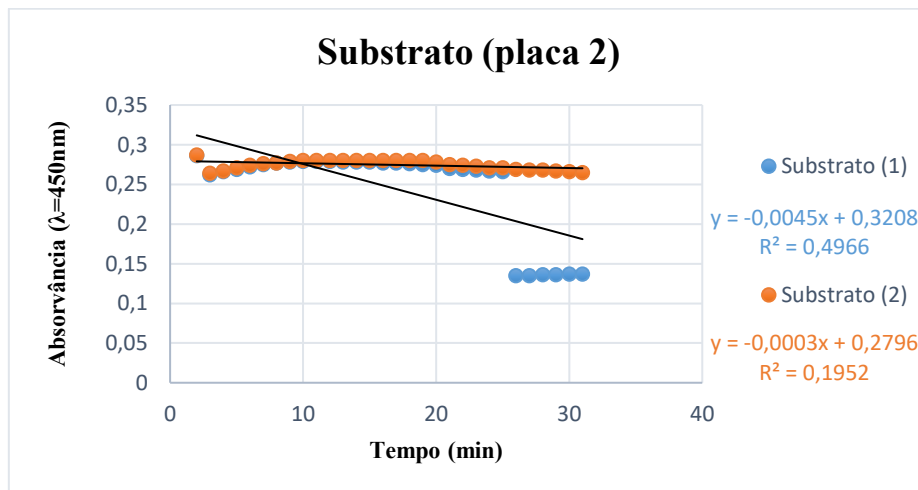


Figura 19. Gráfico do controle de estabilidade do substrato da placa 2

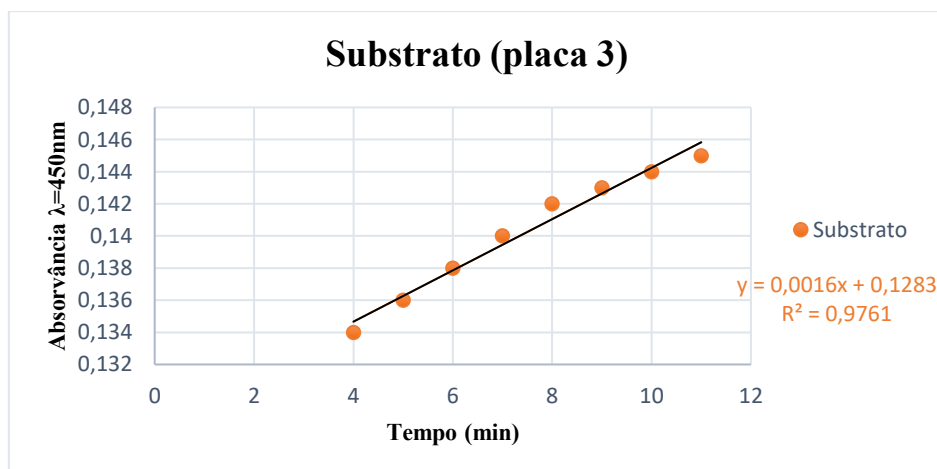


Figura 20. Gráfico do controle de estabilidade do substrato da placa 3

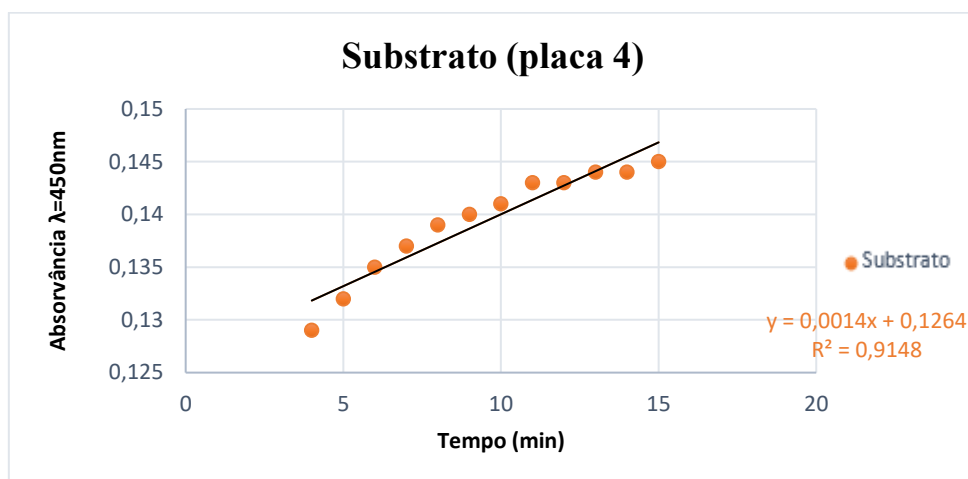


Figura 21. Gráfico do controlo de estabilidade do substrato da placa 4

2.2. Controlo da interação substrato-enzimas

Nos controlos de interação entre o substrato e as enzimas em estudo são esperados valores de absorvância altos, indicativos de que as enzimas se encontram ativas. Uma vez que estas enzimas são sensíveis a variações de temperatura, foram realizados apenas dois ciclos de congelação/descongelação de modo a minimizar possíveis alterações na sua atividade.

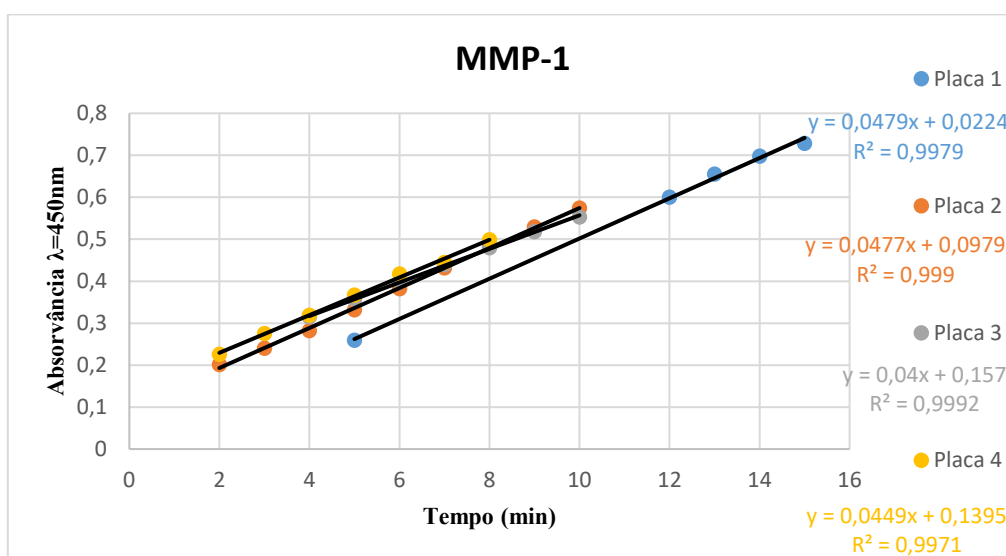


Figura 22. Gráfico da velocidade inicial para a MMP-1 nas placas 1, 2, 3 e 4

Após análise dos resultados obtidos podemos concluir que, para a situação da MMP-1, houve degradação do substrato por parte desta enzima em todas as placas e todas apresentam declives muito próximos, o que significa que a velocidades iniciais são semelhantes.

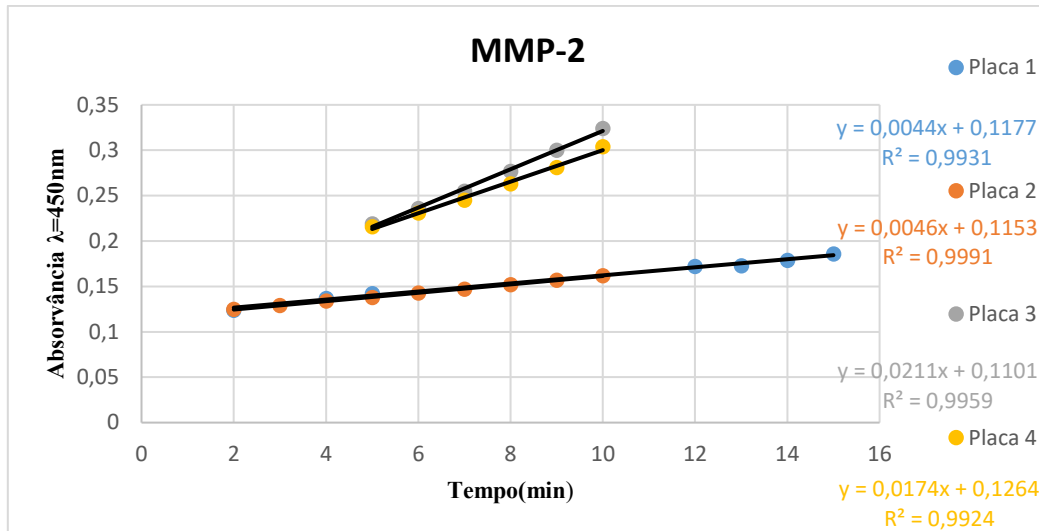


Figura 23. Gráfico da velocidade inicial para a MMP-2 nas placas 1, 2, 3 e 4

Relativamente à MMP-2 houve discrepância entre algumas placas, sendo que as placas 1 e 2 apresentam valores de absorvância e velocidades iniciais menores, comparativamente às placas 3 e 4. Deste modo conclui-se que na primeira situação não se alcançou o estado estacionário, enquanto que no segundo caso isso foi concretizado com grande rapidez.

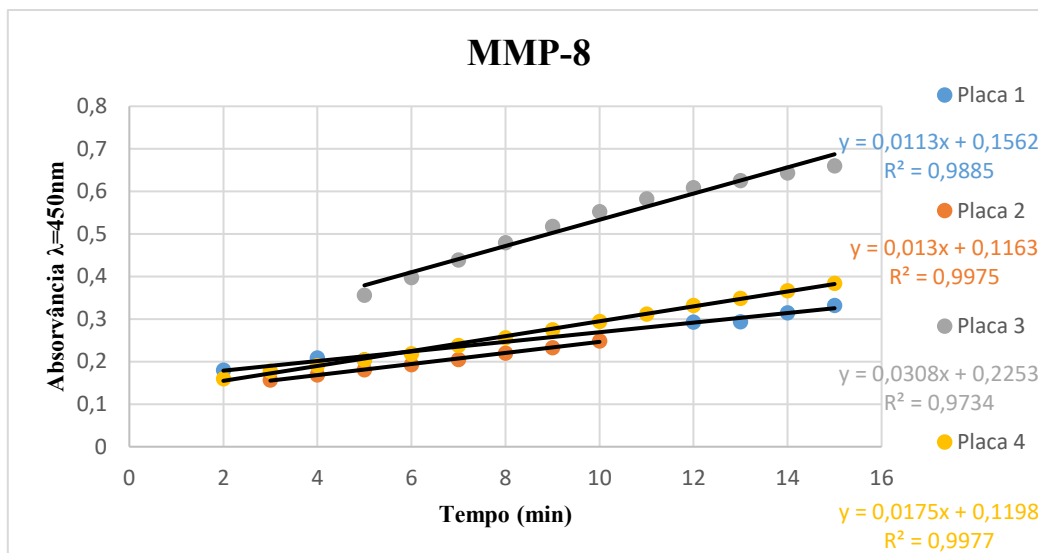


Figura 24. Gráfico da velocidade inicial para a MMP-8 nas placas 1, 2, 3 e 4

A MMP-8, contrariamente às restantes, apresenta valores de absorvância altos, principalmente na placa 3, o que se poderá novamente traduzir na presença de impurezas nestes poços que aumentam os valores de absorvância lidos pelo aparelho. Apesar de apresentar atividade em todas as placas, atingiu o estado estacionário a velocidades diferentes, tendo estabilizado mais rapidamente na placa 3 e mais lentamente na placa 2.

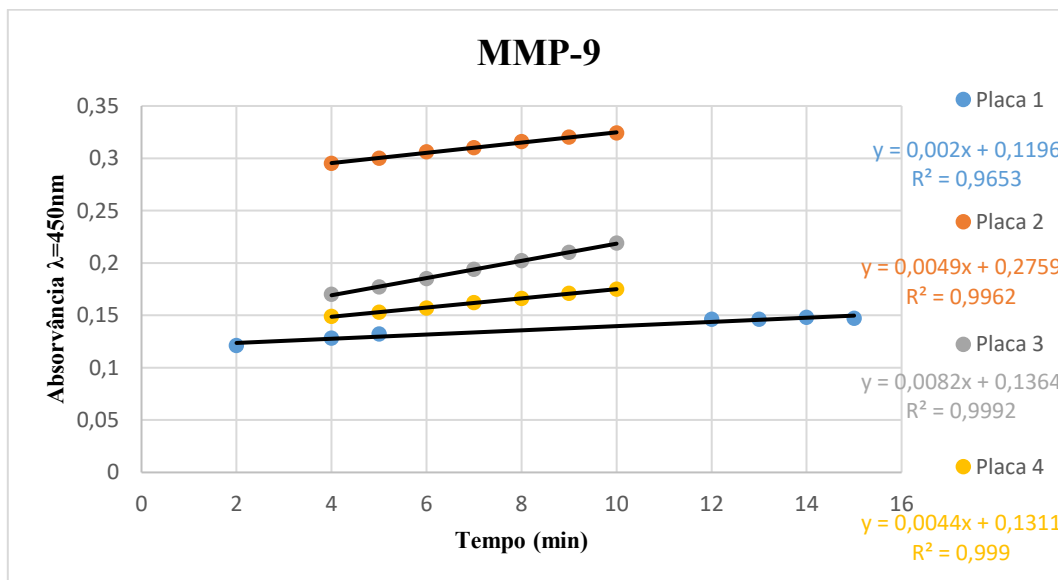


Figura 25. Gráfico da velocidade inicial para a MMP-9 nas placas 1, 2, 3 e 4

A MMP-9 não apresentou atividade enzimática na placa 1, apresentando valores de absorvância muito baixos. Deste modo não houve degradação do substrato nesse poço, podendo-se deduzir que a enzima estar inativada no próprio kit. No entanto esta demonstrou alguma atividade nas restantes placas, ainda que não atingisse o estado estacionário, e conta ainda com atividade nos ensaios de inibição da mesma placa, pelo que não se sabe ao certo a razão da sua inativação.

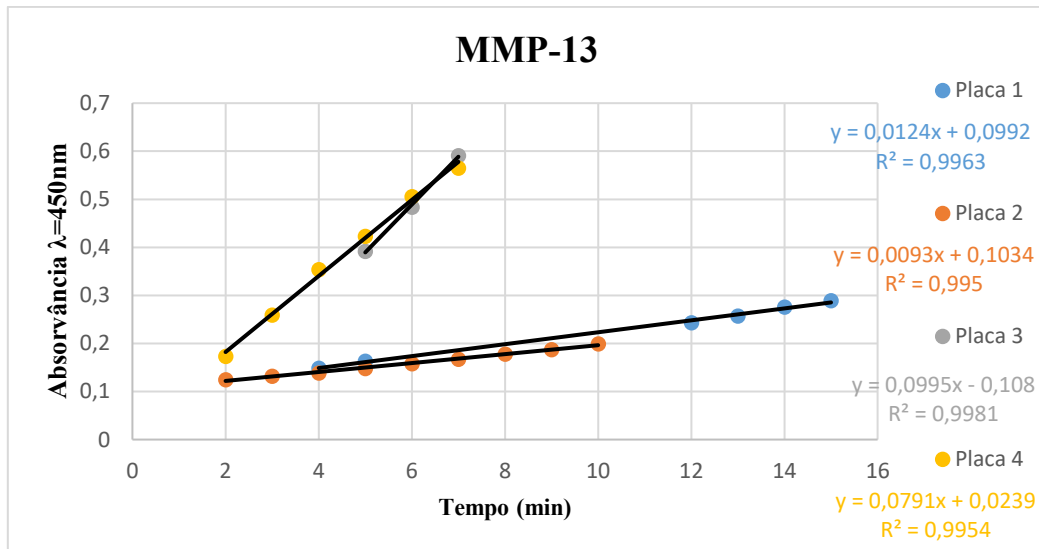


Figura 26. Gráfico da velocidade inicial para a MMP-13 nas placas 1, 2, 3 e 4

Semelhante à MMP-2, a MMP-13 apresenta dois conjuntos distintos de resultados. Relativamente às placas 1 e 2, estas apresentaram valores de absorvância menores comparativamente às restantes placas, e do mesmo modo, não atingiram o estado estacionário. Por outro lado, nas placas 3 e 4 os valores de absorvância foram muito superiores, apresentando maiores valores de velocidade inicial e consequentemente atingindo mais rapidamente o estado estacionário.

2.3. Controlo da interação substrato-inibidor

Analisando os gráficos obtidos do controlo da interação entre o substrato e o inibidor sintetizado, verifica-se que os declives das retas apresentam declives próximos de zero, o que significa que não houve interação entre os dois componentes. Relativamente aos valores de absorvância, todos os resultados apresentam valores baixos,

suportando a afirmação anterior.

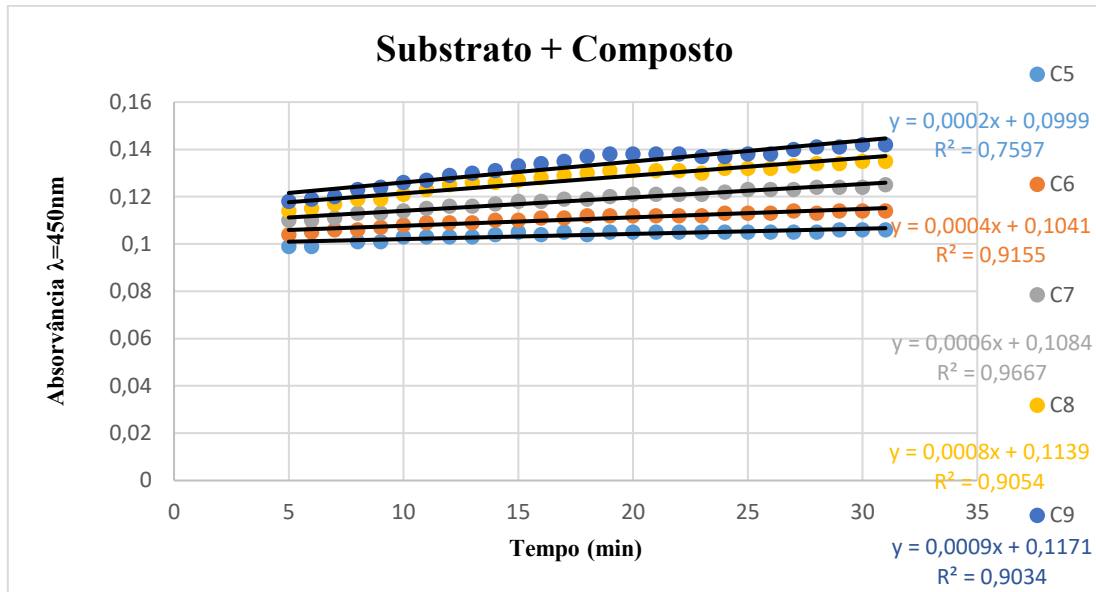


Figura 27. Gráfico de interação entre o substrato e os compostos C5, C6, C7, C8 e C9

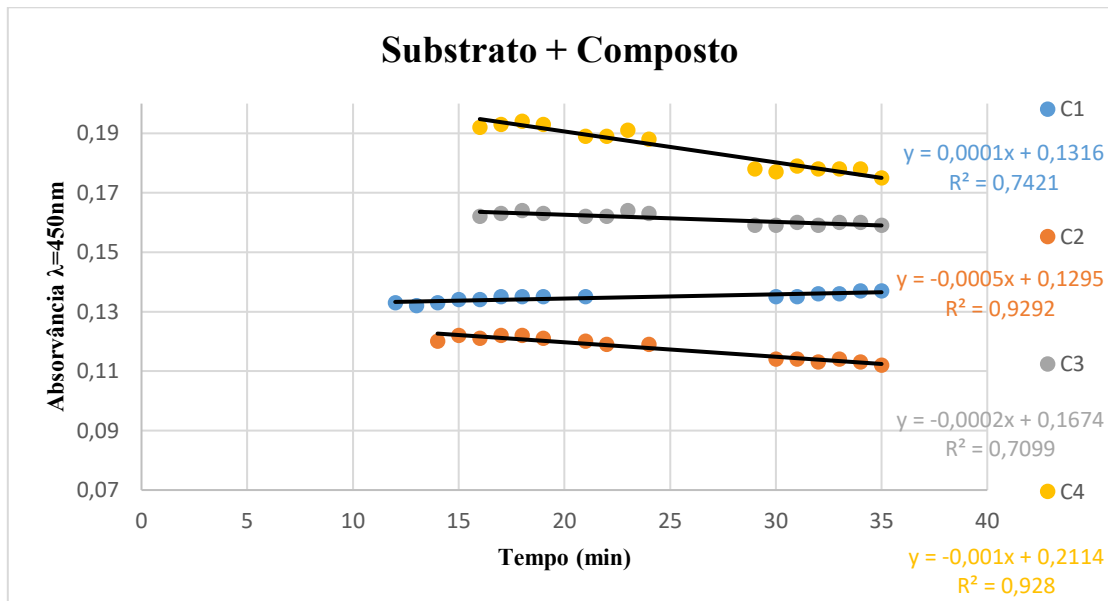


Figura 28. Gráfico de interação entre o substrato e os compostos C1, C2, C3 e C4

2.4. Determinação da velocidade inicial

A velocidade inicial de atividade das MMPs corresponde ao declive da reta de controlo de cada enzima, obtendo-se os resultados apresentados nas tabelas seguintes. Relativamente aos inibidores a testar, procedeu-se de igual forma para a obtenção da velocidade, ou seja, seleccionou-se uma área linear do gráfico de absorvância em função do tempo constituída pelos pontos obtidos nos primeiros minutos.

Tabela 1. Velocidades iniciais (mOD/min) determinadas para cada enzima e composto da placa 1

Vo (OD/min)	MMP-1	MMP-2	MMP-8	MMP-9	MMP-13
	4,79E-02	4,40E-03	1,13E-02	2,00E-03	1,24E-02
C1 1mM	3,42E-02	4,30E-03	1,00E-02	2,90E-03	1,40E-02
C1 0,1mM	3,46E-02	4,10E-03	1,05E-02	3,00E-03	1,50E-02
C2 1mM	3,41E-02	4,00E-03	1,01E-02	2,90E-03	1,34E-02
C2 0,1mM	3,57E-02	4,46E-03	1,07E-02	3,70E-03	1,48E-02
C3 1mM	3,19E-02	4,20E-03	1,15E-02	1,50E-03	1,24E-02
C3 0,1mM	3,83E-02	5,00E-03	1,26E-02	4,00E-03	1,43E-02
C4 1mM	3,51E-02	6,30E-03	1,27E-02	5,80E-03	1,91E-02
C4 0,1mM	3,08E-02	6,00E-03	1,49E-02	6,80E-03	1,68E-02

Comparando a velocidade de cada inibidor com ao valor de referência das MMPs observa-se que, para a MMP-1 todos os inibidores, em ambas as concentrações, têm capacidade de reduzir a atividade enzimática da enzima uma vez que apresentam velocidades iniciais inferiores à velocidade inicial da MMP-1. Por outro lado, praticamente todos os inibidores possuem velocidade inicial superior ao valor de referência da MMP-13, com exceção do C3 à concentração de 1mM. Em relação à MMP-2, os compostos C1 a 1mM e a 0,1mM, o C2 a 1mM e o C3 a 1mM possuem velocidades iniciais inferiores ao valor de referência, enquanto que nos restantes compostos verifica-se o oposto. Para a MMP-8, os compostos apresentam velocidades iniciais muito próximas do valor de referência, sendo que o C1 e o C2 em ambas as concentrações apresentam capacidade inibitória e os restantes não. Por fim, em relação à MMP-9, a

maioria dos compostos apresenta velocidade inicial superior ao valor de referência, tendo nestas situações ocorrido um processo de ativação da enzima.

Tabela 2. Velocidades iniciais (mOD/min) determinadas para cada enzima e composto da placa 2

Vo (OD/min)	MMP-1	MMP-2	MMP-8	MMP-9	MMP-13
	4,77E-02	4,60E-03	1,30E-02	4,90E-03	9,30E-03
C5 1mM	4,11E-02	3,90E-03	1,65E-02	2,90E-03	1,45E-02
C5 0,1mM	4,49E-02	4,50E-03	9,50E-03	3,00E-03	1,02E-02
C6 1mM	4,96E-02	4,40E-03	9,30E-03	3,00E-03	9,70E-03
C6 0,1mM	4,59E-02	4,10E-03	9,50E-03	3,00E-03	9,90E-03
C7 1mM	4,68E-02	3,50E-03	9,30E-03	2,60E-03	1,20E-02
C7 0,1mM	4,47E-02	4,70E-03	1,14E-02	2,60E-03	9,20E-03
C8 1mM	4,68E-02	4,30E-03	9,10E-03	2,80E-03	1,09E-02
C8 0,1mM	4,64E-02	4,20E-03	7,90E-03	3,00E-03	9,10E-03
C9 1mM	4,77E-02	4,40E-03	1,00E-02	4,00E-03	1,16E-02
C9 0,1mM	4,71E-02	5,20E-03	6,00E-03	3,80E-03	3,34E-02

Relativamente à placa 2, de um modo geral quase todos os inibidores a testar apresentaram velocidades iniciais inferiores ao valor de referência da respetiva MMP, exceto os compostos C6 e C9 na concentração de 1mM para a MMP-1, os compostos C7 e C9 a 0,1 mM para a MMP-2, o composto C5 a 1mM para a MMP-8. Quase todos os compostos apresentaram valores de velocidade inicial superior ao valor de referência para a MMP-13, à exceção dos compostos C7 e C9 a 0,1mM que apresentaram capacidade inibitória para esta enzima uma vez que os seus valores de velocidade são inferiores à referência.

Tabela 3. Velocidades iniciais (mOD/min) determinadas para cada enzima e composto da placa 3

Vo (OD/min)	MMP-1	MMP-2	MMP-8	MMP-9	MMP-13
	4,00E-02	2,11E-02	3,08E-02	8,20E-03	9,95E-02
C1 0,05mM	2,95E-02	1,50E-02	1,35E-02	4,20E-03	5,23E-02
C1 0,01mM	2,97E-02	2,05E-02	1,30E-02	3,20E-03	4,11E-02
C2 0,05mM	2,63E-02	1,73E-02	1,46E-02	4,10E-03	6,64E-02
C2 0,01mM	2,97E-02	1,38E-02	1,86E-02	3,80E-03	3,52E-02
C3 0,05mM	3,02E-02	1,88E-02	1,70E-02	4,50E-03	6,84E-02
C3 0,01mM	3,15E-02	1,59E-02	1,45E-02	3,90E-03	5,57E-02
C4 0,05mM	3,27E-02	1,96E-02	8,20E-03	6,70E-03	5,22E-02
C4 0,01mM	3,35E-02	2,13E-02	1,99E-02	4,10E-03	4,88E-02
C5 0,05mM	3,70E-02	2,43E-02	1,94E-02	7,90E-03	4,95E-02
C5 0,01mM	3,52E-02	2,22E-02	1,62E-02	6,00E-03	4,92E-02

Os resultados da placa 3 pouco divergiram, sendo que, à exceção dos composto C4 a 0,01mM, C5 em ambas as concentrações para a MMP-2 e o composto C4 a 0,05mM para a MMP-8, todos apresentaram velocidades iniciais inferiores aos valores de referência, o que se traduz na capacidade destes inibidores em inibir estas enzimas.

Tabela 4. Velocidades iniciais (mOD/min) determinadas para cada enzima e composto da placa 4

Vo (OD/min)	MMP-1	MMP-2	MMP-8	MMP-9	MMP-13
	4,49E-02	1,74E-02	1,75E-02	4,40E-03	7,91E-02
C6 0,05mM	3,01E-02	2,33E-02	1,59E-02	4,10E-03	5,61E-02
C6 0,01mM	2,97E-02	2,35E-02	1,71E-02	4,20E-03	4,55E-02
C7 0,05mM	2,63E-02	2,15E-02	1,69E-02	4,30E-03	6,55E-02
C7 0,01mM	3,23E-02	2,09E-02	1,59E-02	4,30E-03	5,69E-02
C8 0,05mM	2,71E-02	1,92E-02	1,60E-02	4,10E-03	7,00E-02
C8 0,01mM	3,02E-02	1,93E-02	1,66E-02	3,90E-03	5,08E-02
C9 0,05mM	2,11E-02	2,12E-02	1,83E-02	4,50E-03	6,64E-02
C9 0,01mM	2,74E-02	2,11E-02	1,61E-02	4,60E-03	6,50E-02

No ensaio realizado na placa 4 não houve nenhum composto que apresentasse um valor de velocidade inicial inferior ao valor de referência da MMP-2 e, portanto, nenhum

destes compostos apresenta capacidade inibitória sobre esta enzima. Do mesmo modo, o composto C9 a 0,05mM e em ambas as concentrações não apresentou o mesmo efeito sobre a MMP-8 e MMP-9, respetivamente. Os restantes compostos apresentaram efeito inibitório sobre as enzimas, uma vez que se observa valores de velocidade inferiores à referência.

Após a determinação das velocidades iniciais de cada composto, determinou-se a percentagem de atividade enzimática remanescente de cada enzima após interação com o respetivo inibidor, nas quatro concentrações testadas. Para a obter o valor da atividade remanescente utilizou-se a seguinte fórmula:

$$\% \text{ atividade inibitória} = \frac{V \text{ composto inibidor}}{V \text{ controlo}} \times 100\%$$

Considera-se que a atividade máxima da enzima corresponde a 100% e que um bom inibidor induz uma descida dessa atividade em pelo menos 50%.

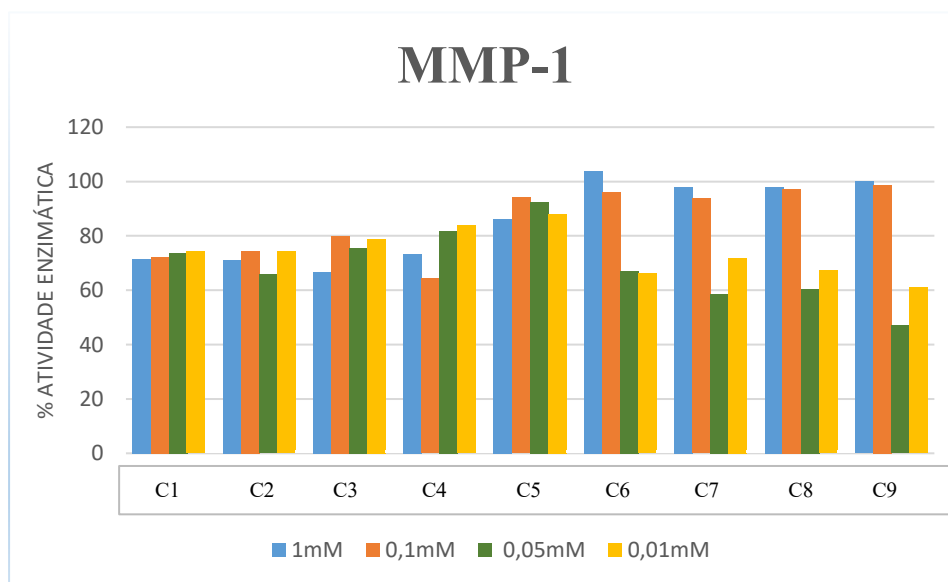


Figura 29. Gráfico da atividade enzimática da MMP-1 na presença dos compostos em estudo.

Analisando o gráfico de atividade remanescente da MMP-1 na presença dos vários inibidores verifica-se que a maioria exerce efeito inibitório sobre esta enzima, sendo que o composto que apresentou uma maior percentagem de inibição foi o C9 a 0,05mM, com uma percentagem de inibição superior a 50%, seguindo-se do C7 e C8 nas

mesmas concentrações. De um modo geral, a diminuição da atividade desta enzima é mais acentuada pela interação com os compostos das placas 3 e 4 do que pelas restantes. Houve ainda um composto que aumentou a atividade desta enzima, ainda que num valor baixo, sendo este o C6 a 1mM. Noutras situações não houve alteração da atividade máxima da enzima, como no caso da interação desta com os compostos C7, C8 e C9 a 1mM.

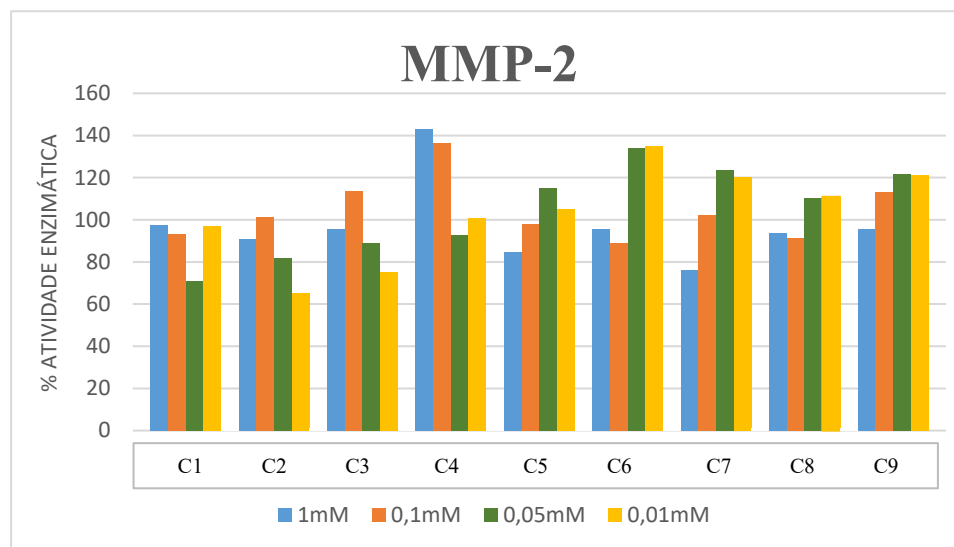


Figura 30. Gráfico da atividade enzimática da MMP-2 na presença dos compostos em estudo.

Para a MMP-2 ocorreram mais oscilações nos resultados obtidos. Por um lado, não houve nenhum composto que inibisse a enzima numa ordem superior a 50%, mas nalguns casos houve uma diminuição acentuada da atividade da enzima, sendo estes a interação resultante com os compostos C1 a 0,05mM, C2 a 0,01mM e C7 a 1mM. Ao contrário da situação anterior, houveram bastantes compostos que aumentaram a atividade remanescente da enzima, surgindo a hipótese de serem ativadores enzimáticos para a MMP-2, sendo estes o C3 a 0,1mM, o C4 a 1mM e 0,1mM e o C6 a 0,05mM e 0,01mM. Os compostos C2, C5 e C7 a 0,1mM demonstraram não exercer alterações na atividade da mesma.

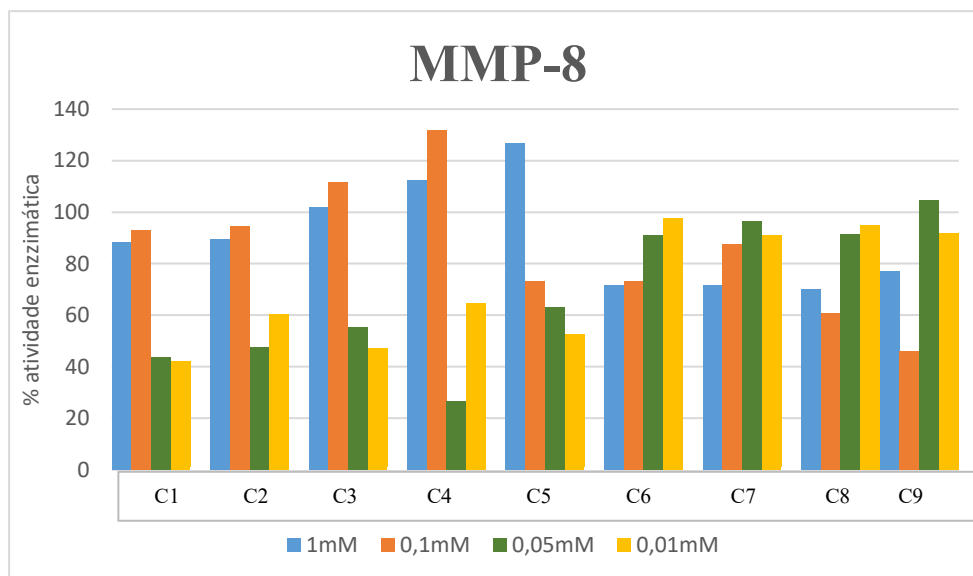


Figura 31. Gráfico da atividade enzimática da MMP-8 na presença dos compostos em estudo.

A enzima MMP-8 apresentou grandes alterações na presença de alguns compostos, sendo a grande maioria potenciais inibidores da mesma. Houve vários compostos que induziram diminuição da atividade remanescente da MMP-8 superior a 50%, como o C1 a 0,05mM e a 0,01mM, o C2 e C4 a 0,05mM, o C3 e C9 a 0,01mM. Há ainda alguns inibidores que, mais uma vez, aumentaram a atividade enzimática, sendo este o caso do C3 e C4 a 1mM e a 0,1mM, o C5 a 1mM e o C9 a 0,05mM. Os restantes compostos inibiram a enzima de forma favorável, ainda que em menores concentrações, como se verifica no caso dos compostos C2, C4, C5 e C8 a 0,01mM e o C3 a 0,05mM.

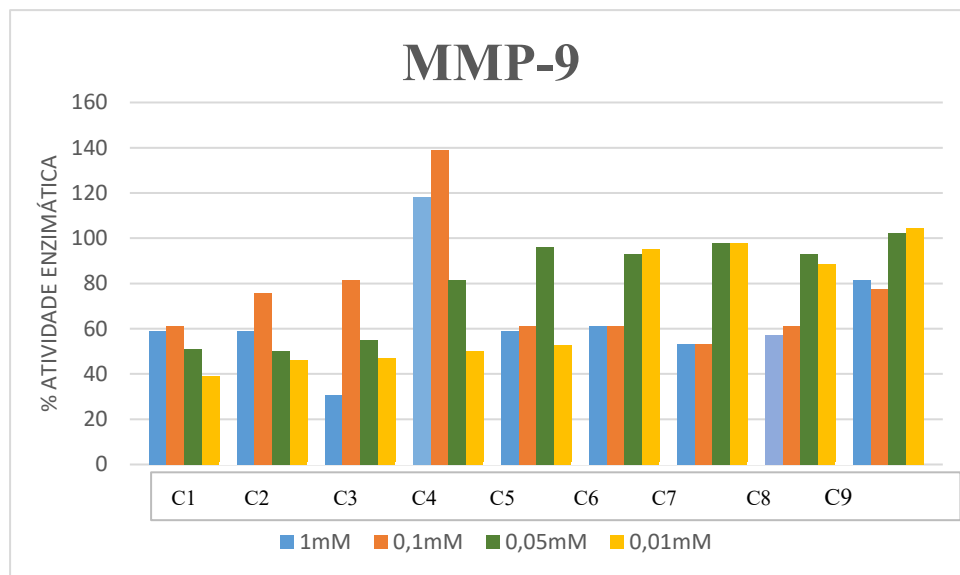


Figura 32. Gráfico da atividade enzimática da MMP-9 na presença dos compostos em estudo.

Relativamente à interação entre os inibidores a testar e a MMP-9, os resultados são, de um modo geral, bastante positivos, ainda que tenha ocorrido aumento da atividade remanescente da enzima para as concentrações de 1mM e 0,1mM do composto C4. Houve diminuição da atividade enzimática acima de 50% pelos compostos C1, C2, C3 e C4 a 0,01mM, e inativação na ordem dos 40% pelos compostos C1, C5, C6, C7 e C8 a 1mM e 0,1mM, C2 a 1mM, C3 a 0,05mM e pouca alteração na atividade da enzima pelos compostos C6, C7 e C8 a 0,05mM e a 0,01mM.

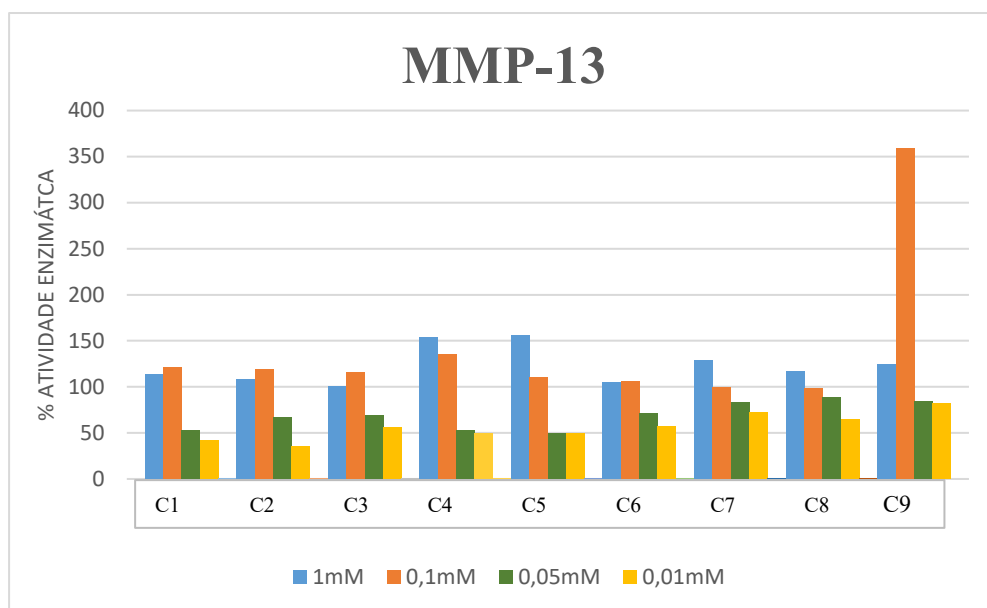


Figura 33. Gráfico da atividade enzimática da MMP-13 na presença dos compostos em estudo

Por fim, houve uma grande discrepância do composto C9 em relação aos restantes na interação com a enzima MMP-13, havendo um aumento da atividade desta para cerca de 350% e contrariando o efeito esperado. Pode-se afirmar que os compostos relativos às placas 3 e 4 apresentaram maior percentagem de inibição comparativamente às placas 1 e 2, semelhante ao que aconteceu com a enzima MMP-1. Houve uma diminuição da atividade remanescente da enzima na ordem dos 50% pelos compostos C1, C4, C5 a 0,05mM e a 0,01mM e C3, C6 e C8 a 0,01mM. Para além do composto C9, também os compostos C4 a 1mM e 0,1mM e C5 a 1mM aumentaram a atividade desta enzima.

Considera-se ainda que a percentagem de inibição enzimática corresponde à subtração da percentagem de atividade máxima da enzima (100%) pela atividade remanescente, estando o resultado presente nas tabelas seguintes.

Tabela 5. Percentagem de inibição enzimática das várias enzimas pelo composto C1

	% inibição enzimática				
	MMP-1	MMP-2	MMP-8	MMP-9	MMP-13
C1 1mM	28,601	2,273	11,504	40,816	-12,903
C1 0,1mM	27,766	6,818	7,080	38,776	-20,968
C1 0,05mM	26,250	28,910	56,169	48,780	47,437
C1 0,01mM	25,750	2,844	57,792	60,976	58,693

Tabela 6. Percentagem de inibição enzimática das várias enzimas pelo composto C2

	% inibição enzimática				
	MMP-1	MMP-2	MMP-8	MMP-9	MMP-13
C2 1mM	28,810	9,091	10,619	40,816	-8,065
C2 0,1mM	25,470	-1,364	5,310	24,490	-19,355
C2 0,05mM	34,250	18,009	52,597	50,000	33,266
C2 0,01mM	25,750	34,597	39,610	53,659	64,623

Tabela 7. Percentagem de inibição enzimática das várias enzimas pelo composto C3

	% inibição enzimática				
	MMP-1	MMP-2	MMP-8	MMP-9	MMP-13
C3 1mM	33,403	4,545	-1,770	69,388	0,000
C3 0,1mM	20,042	-13,636	-11,504	18,367	-15,323
C3 0,05mM	24,500	10,900	44,805	45,122	31,256
C3 0,01mM	21,250	24,645	52,922	52,439	44,020

Tabela 8. Percentagem de inibição enzimática das várias enzimas pelo composto C4

	% inibição enzimática				
	MMP-1	MMP-2	MMP-8	MMP-9	MMP-13
C4 1mM	26,722	-43,182	-12,389	-18,367	-54,032
C4 0,1mM	35,699	-36,364	-31,858	-38,776	-35,484
C4 0,05mM	18,250	7,109	73,377	18,293	47,538
C4 0,01mM	16,250	-0,948	35,390	50,000	50,955

Tabela 9. Percentagem de inibição enzimática das várias enzimas pelo composto C5

	% inibição enzimática				
	MMP-1	MMP-2	MMP-8	MMP-9	MMP-13
C5 1mM	13,836	15,217	-26,923	40,816	-55,914
C5 0,1mM	5,870	2,174	26,923	38,776	-9,677
C5 0,05mM	7,500	-15,166	37,013	3,659	50,251
C5 0,01mM	12,000	-5,213	47,403	26,829	50,553

Tabela 10. Percentagem de inibição enzimática das várias enzimas pelo composto C6

	% inibição enzimática				
	MMP-1	MMP-2	MMP-8	MMP-9	MMP-13
C6 1mM	-3,983	4,348	28,462	38,776	-4,301
C6 0,1mM	3,774	10,870	26,923	38,776	-6,452
C6 0,05mM	32,962	-33,908	9,143	6,818	29,077
C6 0,01mM	33,853	-35,057	2,286	4,545	42,478

Tabela 11. Percentagem de inibição enzimática das várias enzimas pelo composto C7

	% inibição enzimática				
	MMP-1	MMP-2	MMP-8	MMP-9	MMP-13
C7 1mM	1,887	23,913	28,462	46,939	-29,032
C7 0,1mM	6,289	-2,174	12,308	46,939	1,075
C7 0,05mM	41,425	-23,563	3,429	2,273	17,193
C7 0,01mM	28,062	-20,115	9,143	2,273	28,066

Tabela 12. Percentagem de inibição enzimática das várias enzimas pelo composto C8

	% inibição enzimática				
	MMP-1	MMP-2	MMP-8	MMP-9	MMP-13
C8 1mM	1,887	6,522	30,000	42,857	-17,204
C8 0,1mM	2,725	8,696	39,231	38,776	2,151
C8 0,05mM	39,644	-10,345	8,571	6,818	11,504
C8 0,01mM	32,739	-10,920	5,143	11,364	35,777

Tabela 13. Percentagem de inibição enzimática das várias enzimas pelo composto C9

	% inibição enzimática				
	MMP-1	MMP-2	MMP-8	MMP-9	MMP-13
C9 1mM	0,000	4,348	23,077	18,367	-24,731
C9 0,1mM	1,258	-13,043	53,846	22,449	-259,140
C9 0,05mM	53,007	-21,839	-4,571	-2,273	16,056
C9 0,01mM	38,976	-21,264	8,000	-4,545	17,826

3. Conclusão

O objetivo da realização deste trabalho foi determinar a capacidade inibitória de nove compostos sintetizados a quatro concentrações diferentes, relativamente à atividade de cinco MMPs.

As MMPs constituem uma família de metzincinas envolvidas em vários processos patológicos e fisiológicos no humano, sendo a sua atividade controlada por inibidores endógenos, como os inibidores tecidulares das metaloproteinases de matriz (TIMPs), ou por inibidores exógenos como o *Batimastat*. Por vezes ocorre excesso de produção e ativação destas enzimas, resultando num excesso de degradação de constituintes da matriz extracelular (ECM), conduzindo a alterações patológicas. Neste sentido surge a necessidade de desenvolver inibidores capazes de inibir esta atividade.

Um exemplo de atividade destas enzimas prejudicial à saúde humana é relativo à cárie dentária, em que durante o tratamento de reconstituição do dente ocorre um processo de desmineralização da dentina com recurso a ácidos que podem ativá-las, e posterior polimerização com recurso a adesivos que podem aprisioná-las no interior da resina e consequentemente degradação das fibras de colagénio expostas por estas enzimas.

De forma a analisar a capacidade de nove inibidores em inibir a atividade as cinco enzimas mais abundantes na dentina (MMP-1, a MMP-2, a MMP-8, a MMP-9 e a MMP-13) realizaram-se quatro testes enzimáticos em diferentes concentrações do inibidor a testar. Nestes ensaios foi utilizado um substrato cromogénico que, na presença da enzima é degradado e emite uma coloração amarela cuja absorvância pode ser lida a 415nm. Caso os inibidores a testar sejam eficazes, estes impedem a degradação do substrato e consequentemente não se formará a cor amarela.

Os resultados de absorvância *versus* tempo foram convertidos em gráficos cujo declive da reta de regressão linear corresponde à velocidade inicial da reação, obtendo-se assim as percentagens de inibição enzimática de cada composto em estudo para a respetiva enzima. De um modo geral, todos os compostos a testar apresentaram capacidade inibitória da atividade das MMPs, sendo que nalguns casos se verificou uma diminuição superior a 50% dessa atividade, enquanto que noutras ocorreu ativação da enzima o que, para este estudo não é relevante, mas poderá ter interesse clínico noutra área de estudo.

Quanto à especificidade dos inibidores para as enzimas os resultados foram variados, o que, em termos práticos poderá influenciar a toxicidade destes compostos.

Uma vez que a atividade das enzimas é sensível a alterações de temperatura e foram realizados dois ciclos de descongelação/congelamento, os resultados positivos de inibição poderão ter sido influenciados pela diminuição da atividade destas. Do mesmo modo, os valores de absorvância altos de alguns compostos a testar poderão estar relacionados com a polimerização destes, resultando num valor de velocidade inicial superior ao real.

Posteriormente, os compostos que possuam potencial poder inibitório destas enzimas serão sujeitos a testes de toxicidade. Assim, defendo que deveriam ser realizados mais testes de inibição enzimática destes compostos a concentrações inferiores de modo a apresentarem menos efeitos toxicológicos e a poderem ser utilizados com uma margem de segurança.

Capítulo III

Bibliografía

Amar, S., Fields, G. B., & Amar, S. (2016). Expert Review of Proteomics Potential clinical implications of recent matrix metalloproteinase inhibitor design strategies Potential clinical implications of recent matrix metalloproteinase inhibitor design strategies. *Expert Rev. Proteomics* 12(5), 12(5), 445–447. <http://doi.org/10.1586/14789450.2015.1069190>

Baker, A. H., Edwards, D. R., & Murphy, G. (2002). Metalloproteinase inhibitors : biological actions and therapeutic opportunities. *Journal of Cell Science*, 115, 3719–3727. <http://doi.org/10.1242/jcs.00063>

Chaussain, C., Boukpepsi, T., Khaddam, M., Tjaderhane, L., George, A., & Menashi, S. (2013). Dentin matrix degradation by host matrix metalloproteinases: Inhibition and clinical perspectives toward regeneration. *Frontiers in Physiology*, 4(308), 1–8. <http://doi.org/10.3389/fphys.2013.00308>

Dormán, G., Cseh, S., Hajdú, I., Barna, L., Kónya, D., Kupai, K., ... Ferdinandy, P. (2010). Matrix Metalloproteinase Inhibitors. *Drugs*, 70(8), 949–964. <http://doi.org/10.2165/11318390-000000000-00000>

Fanjul-fernández, M., Folgueras, A. R., Cabrera, S., & López-otín, C. (2010). Biochimica et Biophysica Acta Matrix metalloproteinases : Evolution , gene regulation and functional analysis in mouse models. *BBA - Molecular Cell Research*, 1803(1), 3–19. <http://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2009.07.004>

Johnson, L. L. (1998). Matrix metalloproteinases J Hupe *. *Current Opinion in Chemical Biology*, (2), 466–471.

Klein, T., & Bischoff, R. (2011). Physiology and pathophysiology of matrix metalloproteases. *Amino Acids*, 41(2), 271–290. <http://doi.org/10.1007/s00726-010-0689-x>

Lema, V., & Armiento, J. D. (2006). Matrix Metalloproteinases in Development and Disease. *Birth Defects Research*, 78(1), 1–10. <http://doi.org/10.1002/bdrc.20065>

Matthew Hoffman. (2015). Picture of the Teeth. Retrieved from

<http://www.webmd.com/oral-health/picture-of-the-teeth#1>

Mazzoni, A., Scaffa, P., & Carrilho, M. (2012). Effects of Etch-and-Rinse and Self-etch Adhesives on Dentin. *International & American Associations for Dental Research*, 92(1), 82–86. <http://doi.org/10.1177/0022034512467034>

Mazzoni, A., Tjäderhane, L., Checchi, V., Lenarda, R. Di, Salo, T., Tay, F. R., ... Breschi, L. (2015). Role of Dentin MMPs in Caries Progression and Bond Stability. *Critical Reviews of Oral Biology & Medicine*, 94(2), 241–251. <http://doi.org/10.1177/0022034514562833>

Murphy, G., & Docherty, A. J. P. (1992). Update The Matrix Metalloproteinases and Their Inhibitors. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 7(2).

Nagase, H., & Woessner, J. . (1999). Matrix metalloproteinases. *The Journal of Biological Chemistry*, 274(31), 21491–21494. <http://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2010.01.016>

Ramnath, N., & Creaven, P. J. (2004). Matrix Metalloproteinase Inhibitors. *Current Oncology Reports*, (6), 96–102.

Saboia, V. P. A., Santi, S., Angeloni, V., Checchi, V., Curci, R., Lenarda, R. Di, ... Breschi, L. (2014). Carbodiimide Inactivation of MMPs and Effect on Dentin Bonding. *J Dent Res*, 93(3), 263–268. <http://doi.org/10.1177/0022034513516465>

Salo, T. (2004). Matrix metalloproteinases (MMPs) in oral diseases. *Oral Diseases*, 10, 311–318.

Siefert, S. A., & Sarkar, R. (2012). Matrix metalloproteinases in vascular physiology and disease. *Vascular*, 20(4), 210–216. <http://doi.org/10.1258/vasc.2011.201202>

Tan, R. J., & Liu, Y. (2012). Matrix metalloproteinases in kidney homeostasis and diseases. *AJP: Renal Physiology*, 302(11), F1351–F1361. <http://doi.org/10.1152/ajprenal.00037.2012>

Tjäderhane, L., Nascimento, F. D., Breschi, L., Mazzoni, A., Carrilho, M. R., Carvalho, R. M., ... Pashley, D. H. (2012). Optimizing dentin bond durability : Control of collagen degradation by matrix metalloproteinases and cysteine cathepsins. *Dental Materials*, 29(1), 116–135. <http://doi.org/10.1016/j.dental.2012.08.004>

- Visse, R., & Nagase, H. (2003). Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: Structure, function, and biochemistry. *Circulation Research*, 92(8), 827–839. <http://doi.org/10.1161/01.RES.0000070112.80711.3D>
- Woessner, J. F. (1991). Matrix metalloproteinases and their inhibitors in connective tissue remodeling. *FASEB Journal : Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 5(8), 2145–54. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1850705>
- Wojtowicz-praga, S. M., Dickson, R. B., & Hawkins, M. J. (1997). Matrix metalloproteinase inhibitors, 61–75.
- Zhang, S., & Kern, M. (2009). The role of host-derived dentinal matrix metalloproteinases in reducing dentin bonding of resin adhesives. *International Journal of Oral Science*, 1(4), 163–176. <http://doi.org/10.4248/IJOS.09044>

4. Anexos

Tabela 1. Esquema utilizado para a microplaca 1 no teste de inibição enzimática

	A	B	C	D	E	F	G	H
MMP-1	C1 (1mM)	C2 (1mM)	C3 (1mM)		C5 (1mM)	MMP-1 +Substrato		
MMP-1	C1 (0,1mM)	C2 (0,1mM)	C3 (0,1mM)		C5 (0,1mM)			
MMP-2	C1 (1mM)	C2 (1mM)	C3 (1mM)		C5 (1mM)	MMP-2 +Substrato		
MMP-2	C1 (0,1mM)	C2 (0,1mM)	C3 (0,1mM)		C5 (0,1mM)			
MMP-8	C1 (1mM)	C2 (1mM)	C3 (1mM)		C5 (1mM)	MMP-8 +Substrato		
MMP-8	C1 (0,1mM)	C2 (0,1mM)	C3 (0,1mM)		C5 (0,1mM)			
MMP-9	C1 (1mM)	C2 (1mM)	C3 (1mM)		C5 (1mM)	MMP-9 +Substrato		
MMP-9	C1 (0,1mM)	C2 (0,1mM)	C3 (0,1mM)		C5 (0,1mM)			
MMP-13	C1 (1mM)	C2 (1mM)	C3 (1mM)		C5 (1mM)	MMP-13 +Substrato		
MMP-13	C1 (0,1mM)	C2 (0,1mM)	C3 (0,1mM)		C5 (0,1mM)			
	C1 + substrato	C2 + substrato	C3 + substrato		C5 + substrato			
	Substrato	Substrato						C3 (1mM)

Tabela 2. Esquema utilizado para a microplaca 2 no teste de inibição enzimática

	A	B	C	D	E	F	G	H
MMP-1	C6 (1mM)	C7 (1mM)	C8 (1mM)	C12 (1mM)	C16 (1mM)	MMP-1 +Substrato		
MMP-1	C6 (0,1mM)	C7 (0,1mM)	C8 (0,1mM)	C12 (0,1mM)	C16 (0,1mM)			
MMP-2	C6 (1mM)	C7 (1mM)	C8 (1mM)	C12 (1mM)	C16 (1mM)	MMP-2 +Substrato		
MMP-2	C6 (0,1mM)	C7 (0,1mM)	C8 (0,1mM)	C12 (0,1mM)	C16 (0,1mM)			
MMP-8	C6 (1mM)	C7 (1mM)	C8 (1mM)	C12 (1mM)	C16 (1mM)	MMP-8 +Substrato		
MMP-8	C6 (0,1mM)	C7 (0,1mM)	C8 (0,1mM)	C12 (0,1mM)	C16 (0,1mM)			
MMP-9	C6 (1mM)	C7 (1mM)	C8 (1mM)	C12 (1mM)	C16 (1mM)	MMP-9 +Substrato		
MMP-9	C6 (0,1mM)	C7 (0,1mM)	C8 (0,1mM)	C12 (0,1mM)	C16 (0,1mM)			
MMP-13	C6 (1mM)	C7 (1mM)	C8 (1mM)	C12 (1mM)	C16 (1mM)	MMP-13 +Substrato		
MMP-13	C6 (0,1mM)	C7 (0,1mM)	C8 (0,1mM)	C12 (0,1mM)	C16 (0,1mM)			
	C6 + substrato	C7 + substrato	C8 + substrato	C12 + substrato	C16 + substrato			
	Substrato	Substrato						

Tabela 3. Esquema utilizado para a microplaca 3 no teste de inibição enzimática

	A	B	C	D	E	F	G	H
MMP-1	C1 0,05mM	C2 0,05mM	C3 0,05mM	C4 0,05mM	C5 0,05mM	MMP-1 + substrato		
MMP-1	C1 0,01mM	C2 0,01mM	C3 0,01mM	C4 0,01mM	C5 0,01mM			
MMP-2	C1 0,05mM	C2 0,05mM	C3 0,05mM	C4 0,05mM	C5 0,05mM	MMP-2 + substrato		
MMP-2	C1 0,01mM	C2 0,01mM	C3 0,01mM	C4 0,01mM	C5 0,01mM			
MMP-8	C1 0,05mM	C2 0,05mM	C3 0,05mM	C4 0,05mM	C5 0,05mM	MMP-8 + substrato		
MMP-8	C1 0,01mM	C2 0,01mM	C3 0,01mM	C4 0,01mM	C5 0,01mM			
MMP-9	C1 0,05mM	C2 0,05mM	C3 0,05mM	C4 0,05mM	C5 0,05mM	MMP-9 + substrato		
MMP-9	C1 0,01mM	C2 0,01mM	C3 0,01mM	C4 0,01mM	C5 0,01mM			
MMP-13	C1 0,05mM	C2 0,05mM	C3 0,05mM	C4 0,05mM	C5 0,05mM	MMP-13 + substrato		
MMP-13	C1 0,01mM	C2 0,01mM	C3 0,01mM	C4 0,01mM	C5 0,01mM			
	Substrato							

Tabela 4. Esquema utilizado para a microplaca 4 no teste de inibição enzimática

	A	B	C	D	E	F	G	H
MMP-1	C6 0,05mM	C7 0,05mM	C8 0,05mM	C9 0,05mM	MMP-1 + Substrato			
MMP-1	C6 0,01mM	C7 0,01mM	C8 0,01mM	C9 0,01mM				
MMP-2	C6 0,05mM	C7 0,05mM	C8 0,05mM	C9 0,05mM	MMP-2 + Substrato			
MMP-2	C6 0,01mM	C7 0,01mM	C8 0,01mM	C9 0,01mM				
MMP-8	C6 0,05mM	C7 0,05mM	C8 0,05mM	C9 0,05mM	MMP-8 + Substrato			
MMP-8	C6 0,01mM	C7 0,01mM	C8 0,01mM	C9 0,01mM				
MMP-9	C6 0,05mM	C7 0,05mM	C8 0,05mM	C9 0,05mM	MMP-9 + Substrato			
MMP-9	C6 0,01mM	C7 0,01mM	C8 0,01mM	C9 0,01mM				
MMP-13	C6 0,05mM	C7 0,05mM	C8 0,05mM	C9 0,05mM	MMP-13 + Substrato			
MMP-13	C6 0,01mM	C7 0,01mM	C8 0,01mM	C9 0,01mM				
	Substrato							