



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

**MESTRADO INTEGRADO EM CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS**

EFEITO INIBITÓRIO EM METALOPROTEINASE DE MATRIZ

Trabalho submetido por

João Diogo Mendes de Freitas

para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas

Novembro de 2014



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

**MESTRADO INTEGRADO EM CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS**

EFEITO INIBITÓRIO EM METALOPROTEINASE DE MATRIZ

Trabalho submetido por

João Diogo Mendes de Freitas

para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas

Trabalho orientado por

Professor Doutor Jorge Caldeira

Novembro de 2014

“A ciência é o querer adaptar o menor sonho ao maior”

Fernando Pessoa.

Agradecimentos

Esta página é dedicada a todos aqueles que estiveram do meu lado ao longo deste percurso, que me ajudaram a que este objectivo fosse cumprido, sendo este feito também um pouco de todos eles.

Ao meu orientador, Prof. Doutor Jorge Caldeira, pela gentileza em me ter ajudado nesta minha tese de mestrado.

Aos meus irmãos do Colégio Universitário PIO XII, que iniciaram esta longa caminhada comigo, por estarem sempre do meu lado, no melhor e no pior, e por me terem ensinado o verdadeiro significado de amizade, especialmente ao Gonçalo Freitas, ao Pedro Afonso e ao Alexandre Solas por todos estes anos.

Aos meus irmãos do Conselho de Praxe, pois com eles vivi os melhores anos da minha vida, por com eles ter aprendido o significado de irmandade e de academismo sem igual em qualquer outro lugar. Levo-os comigo para a vida.

Ao meu irmão Miguel de Freitas, porque mais do que meu irmão é o meu melhor amigo para o qual olho como um exemplo.

À Fátima Evangelista por todo o carinho e amor, por me ter apoiado a cada instante, por me ter dado força quando não sabia onde a encontrar, por ser o meu orgulho e porque “é muito mais do que isso”.

Aos meus pais bastava dizer que lhes agradeço por tudo aquilo que são, pois não há ninguém no mundo melhor do que eles, mas faço questão de me exprimir. Aos meus pais devo-lhes tudo o que sou e são eles os principais responsáveis por ter concluído esta etapa da minha vida. Aos meus pais agradeço pelo amor, pelo apoio, pelo esforço, pela dedicação, pelo carácter, pelo altruísmo, por tudo o que sempre me deram e por toda vida me terem tratado como sendo eu a vida deles, e não existe maior amor do que esse.

Resumo

As metaloproteinases de matriz (MMPs) são um grupo de endopeptidases que contêm um íon de Zinco (Zn^{2+}) no seu centro activo. Estas enzimas estão envolvidas em vários processos biológicos do organismo humano como por exemplo na embriogénese, na remodelação dos tecidos, na cicatrização e na angiogénese. A sua principal função é a degradação de proteínas da matriz extracelular controlando desta forma a extensão da remodelação da mesma. A actividade das MMPs é controlada por inibidores endógenos como a α 2-macroglobulina e os inibidores tecidulares das metaloproteinases de matriz (TIMPs). Em condições normais existe um equilíbrio entre a actividade das MMPs e a actividade dos seus inibidores endógenos, no entanto, quando existe um desequilíbrio, o organismo deixa de ter a capacidade regular as MMPs e estas expressam em excesso a sua actividade o que pode provocar alguns processos patológicos, sendo os mais graves o cancro, a artrite e as doenças vasculares. O envolvimento destas enzimas nas referidas doenças serviu de impulsionador para despertar o interesse da comunidade científica, que nas últimas décadas tem tentado incessantemente desenvolver inibidores para poder controlar a actividade das MMPs e assim encontrar uma terapêutica para estas patologias. Apesar de terem sido desenvolvidos inibidores que comprovaram a efectividade da sua acção, estes acarretavam uma grande toxicidade que se traduzia numa serie de reacções adversas derivadas da sua instabilidade e falta de selectividade. Devido a tudo isto, nos últimos anos, aprofundou-se o estudo da estrutura química das MMPs e surgiu uma revolução no *design* de novos inibidores das metaloproteinases de matriz (MMPi) com o objectivo de sintetizar compostos que apresentem uma inibição mais potente aliada a especificidade necessária para que estes possam ser utilizados como terapêutica para algumas das mais graves doenças dos dias de hoje.

Palavras-Chave: metaloproteinases de matriz (MMPs), matriz extracelular (ECM), inibidores das metaloproteinases de matriz (MMPi), *Design* de novos MMPi

Abstract

The MMPs are a large group of zinc-dependent endopeptidases that are involved in various biological mechanisms in the human body as in embryogenesis, tissue remodelling, wound healing and angiogenesis. MMPs main function is the degradation of the extracellular matrix proteins, therefore controlling its own remodelling. MMPs activity is controlled by endogenous inhibitors such as α 2-macroglobulin and tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMPs). Under normal circumstances there is a balance between MMPs activity and their endogenous inhibitors activity, however if there is an imbalance, the body will stop having the ability to regulate these MMPs and its activity will be overexpressed which may cause some pathological processes being the most severe: cancer, arthritis, and vascular diseases.

The involvement of these enzymes in the mentioned diseases served as an impeller in arousing the interest of the scientific community, which in recent decades has tried ceaselessly to develop inhibitors in order to control the activity of MMPs and thus find a therapy for these diseases.

Despite of inhibitors prove effectiveness, these brought high toxicity which translated into a series of adverse reactions derived from the lack of instability and lack of selectivity. Due to this, in recent years the study of chemical structure of MMP has been deepened and a revolution in the design of new inhibitors of matrix metalloproteinase (MMPi) emerged, with the main purpose of synthesis compounds that present more potent inhibition combined with specification, highly necessary for therapy in some of the most serious diseases nowadays.

Key-words: Matrix Metalloproteinase (MMPs); Matrix Extracellular (ECM); Matrix metalloproteinase inhibitors (MMPi); New MMPi design

ÍNDICE GERAL

I. Introdução.....	23
II. Desenvolvimento	25
a) Funções das metaloproteínas de matriz	25
b) Estrutura das metaloproteínas de matriz.....	26
c) Tipos de metaloproteínas de matriz	27
1. Colagenases	29
2. Gelatinases	30
3. Estromelinas	32
4. Matrilinas	32
5. <i>Membrane type metalloproteinase</i> (MT-MMP)	34
6. Outras MMPs.....	35
d) Activação das metaloproteínas de matriz	38
e) Especificidade das MMPs para o seu substrato	41
f) Inibição das metaloproteínas de matriz.....	43
1. Inibidores endógenos das metaloproteínas de matriz.....	43
1.1. Inibidores tecidulares das metaloproteínas de matriz (TIMPs).....	44
2. Inibidores sintéticos das metaloproteínas de matriz.....	45
2.1. Primeiro Inibidores das metaloproteínas de matriz (MMPi).....	47
2.2. Objectivos do <i>design</i> de novos MMPi.....	51
2.3. Nova de geração de MMPi com ZBG à base de ácido hidroxâmico.....	52
2.4. Nova geração de MMPi com ZBG à base de um grupo tiol.....	58
2.5. MMPi com inibição baseada na pirimidina	61
2.6. MMPi com inibição baseada num grupo hidroxipirona	63
2.7. MMPi com inibição baseada em tetraciclinas	64
3. Papel dos <i>subsites</i> na inibição das MMPs	64
g) Influência das MMPs em processos patológicos	66

1. MMPs e o Cancro	66
2. MMPs e a Doença Vascular	67
3. MMPs e artrite	68
III. Conclusão	71
IV. Bibliografia.....	74

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estruturas dos domínios da família das MMP	26
Figura 2. Estrutura tridimensional de uma proMMP-2 e de um TIMP-2.....	31
Figura 3. Estrutura das collagenases, gelatinases, matrilisinas e MT-MMPs	33
Figura 4. Resumo da estrutura de todas as MMPs referidas ao longo desta revisão.....	37
Figura 5. Activação proteolítica e activação não-proteolítica	39
Figura 6. Activação da proMMP-2 pela MT1-MMP e pela TIMP-2	41
Figura 7. Representação <i>Solid Ribbon</i> de uma MMP-8	42
Figura 8. Inibição de uma MMP por um TIMP.....	45
Figura 9. Estrutura química de inibidores das metaloproteinases de matriz (MMPi) de largo espectro de acção contendo um ZBG à base de ácido hidroxâmico ligado a um péptidomimético baseado no colagénio.....	48
Figura 10. Estrutura química do <i>acetohydroxamic acid</i> , inibidor representativo de um inibidor de metaloproteinases de matriz (MMPi) de largo espectro característico dos inibidores de 1ª geração.....	50
Figura 11. Novos ZBGs testados como alternativa aos ZBGs à base de ácido hidroxâmico	50
Figura 12. Estruturas de inibidores contendo grupos de ácido hidroxâmico e grupos de carboxilatos ligados a um péptidomimético	53
Figura 13. Estrutura de novos inibidores de metaloproteinases <i>diaryl ether hydroxamates</i>	55
Figura 14. Novos inibidores MMPi de ácido hidroxâmico ligados a um péptidomimético	57
Figura 15. Novos inibidores <i>peptidomimetic carboxylates</i>	58
Figura 16. Novos inibidores com grupo tiol.....	59
Figura 17. MMPi com grupo de ácido barbitúrico	62
Figura 18. Estrutura química de um <i>pyrone MMP inhibitor</i>	63
Figura 19. MMPi à base de uma tetraciclina quimicamente modificada	64

Figura 20. Estrutura do domínio catalítico de uma MMP e a localização dos seus *subsites*65

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Subdivisão das metaloproteinases de matriz por grupos consoante a especificidade para com o substrato	27
Tabela 2. Valores do IC ₅₀ dos ZBGs sobre a MMP-3	51
Tabela 3. Processos patológicos resultantes da ablação do gene que codifica para determinada MMP ou para determinado TIMP.....	69

LISTA DE ABREVIATURAS

ADAM - Proteína Desintegrina e Metaloproteinase

ADME - Absorção, Distribuição, Metabolismo e Excreção

AHA - *Acetohydroxamic acid*

DPOC - Doença Pulmonar Obstrutiva Crónica

ECM - Matriz Extracelular

GPI - Glicosilfosdatidilinositol

MMP - Metaloproteinase de Matriz

MMPi - Inibidor de Metaloproteinase de Matriz

MSS - *Musculoskeletal Ssyndrome*

MT-MMP - *Membrane Type Metalloproteinase*

SDS - Dodecil Sulfato de Sódio

SX - *Cysteine Switch Sulfhydryl*

TIMP - Inibidor Tecidual das Metaloproteinases de Matriz

T-PA - Activador de Plasminogénio Tecidual

ZBG - *Zinc Biding Group*

I. INTRODUÇÃO

As metaloproteinases de matriz (MMPs) são uma família de endopeptidases que constituem um dos ramos da família das enzimas *Metzinc*s. Estas MMPs formam um grupo de enzimas endógenas com um íão de Zinco (Zn^{2+}) no seu centro activo (Klein & Bischoff, 2011; Raffetto & Khalil, 2008; Tallant, Marrero, & Gomis-Rüth, 2010). Além das metaloproteinases de matriz, fazem parte desta família também, outras enzimas com Zinco (Zn^{2+}) no seu centro activo. Exemplos das mesmas são: as serralisinas, as astacininas, as matrixinas e as adamalisinas (ADAMs). (Stöcker et al., 1995) Devido à grande semelhança estrutural existente entre as enzimas da família *Metzinc*s, semelhança essa bastante evidente no centro activo destas proteases, tem vindo a aumentar o interesse em desenvolver inibidores cada vez mais selectivos e específicos para as metaloproteinases existentes (Amălinei, Căruntu, & Bălan, 2007).

As metaloproteinases de matriz estão envolvidas em vários processos fisiológicos, tendo um papel crucial na regulação do metabolismo. Inúmeros exemplos do seu envolvimento neste processo são: interferirem na degradação de certas proteínas da membrana extracelular, na proliferação de células, na cicatrização e na angiogénese (Amălinei et al., 2007; Tallant et al., 2010).

As MMPs participam activamente na remodelação e degradação de componentes da matriz extracelular (ECM), sendo esta a sua principal e crucial função no organismo humano, através do controlo da extensão da remodelação dos tecidos da mesma. Os principais componentes da ECM que servem de substrato a estas enzimas são o colagénio, a elastina, a laminina, a fibronectina e os proteoglicanos (Hannas et al., 2007; Visse & Nagase, 2003).

Em condições fisiológicas ditas normais, a actividade das metaloproteinases de matriz é perfeitamente regulada. Esta actividade das MMPs é regulada através de um equilíbrio entre a quantidade de MMPs existentes no organismo e a quantidade dos seus inibidores endógenos (TIMPs). A manutenção de um balanço estável entre a enzima e o seu inibidor garante, à partida, o afastamento de qualquer tipo de complicações que pudessem advir de um excesso de actividade das metaloproteinases de matriz (Visse & Nagase, 2003).

Em algumas situações o organismo humano perde a capacidade de manter o rácio MMPs/TIMPs, provocando assim um desequilíbrio no balanço referido anteriormente. A perda da capacidade do organismo em controlar a actividade das MMPs pode ser a base de vários processos patológicos como a Artrite, o Cancro, a Fibrose, a Endometriose, as Úlceras e Doenças Vasculares (aterosclerose, aneurismas, varizes venosas, hipertensão e pré-eclampsia) (Raffetto & Khalil, 2008; Visse & Nagase, 2003). Por ter implicações directas no aparecimento de todas estas doenças, tornou-se crucial desenvolver novos e mais potentes inibidores das metaloproteinase de matriz, de modo a poder controlar a actividade das MMPs (Amălinei et al., 2007).

II. DESENVOLVIMENTO

a) Funções das metaloproteinases de matriz

As MMPs estão envolvidas em inúmeras vias biológicas e a sua principal função é degradar os vários componentes da matriz extra celular (Raffetto & Khalil, 2008; Zhang et al., 2008).

A degradação dos componentes da matriz extracelular (ECM) é um processo biológico directamente regulado pelas metaloproteinases de matriz e indirectamente pelos seus inibidores endógenos (Visse & Nagase, 2003). Estes inibidores estão indirectamente ligados a esta regulação pois são responsáveis por controlar a actividade das MMPs. Um descontrolo no equilíbrio existente entre as MMPs e os seus inibidores pode conduzir a um excesso da degradação dos componentes da matriz extracelular e, consequentemente, a processos patológicos. Pensa-se que estas falhas na regulação das MMPs possam estar envolvidas no desenvolvimento de certos cancros, bem como na sua metastização e dependentes do grau de agressividade dos mesmos; na perda de cartilagem na artrite; em doenças auto-imunes como a artrite reumatóide; em doenças cardiovasculares; na lesão pulmonar aguda; na doença pulmonar obstrutiva crónica (DPOC); em patologias da pele e dos olhos; na periodontite; em nefrites; em úlceras; na fibrose; na aterosclerose; em aneurismas; na encefalomielite; na psoríase; em dermatites; na doença de Alzheimer; entre outras (Melo, 2012; Raffetto & Khalil, 2008; Visse & Nagase, 2003).

O grande número de doenças referidas anteriormente relacionadas com as MMPs chamaram à atenção da comunidade científica para o desenvolvimento de novos e mais eficazes inibidores para as metaloproteinases de matriz (Amălinei et al., 2007).

Apesar da actividade das MMPs estar directamente envolvida em diversos processos patológicos, as MMPs estão também envolvidas em vários processos biológicos cruciais, como por exemplo, na embriogénese, na remodelação normal dos tecidos, na cicatrização e na angiogénese (Amălinei et al., 2007; Tallant et al., 2010).

b) Estrutura das metaloproteínases de matriz

Exceptuando alguns casos, a maioria das metaloproteínases de matriz são compostas por: uma curta sequência peptídica conhecida como “sequência sinal”; uma sequência com aproximadamente 80 aminoácidos que formam o chamado pro-domínio; um domínio catalítico constituído por cerca de 175 aminoácidos; um péptido com um número variável de aminoácidos que faz a ligação entre o domínio catalítico e o domínio da hemopexina; um domínio da hemopexina, constituído por cerca de 200 aminoácidos. A representação esquemática de cada um dos domínios possíveis de existir numa metaloproteínase de matriz pode ser observada na figura 1. As MMPs começam a ser sintetizadas pela sua extremidade N-terminal, formando primeiro a sequência sinal e o pro-domínio. Quando estes dois domínios estão presentes, a MMP está na sua forma inactiva. O domínio catalítico é composto por cinco folhas β e três hélices α . Este domínio possui ainda três íões de cálcio que funcionam como componentes estruturais e contem o centro activo da enzima que é formado por um átomo de zinco (Zn^{2+}) rodeado e ligado a três histidinas, que formam um domínio de ligação do zinco definido por HExxHxxGxxH. O domínio da hemopexina é composto com 4 folhas β e desempenha um papel fulcral na especificidade de algumas metaloproteínases. Apesar dos domínios descritos anteriormente fazerem parte da estrutura base da maioria das metaloproteínases vamos observar, mais à frente, que existem MMPs que apresentem diferentes arranjos dos seus domínios, existindo mesmo certas MMPs que não possuem alguns destes domínios (Klein & Bischoff, 2011; Maskos & Bode, 2003; Maskos, 2005; Nagase, Visse, & Murphy, 2006; Raffetto & Khalil, 2008; Tallant et al., 2010; Verma & Hansch, 2007).

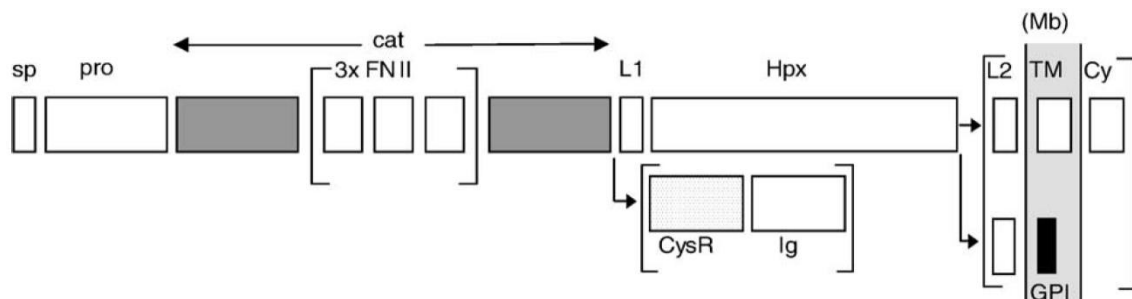


Figura 1. Estruturas dos domínios da família das MMP. sp, “sequência sinal”; pro, pro-domínio; cat, domínio catalítico; FNII, cadeias de fibronectina tipo II; L1, ligante 1; Hpx, domínio da hemopexina; L2, ligante 2; Mb, membrana plasmática; TM, domínio transmembranar; Cy, extremidade citoplasmática; CysR, cisteína; Ig, domínio imunoglobulinar; GPI, âncora de glicosilfosfatidilinositol. (Imagem adaptada de Nagase et al., 2006)

c) Tipos de metaloproteínases de matriz

São conhecidas até aos dias de hoje entre 24 e 27 metaloproteínases de matriz em humanos (Amălinei et al., 2007; Engel et al., 2005; Visse & Nagase, 2003). Existem MMPs que podem degradar vários substratos e quase todas têm capacidade de degradar o colagénio, que é o maior substrato das MMPs. Outras MMPs são as únicas a apresentar especificidade para certos substratos. As MMPs podem estar envolvidas em diferentes vias biológicas e ainda estar presente em diferentes tecidos. Tendo em conta a especificidade para com o substrato que podem degradar, a similaridade na sequência de aminoácidos e a organização dos seus domínios, as metaloproteínases de matriz estão subdivididas nos seguintes grupos: as colagenases, as gelatinases, as estromelinas, as matrilisinas, as metaloproteínases associadas à membrana e por último um conjunto de outras metaloproteínases que não se enquadram em nenhum dos outros grupos (Amălinei et al., 2007; Nagase et al., 2006; Pirard, 2007). Para uma melhor compreensão podemos observar na tabela 1 cada uma das MMPs dividida pelo seu respectivo grupo.

MMPs	Outros Nomes	Distribuição tecidual/Doença relacionada	Substrato Colagénico
Colagenases			
MMP-1	Colagenase-1	Fibroblastos; tecido intersticial; Fibras de colagénio	I, II, III, VII; VIII; X
MMP-8	Colagenase-2	Neutrófilos ou leucócitos polimorfonucleares.	I, II, III, V, VII, VIII, X
MMP-13	Colagenase-3	Células do músculo liso; varizes venosas, pré-eclampsia; cancro da mama.	I, II, III, IV
MMP-18	Colagenase-4	Glândulas mamárias; placenta, pulmões; pâncreas; ovários; intestino delgado; baço; timo; próstata; testículos; cólon; coração	I
Gelatinases			
MMP-2	Gelatinase-A	Aneurisma da aorta; varizes venosas	I, II, III, IV, V, VII, X, XI
MMP-9	Gelatinase-B	Aneurisma da aorta; varizes venosas	IV, V, VII, X, XIV

Estromelisininas			
MMP-3	Estromelisinina-1	Células do músculo liso; fibroblastos sinoviais; doença arterial coronariana;	II, III, IV, IX, X, XI
MMP-10	Estromelisinina-2	Tecido uterino; pré-eclampsia; artrite; aterosclerose; células de carcinomas	III, IV, V
MMP-11	Estromelisinina-3	Tecido uterino; angiogénese; células de carcinoma hepatocelular	Não degrada colagénio
Matrilisininas			
MMP-7	Matrilisinina-1	Tecido uterino	IV, X
MMP-26	Matrilisinina-2 / Endometase	Células de cancro do endométrio	IV
Membrane type metalloproteinase			
MMP-14	MT1-MMP	Fibroblastos; células do músculo liso; células do músculo liso vascular; tecido uterino; angiogénese	I, II, III
MMP-15	MT2-MMP	Fibroblastos; leucócitos; pré-eclampsia; cancros da mama, próstata e cólon	I
MMP-16	MT3-MMP	Leucócitos; angiogénese do cancro	I
MMP-17	MT4-MMP	Cerebelo; cancro da mama	Não identificado
MMP-24	MT5-MMP	Leucócitos, tumores cerebrais, astrocitoma, glioblastoma	Não identificado
MMP-25	MT6-MMP / Leucolisina	Leucócitos, astrocitoma anaplásico; glioblastoma	IV
Outras MMPs			
MMP-12	Metaloelastase	Macrófagos	IV
MMP-19	RASI-I	Fígado	IV
MMP-20	Enamelisina	Esmalte dentário	V
MMP-21	XMMP	Placenta	-
MMP-22	CMMP	-	Desconhecido
MMP-23	MMP matriz cisteína	Células dos tecidos reprodutores, como os ovários, testículos e próstata	Desconhecido
MMP-27	-	Testículos, pulmões, intestino e da pele	Desconhecido
MMP-28	Epilisina	Queratinócitos da pele	Desconhecido

Tabela 1. Subdivisão das metaloproteinases de matriz por grupos consoante a especificidade para com o substrato. Esta tabela contempla também a distribuição tecidual de cada MMP, processos patológicos em que estas possam estar envolvidas e ainda, se possuem capacidade de degradar o colagénio e em caso afirmativo qual o tipo de colagénio que podem degradar. (Tabela adaptada de Raffetto & Khalil, 2008)

1. Colagenases

Fazem parte do grupo das colagenases a MMP-1, MMP-8, MMP-13 e a MMP-18, que podem também ser chamadas de colagenase 1, colagenase 2, colagenase 3 e colagenase 4 respectivamente (Visse & Nagase, 2003). Além de degradarem proteínas da matriz extracelular e outras proteínas solúveis, as colagenases desempenham um papel activo, principalmente, na degradação dos colagénios fibrilares do tipo I,II,III,V e XI. As colagenases degradam o colagénio em dois fragmentos característicos, sendo que um dos fragmentos tem $\frac{1}{4}$ do comprimento do fragmento original e o outro fragmento, o maior, o comprimento de $\frac{3}{4}$ do fragmento original. O fragmento de comprimento $\frac{3}{4}$ do original foi cortado a partir da extremidade N da cadeia polipeptídica do colagénio fibrilar entre a glicina 775 (Gly775) e a leucina 776 (Leu776) da cadeia α . Estes colagénios fibrilares são constituídos por 3 cadeias- α , numa conformação de tripla hélice, o que adiciona rigidez à proteína e resistência à degradação por outras proteases. Após a degradação pelas colagenases, os 2 fragmentos resultantes estão ainda susceptíveis a serem degradados por outras proteases, como por exemplo, as gelatinases (Amălinei et al., 2007; Murphy & Nagase, 2008; Visse & Nagase, 2003).

Entre as metaloproteinases de matriz, a MMP-1 é aquela que possuiu maior capacidade para degradar os colagénios tipo I, II e III. Esta pode ser produzida por vários tipos de células, como os fibroblastos, queratinócitos, células endoteliais, macrófagos, hepatócitos, condrócitos e osteoblastos (Amălinei et al., 2007).

A MMP-8 também pode ser chamada de *neutrophil* colagenase, estruturalmente é muito semelhante a MMP-1 mas apresenta diferenças ao nível da especificidade do substrato (Raffetto & Khalil, 2008). Esta degrada o colagénio do tipo I e o colagénio do tipo II, sendo este o mais abundante na cartilagem. A colagenase-2 é ainda responsável por degradar algumas proteínas não pertencentes a matriz extracelular, como por exemplo: a serpina, a bradicinina e o neurotransmissor SP (substância P). Esta metaloproteinase é sintetizada pelos leucócitos polimorfonucleares durante a sua maturação, na fase de mielócito e armazenada em grânulos específicos desta célula, sendo apenas libertada após um estímulo (Amălinei et al., 2007; Raffetto & Khalil, 2008). Esta colagenase pode ser activada por outras MMPs, como a MMP-3 e a MMP-7 (Raffetto & Khalil, 2008).

A MMP-13 consegue degradar o colagénio do tipo II mais eficientemente que os do tipo I e III (Raffetto & Khalil, 2008). Esta enzima é caracterizada por possuir uma grande especificidade de substrato e pela sua expressão limitada quando comparada com outras MMPs. A sua expressão pode ser influenciada por algumas hormonas e citocinas (Amălinei et al., 2007).

A MMP-18 é expressa em vários tecidos do organismo humano, incluindo nas glândulas mamárias, na placenta, nos pulmões, no pâncreas, nos ovários, no intestino delgado, no baço, no timo, na próstata e testículos, no cólon e ainda no coração. É conhecida por ser um precursor da MMP-19 (Amălinei et al., 2007). A literatura é ambígua, havendo alguns autores que consideram a MMP-18 como uma colagenase, enquanto outros consideram que esta faz parte do conjunto de MMPs que não se encaixam nos restantes grupos.

2. Gelatinases

As gelatinases incluem a MMP-2 e a MMP-9 ou, respectivamente, gelatinase-A e gelatinase-B. As gelatinases ligam-se principalmente aos colagénios desnaturados (gelatina). Os fragmentos do colagénio cortado pelas colagenases são exemplos precisamente disso (Raffetto & Khalil, 2008).

Estas gelatinases apresentam uma estrutura em que os seus domínios se encontram organizados da mesma forma que os domínios da estrutura base referida anteriormente. No entanto, estas gelatinases possuem uma particularidade, têm no seu domínio catalítico três cadeias de fibronectina tipo II que permitem ao domínio estabelecer uma ligação compacta e degradar as gelatinas, colagénios do tipo IV, V, VII, X, XI, XIV, elastina, proteoglicanos, proteína básica da mielina, a fibronectina, fibrilina-1 e laminina (Amălinei et al., 2007; Nagase et al., 2006; Visse & Nagase, 2003). Esta organização particular dos domínios das gelatinases pode ser observada no quadro da figura 4.

As três cadeias de fibronectina tipo II de uma proMMP-2 são postas em evidência na figura 2, e na figura 1 as três cadeias de fibronectina do tipo II aparecem esquematizadas no domínio catalítico para uma melhor compreensão. Outro facto interessante é que a MMP-2 pode degradar colagénios do tipo I, II e III tal como as colagenases, no entanto, a MMP-9 não pode (Murphy & Nagase, 2008). Apesar da

MMP-2 poder degradar estes tipos de colagénio, as collagenases têm uma afinidade mais elevada. As gelatinases desempenham um papel importante em muitos processos fisiológicos, tais como na degradação de componentes da matriz extracelular, na remodelação da matriz extracelular, na osteogénese e na cicatrização (Amălinei et al., 2007).

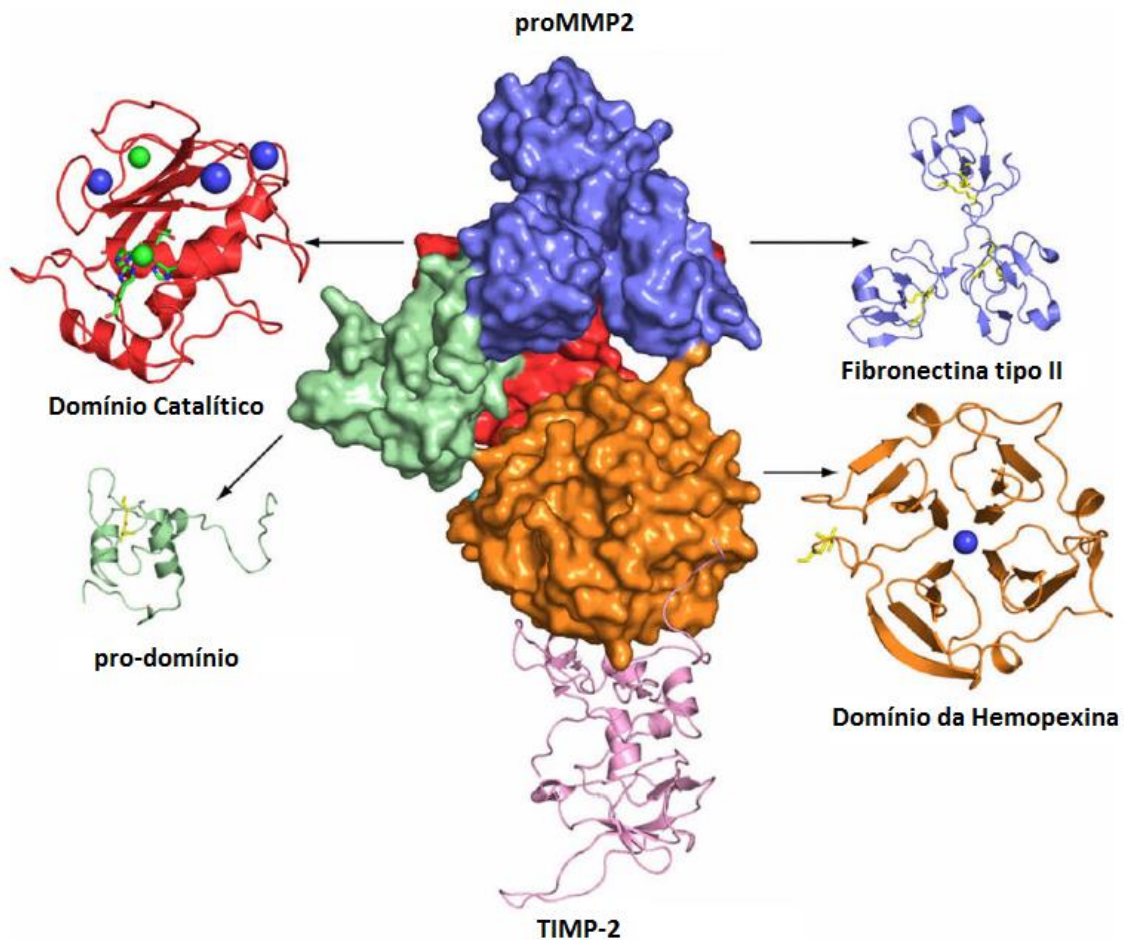


Figura 2. Estrutura tridimensional de uma proMMP-2 e de um TIMP-2. O domínio catalítico está representado a vermelho; o pro-domínio está representado a verde; as três cadeias de fibronectina do tipo II estão representadas a azul; o domínio da Hemopexina representado a cor-de-laranja; e o TIMP-2 representado a cor-de-rosa. As esferas verdes representam os íons de Zinco, inclusive o Zinco (Zn^{2+}) do centro activo; as esferas azuis representam os íons de cálcio (Ca^{2+}); e as ligações a amarelo que aparecem nos vários domínios representam as pontes de dissulfeto. (Imagem adaptada de Murphy & Nagase, 2008)

3. Estromelisinias

As estromelisinias são produzidas nas células estromais e estão incluídas neste grupo a MMP-3, MMP-10 e a MMP-11, podendo ser também chamadas de estromelisina-1, estromelisina-2 e estromelisina-3, respectivamente (Raffetto & Khalil, 2008; Visse & Nagase, 2003). Alguns autores não consideram a estromelisina-3 pertencente ao grupo das estromelisinias, defendendo que estas deveriam fazer parte do conjunto das MMPs que não se enquadram em nenhum dos grupos devido à sua especificidade por um substrato diferente e à sua diferente sequência de aminoácidos. (Raffetto & Khalil, 2008) Além disto, a estromelisina-11 possui ainda entre o seu pro-domínio e o seu domínio catalítico um local de clivagem da enzima furina, como podemos ver no quadro da figura 4. Outra diferença é o facto da MMP-3 e da MMP-10 serem codificadas no cromossoma 11 enquanto a MMP-11 é codificada no cromossoma 22, mais precisamente, a MMP-3 é codificada no gene 11q23, a MMP-10 no gene 11q21-q22 e a MMP-11 é codificada no gene 22q11.2 (Amălinei et al., 2007).

Tanto a MMP-3 como a MMP-10 têm como substrato numerosos componentes da matriz extracelular, como por exemplo, o colagénio tipo IV, V, IX e X, proteoglicanos, gelatinas, fibronectina, laminina, fibrilina e algumas proMMP, ou seja, MMP ainda na forma inactiva que necessitam de ser activadas para que possam cumprir as suas funções biológicas (Amălinei et al., 2007).

4. Matrilisinias

As matrilisinias são uma das excepções à estrutura base das metaloproteinases de matriz, uma vez que estas não o domínio da hemopexina. Podemos constatar essa falta do domínio da hemopexina nas matrilisinias ao observar a figura 3. Este facto torna as matrilisinias características e faz destas as metaloproteinases de matriz mais simples estruturalmente. Estão incluídas no grupo das matrilisinias a MMP-7 e a MMP-26, apelidadas também, respectivamente, por Matrilisina-1 e Matrilisina-2 (endometase) (Raffetto & Khalil, 2008).

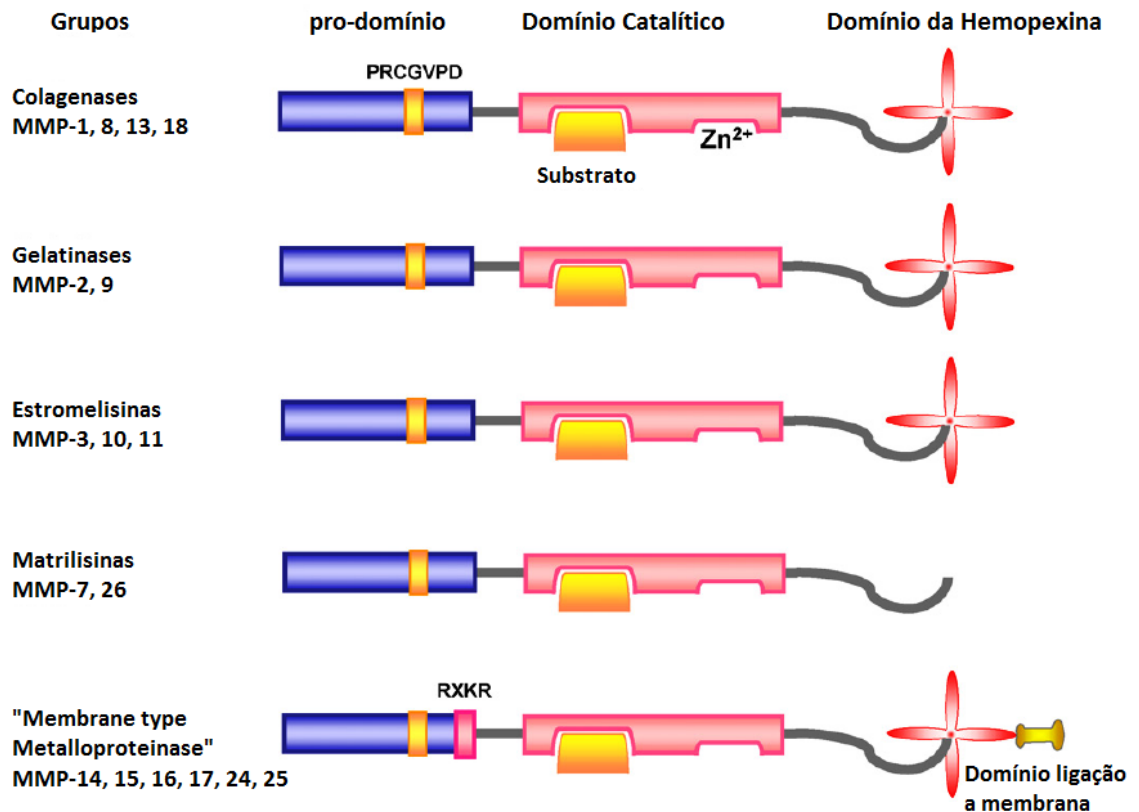


Figura 3. Estrutura das colagenases, gelatinases, matrilisinas e MT-MMPs. A figura representa os domínios destas MMPs: pro-domínio, o domínio catalítico, o domínio da hemopexina. Nas matrilisinas podemos ver que estas não possuem o domínio da hemopexina. Nas MT-MMPs podemos ver que possuem um domínio de ligação à membrana. (Imagem adaptada de Raffetto & Khalil, 2008)

A MMP-7 pode degradar vários componentes da ECM, tais como a fibronectina, a laminina, a entactina, o colagénio de tipo IV, os proteoglicanos e ainda a integrina $\beta 4$. A MMP-26 é a metaloproteinase de matriz mais pequena conhecida até à data, contendo apenas 261 aminoácidos. A MMP-26 tem uma característica excepcional entre as MMPs, pois esta pode promover uma activação autocatalítica. Esta endometase, *in vitro*, tem a capacidade de degradar o colagénio de tipo IV, a fibronectina, o fibrinogénio, a vitronectina, a $\alpha 1$ -antitripsina, a $\alpha 2$ -macroglobulina, a IGFBP-1 e ainda, desde que no estado desnaturado, podem também degradar o colagénio de tipo I, II, III. Ainda relativamente à MMP-26, um nível significativo de expressão desta metaloproteinase foi encontrada em análises a tecidos saudáveis do útero, rim e da placenta, o que leva a crer que esta possa estar envolvida na nidacção (Amălinei et al., 2007).

5. Membrane type metalloproteinase (MT-MMP)

Tal como o nome sugere, as MT-MMPs são MMP ligadas à membrana celular por intermédio de um sítio hidrófobo, independente da hemopexina, ou ancoradas a moléculas de glicosilfosfatidilinositol (GPI) que, por sua vez, se encontram ligadas à membrana celular. As MT-MMPs, são seis no total e estão subdivididas precisamente em dois grupos, as que estão ligadas à membrana e as que estão ancoradas a moléculas de glicosilfosfatidilinositol (Amălinei et al., 2007).

No grupo das proteínas transmembranares de tipo I, as MMPs ligadas a membranas, incluem a MMP-14, a MMP-15, a MMP-16 e ainda a MMP-24, podendo ser chamadas também, respectivamente de MT1-MMP, MT2-MMP, MT3-MMP e MT5-MMP. As MT-MMPs de tipo I apresentam todos os domínios característicos das MMPs mas com algumas particularidades visíveis na figura 4. Analisando esta figura podemos ver que estas MT-MMPs apresentam entre o pro-domínio e o domínio catalítico uma região de clivagem da enzima furina presente também noutras MMPs, representado na figura 4 pelas bandas de cor negra. Além disso, apresenta também, ligado ao domínio catalítico, um chamado domínio transmembranar de tipo I representado pelo número I, que por sua vez se liga ao domínio citoplasmático, identificável na figura pela sigla “Cp” (Amălinei et al., 2007).

No grupo das MT-MMPs ancoradas a GPIs estão incluídas a MMP-17, também podendo ser designada por MT4-MMP e a MMP-25, designada também por MT6-MMP. (Amălinei et al., 2007) À semelhança das MT-MMPs de tipo 1 também este grupo de MT-MMPs ancoradas a GPIs apresenta uma região de clivagem da enzima furina entre o pro-domínio e o domínio catalítico. Apresenta ainda como parte da sua estrutura a uma âncora de glicosilfosfatidilinositol, representado na figura 4 com a letra G (Amălinei et al., 2007).

No que diz respeito à especificidade do substrato as MT-MMPs, com a excepção da MT4-MMP, todas as MT-MMPs são capazes de converter a pro-MMP2, forma inactiva da MMP2, na sua forma activa. Adicionalmente foi provado que a MT1-MMP pode degradar o colagénio do tipo I, II e III. Todas as MT-MMPs podem degradar vários componentes da matriz extracelular. Além disso, as MT-MMPs desempenham um papel importante na interacção com os inibidores tecidulares das metaloproteinases de matriz (TIMPs) e, segundo alguns estudos, têm também capital importância no processo da

angiogénese de alguns cancros e das suas metástases (Amălinei et al., 2007; Suenaga, Mori, Itoh, & Seiki, 2005).

6. Outras MMPs

Estão incluídas neste grupo as seguintes metaloproteinasas: a MMP-12, conhecida também como metaloelastase; a MMP-18, a MMP-19, a MMP-20 ou chamada também de enamelinina; a MMP-21, a MMP-22; a MMP-23 conhecida também por metaloproteínase matriz cisteína; a MMP-27, e por último a MMP-28 também apelidada de epilisina (Amălinei et al., 2007).

A MMP-12 pode ser encontrada nos condrócitos, nos macrófagos, nos osteoclastos e na placenta. Estas metaloelastases podem degradar várias moléculas da matriz extracelular, tais como a gelatina de tipo I, a fibronectina, a laminina, a vitronectina, os proteoglicanos, a proteína básica da mielina, a elastina e α 1-antitripsina. (Amălinei et al., 2007) As metaloelastases são de grande importância no processo de migração dos macrófagos (Visse & Nagase, 2003).

A MMP-19, além de conseguir degradar várias moléculas da ECM desempenha também um papel importante na cicatrização de feridas, na migração celular epitelial e na remodelação de tecidos. É também conhecida como RASI (*rheumatoid arthritis synovial inflammation*) pois foi encontrada nos linfócitos e no plasma de pacientes com artrite reumatóide, sendo por isso reconhecido como um antigénio, não só nos pacientes com esta doença auto-imune mas também em pacientes com lúpus (Nagase et al., 2006).

A amelogenina é uma proteína produzida pelos ameloblastos durante o desenvolvimento do esmalte dentário. A MMP-20 (Enamelisina) é expressa no esmalte recém-formado, digerindo precisamente a amelogenina. Além disso, foi descoberta a presença da enamelisina na matriz amilóide de alguns tumores odontogénicos. A MMP-20 está também ligada à amelogenese imperfeita, doença hereditária onde a produção do esmalte dentário é defeituosa, consequência precisamente de uma mutação no local de clivagem da MMP-20 (Amălinei et al., 2007; Murphy & Nagase, 2008; Visse & Nagase, 2003).

A MMP-22 foi primeiramente clonada a partir de fibroblastos de galinha. Mais tarde, através da análise da sua sequência de aminoácidos da proteína clonada constatou-se

que esta seria também uma metaloproteinase, neste caso, existente tanto nos humanos e nas galinhas. Ainda assim, esta é uma das MMPs menos conhecidas e as semelhanças entre a MMP-22 existente nas galinhas e a existente no homem é todavia muito baixa para se conseguir atingir mais informações significativas, sendo por isso a função desta enzima desconhecida (Amălinei et al., 2007; Visse & Nagase, 2003).

A MMP-21 primariamente foi descoberta nas rãs “Xenopus” e só mais recentemente encontrada em ratos e em humanos. Apesar de possuir todos os domínios característicos das MMPs, tem a particularidade de apresentar uma inserção de vitronectina entre o seu pro-domínio e o seu domínio catalítico, como podemos constatar observando a figura 4, onde esta inserção se encontra representada pela letra V. É expressa em vários tecidos tanto no homem adulto como no feto. Pode ainda ser encontrada nas células basais e nas células escamosas de carcinomas, bem como em macrófagos presentes em lesões granulomatosas da pele e nos fibroblastos de dermatofibromas. No entanto, a sua acção sobre os componentes da membrana extracelular é ainda algo desconhecida, contudo é sabido que possui actividade sobre as gelatinas (Murphy & Nagase, 2008; Nagase et al., 2006).

A MMP-23 ou MMP matriz cisteína é na sua grande maioria expressa em tecidos reprodutores, tais como nos ovários, nos testículos e na próstata, sugerindo o seu envolvimento no processo reprodutivo. A MMP-23 é também uma das excepções à estrutura base das metaloproteinases de matriz. Para uma melhor compreensão da estrutura desta enzima vamos recorrer a figura 4. Nesta figura podemos constatar que, à semelhança das matrilisinas, a MMP-23 também não possui o domínio da hemopexina tendo no seu lugar um domínio rico em cisteína, representado na figura 4 pela sigla “Ca”, ligado um domínio de natureza imunoglobular do tipo IgG, evidenciado na figura pela sigla “Ig” (Amălinei et al., 2007; Murphy & Nagase, 2008; Nagase et al., 2006).

A MMP-27 foi clonada através de fibroblastos de embrião de galinhas e nestas tinha a capacidade para degradar a gelatinas e a caseína, mas no que diz respeito aos humanos existe ainda muito pouca informação disponível sobre a sua acção. No entanto, é sabido que a MMP-27 é expressa nos linfócitos B e a sua concentração aumenta quando são introduzidos anti-IgG’s ou anti-IgM’s à cultura (Murphy & Nagase, 2008; Nagase et al., 2006).

A MMP-28 expressa-se em vários tecidos do organismo humano, como por exemplo, nos pulmões, na placenta, no coração, no tracto gastrointestinal e nos testículos. Esta enzima pode ser encontrada nos queratinócitos da pele e assume-se que desempenha um papel activo na cicatrização. A Epilisina pode ser também encontrada em quantidade elevada na cartilagem de pacientes que sofrem de osteoartrite e artrite reumatóide (Murphy & Nagase, 2008; Nagase et al., 2006). No que diz respeito à organização dos seus domínios, podemos ver na figura 4 que a MMP-28 apresenta uma estrutura idêntica à estrutura da MMP-11.

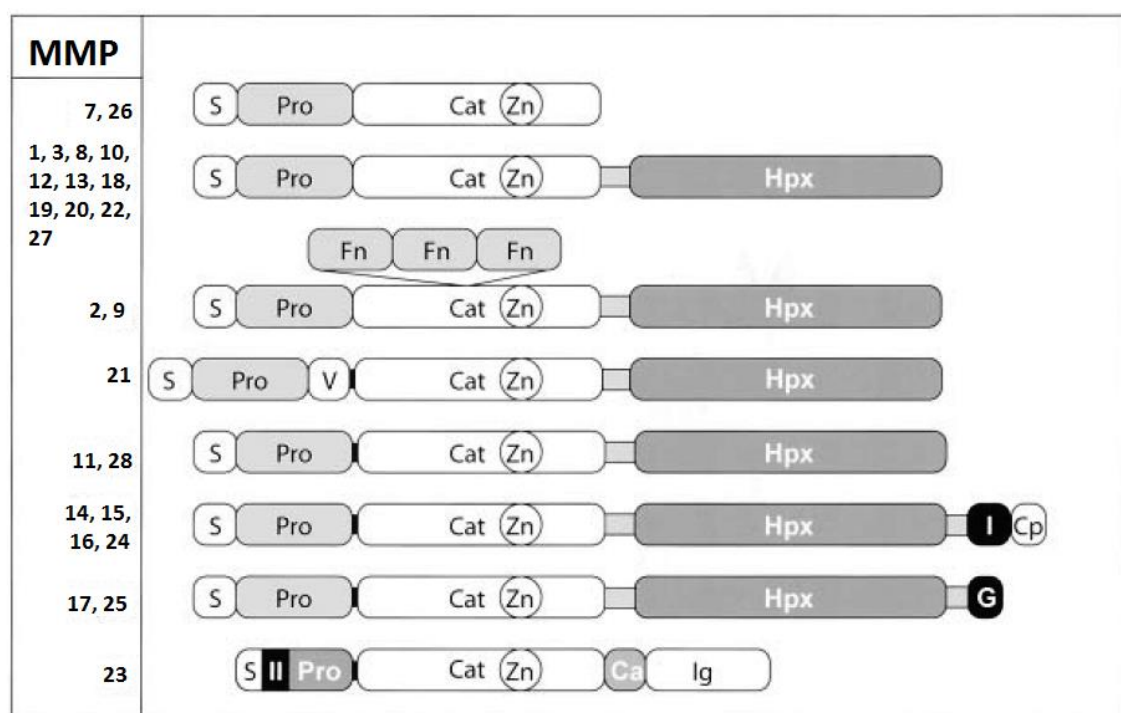


Figura 4. Resumo da estrutura de todas as MMPs referidas ao longo desta revisão. O “S” representa a sequência peptídica conhecida como “sequência sinal”; o “Pro” representa o pro-domínio; o “Cat” representa o domínio catalítico; o “Zn” representa o íão de Zinco (Zn²⁺) correspondente ao centro activo da enzima; “Hpx” representa o domínio de hemopexina; “Fn” é referente às cadeias de fibronectina do tipo II; a letra “V” refere-se a uma inserção de vitronectina; o “I” é referente a um domínio transmembranar de tipo I; o “II” é referente a um domínio transmembranar do tipo II; o “GPI” é referente à âncora de glicosilfosfatidilinositol; “Cp” é referente ao domínio citoplasmático; “Ca” é referente a uma região de cisteína; “IgG” é referente a um domínio de IgG’s. A banda de cor negra entre o pro-domínio e o domínio catalítico é um local de clivagem da enzima furina. (Imagem adaptada de Visse & Nagase, 2003)

d) Activação das metaloproteinases de matriz

As MMPs são produzidas por células de vários tecidos do organismo humano e, como já foi referido anteriormente, estão envolvidas na degradação de inúmeras proteínas. Devido a este facto, a maioria das MMPs são produzidas na sua forma inactiva, caso contrário estas enzimas poderiam danificar proteínas fora do local de acção desejado pelo organismo. Estas necessitam então de ser activadas através de um estímulo, que pode ser tanto endógeno como exógeno, para deixar a sua forma latente e ficarem activas. As MMPs na sua forma inactiva (proMMPs) apresentam a “sequência sinal” e o pro-domínio ligados ao seu domínio catalítico. As proMMPs mantêm-se nesta forma inactiva graças a uma ligação covalente formada entre o zinco do domínio catalítico e uma cisteína do pro-domínio, este mecanismo é conhecido como *cysteine switch* (Amălinei et al., 2007; Nagase et al., 2006; Visse & Nagase, 2003).

Existem várias mecanismos que podem desencadear a activação da enzima de proMMP em MMP *in vivo*, como por exemplo a tradução no reticulo endoplasmático, até os seus próprios inibidores podem acabar por activar a MMP através de um mecanismo de feedback e ainda podem ser activadas por outras proteinases como por exemplo, a plasmina. *In vitro*, estas podem ser activadas por agentes não-proteolíticos, agentes químicos (como o tiol, glutationa, dodecil sulfato de sódio (SDS), agentes caotrópicos e oxigénio reactivo). Em ambas condições (*In vivo e In vitro*), um pH reduzido e a temperatura alta promovem a activação das MMP (Amălinei et al., 2007; Nagase et al., 2006; Visse & Nagase, 2003).

Na figura 5 podemos observar tanto a activação proteolítica como a activação não proteolítica das proMMPs. Seja qual for o estímulo a enzima passa à sua forma activa sempre da mesma forma: deixa de existir a ligação covalente entre a cisteína do pro-domínio e o zinco do domínio catalítico; o péptido da “sequência sinal” e o pro-domínio separam-se da enzima e esta fica com o seu centro activo desimpedido para desempenhar as suas funções, ficando desta forma a MMP activa (Visse & Nagase, 2003).

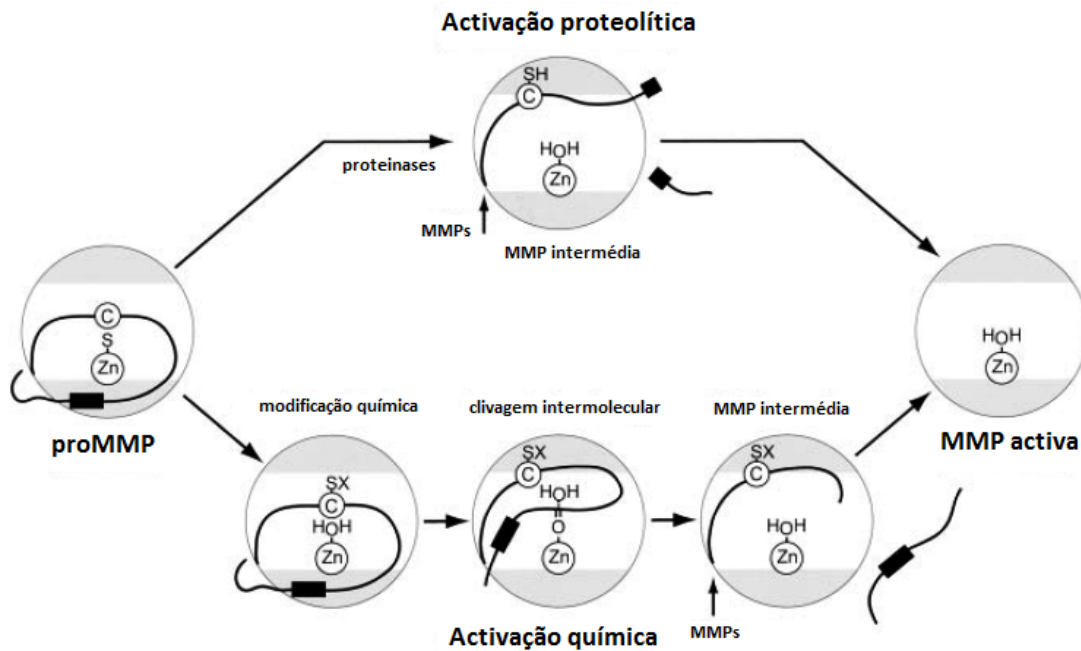


Figura 5. Activação proteolítica e activação não-proteolítica. Domínio catalítico representado pela parte cinzenta dos círculos; centro activo representado pela parte branca dos círculos contendo no seu interior um círculo menor com a sigla “Zn” correspondente ao Zinco (Zn^{2+}) do centro activo; a linha preta representa o pró-peptídeo do pró-domínio; a letra “C” representa o *cysteine switch*; a sigla “SH” representa o grupo sulfidrílo; a sigla “SX” representa o *cysteine switch sulphydryl*. (Imagem adaptada de Visse & Nagase, 2003)

A activação proteolítica é mediada pelo corte na região da ligação covalente que ocorre através de um ataque proteolítico na zona exposta entre a primeira e segunda hélice do pró-peptídeo (pró-domínio). A especificidade da zona onde ocorre a clivagem é ditada pela sequência de aminoácidos encontrada em cada MMP. Assim que há a clivagem, há uma destabilização da ligação e consequentemente a quebra do *cysteine switch*, ocorrendo a activação parcial da metaloproteínase, que podemos ver na figura 5 como MMP intermédia. A activação completa da mesma só ocorre quando há uma remoção total do pró-peptídeo, através de um processo intermolecular feita pela própria MMP (Amálinei et al., 2007; Visse & Nagase, 2003).

A activação das MMPs pela plasmina é um dos mecanismos mais relevantes *in vivo*. A plasmina é sintetizada pelo plasminogénio quando este é estimulado pelo activador de

plasminogénio tecidual (T-PA) e pelo activador de uroquinase plasminogénica. Ambos estão dependentes e associados à membrana celular havendo activação da proMMP localizada e conseqüentemente degradação da matriz extracelular. Sabe-se que a plasmina activa a proMMP-1, proMMP-3, proMMP-7, proMMP-9, proMMP-10 e proMMP-13. A activação gradual do sistema fez evoluir a existência de mecanismos melhorados para controlar a destruição das enzimas na medida em que as TIMPs podem interferir com a activação ao interagirem com os intermediários da MMP antes de estas se encontrarem totalmente activadas (Amălinei et al., 2007; Visse & Nagase, 2003).

A activação por intermédio de agentes químicos baseia-se na modificação do chamado *cysteine switch sulfhydryl* (SX) resultando numa activação parcial do MMP e na clivagem do propéptido intramolecularmente. A sua actividade total depende, tal como na activação proteolítica, da remoção do propéptido restante através de um processo controlado pela própria enzima. Todo este mecanismo é visível detalhadamente na figura 5 (Visse & Nagase, 2003).

Como já foi referido, a maioria das enzimas só sofre activação extracelularmente de forma a evitar danos nas células e só actuar num local específico. No entanto, foi demonstrado que a pro-MMP-11 é activada intracelularmente pela furina. Isto deve-se à existência de uma sequência de aminoácidos reconhecidos pela furina, Kx(R/K)R, no fim do terminal-C do propéptido. Outras MMPs, incluindo as seis MT-MMPs, MMP-23 e a epilisina (MMP-28) têm um mecanismo semelhante ao da MP-11. Como todas as proteínas referidas anteriormente são secretadas como enzimas activas, a sua inactivação através de inibidores endógenos (TIMPs) é crítica na regulação da sua actividade (Amălinei et al., 2007; Visse & Nagase, 2003).

A activação da MMP-2 é outra das excepções, não sendo activada pelas proteinases comuns (plasmina). A sua principal activação ocorre na superfície celular e é mediada pelas MT-MMPs, isto inclui: a MT1-MPP, MT2-MMP, MT3-MMP, MT5-MMP e MT6-MMP; sendo a única não responsável pela sua activação a MT4-MMP (Amălinei et al., 2007; Visse & Nagase, 2003).

A activação da proMMP-2 mediada pelas MT-MPPs foi estudada detalhadamente e tem um aspecto único: requer a assistência da TIMP-2. As MT1-MMP têm a particularidade poder formar dímeros na superfície da membrana, por interacção entre o domínio da hemopexina de duas MT1-MMPs. Após formado este dímero a TIMP-2 liga-se a uma

das MT1-MMPs activas, inibindo a sua actividade. A proMMP-2 forma um forte complexo através do seu domínio da hemopexina com o domínio C-terminal da TIMP-2 que está a inibir uma das MT1-MMPs do dímero. Após isto, a proMMP-2 liga-se à MT1-MMP do dímero que não está a ser inibida. De seguida, a MT1-MMP que está ligada directamente à proMMP-2 vai cortar a ligação entre o pro-domínio e o domínio catalítico, na zona de clivagem específica da proMMP-2. Desta forma, a proMMP-2 foi então activada em MMP-2 pela MT1-MMP que se encontrava livre da TIMP-2. Alternativamente, a MT1-MMP que foi inibida pela TIMP-2, pode funcionar como que um receptor para a proMMP-2 (Amălinei et al., 2007; Visse & Nagase, 2003). Para uma melhor compreensão, todo este mecanismo que foi descrito pode ser observado através da análise da figura 6.

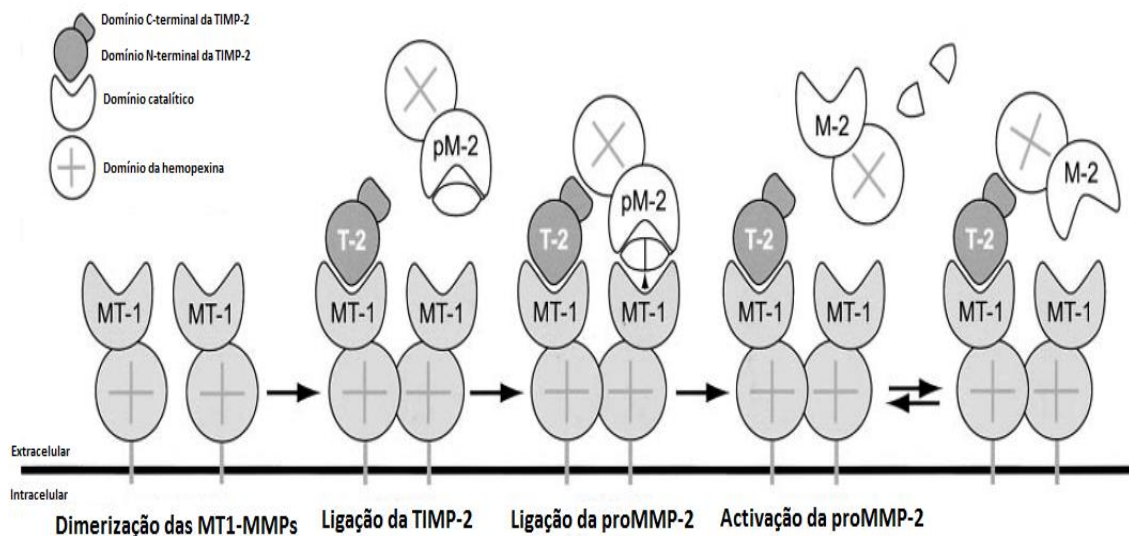


Figura 6. Activação da proMMP-2 pela MT1-MMP e pela TIMP-2. A MT1-MMP é representada na figura pela sigla “MT-1”; a proMMP-2 é representada na figura pela sigla “pM-2”; a sigla “T-2” representa a TIMP-2; a MMP-2 é representada nesta figura pela sigla “M-2”. (Imagem adaptada de Visse & Nagase, 2003)

e) Especificidade das MMPs para o seu substrato

A especificidade do substrato das MMPs tem sido estudada ou através da identificação dos locais de clivagem nos substratos, ou pela síntese de um conjunto de substratos pépticos. Maioritariamente, as MMPs clivam uma ligação peptídica imediatamente antes de um resíduo com uma cadeia lateral hidrofóbica, que contenha Leucina,

Metionina, Isoleucina, Fenilalanina e Tirosina. Uma ligação peptídica com resíduos carregados e na posição mencionada são raramente clivados, com a exceção da clivagem que ocorre na ligação X-Lys pela MMP-12. Os resíduos hidrofóbicos encaixam perfeitamente no *pocket* S1', cujo tamanho e formato difere consideravelmente entre as diferentes MMPs. Para além do *pocket* S1', outros locais de contacto (*subsites*) também participam na atribuição de especificidade das enzimas a diferentes substratos (Visse & Nagase, 2003).

Existem alguns casos em que os domínios não catalíticos influenciam a actividade da enzima, principalmente no que diz respeito à degradação das macromoléculas da ECM. Por exemplo, as cadeias de fibronectina do tipo II da MMP-2 e da MMP-9 são importantes na degradação do colagénio do tipo IV, das gelatinas e das elastinas. No caso da collagenase-1 (MMP-1), a região do *loop* que antecede a hélix do centro activo (RWTNNFREY) é essencial na actividade de degradação do colagénio. Além disso, o domínio da hemopexina e a dobra entre o domínio catalítico e o domínio da hemopexina também desempenham papéis importantes na degradação do colagénio (Visse & Nagase, 2003).

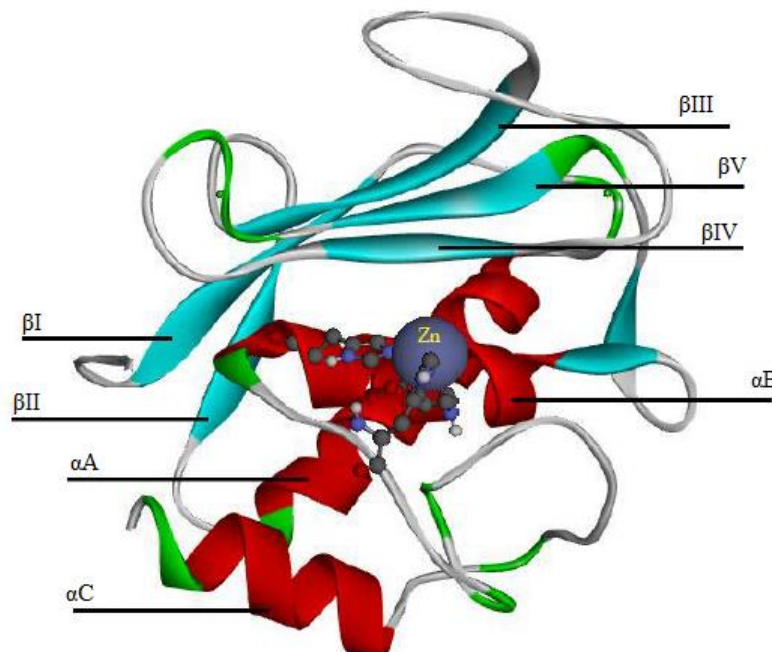


Figura 7. Representação *Solid Ribbon* de uma MMP-8 (ficheiro 1A85 do *RSCB Protein Data Bank*). As hélices- α apresentam-se como αA , αB e αC ; as folhas- β aparecem representadas como βI , βII , βIII , βIV e βV ; a bola azul corresponde ao Zinco do centro activo rodeado pelos átomos que correspondem aos três resíduos de histidina do domínio catalítico.

f) Inibição das metaloproteinases de matriz

1. Inibidores endógenos das metaloproteinases de matriz

Os dois maiores inibidores endógenos das metaloproteinases de matriz são a α 2-Macroglobulina, inibidores não-específicos e os inibidores tecidulares das metaloproteinases de matriz (TIMPs), inibidores específicos (Nagase et al., 2006).

A α 2-Macroglobulina é uma glicoproteína com 725 kDa composta por quatro subunidades idênticas com 180 kDa. Actua como um inibidor de proteases no espaço extracelular e pode ser encontrado no sangue e no fluido intersticial. A maioria das endopeptidases, independentemente das suas classes, é inibida por esta glicoproteína por incorporação da própria endopeptidase (Murphy & Nagase, 2008).

Os TIMPs são constituídos por um domínio N-terminal (extremidade amino-terminal) composta por uma sequência de cerca de 125 aminoácidos e um domínio C-terminal (extremidade carboxi-terminal) composta por uma sequência de cerca de 65 aminoácidos (Nagase et al., 2006; Raffetto & Khalil, 2008). Cada um dos dois domínios possui no seu arranjo molecular três pontes de dissulfito. O domínio N-terminal é totalmente responsável pela inibição das MMPs, ou seja, este domínio é capaz de inibir as MMPs independentemente do domínio C-terminal. (Raffetto & Khalil, 2008) Portanto, as TIMPs possuem ao todo entre 184 e 194 aminoácidos e contêm 12 cisteínas. Estudos realizados mostram que os TIMPs podem inibir um largo espectro de metaloproteinases (Murphy & Nagase, 2008).

Existem quatro inibidores tecidulares em humanos: o TIMP-1, o TIMP-2, o TIMP-3 e o TIMP-4. O TIMP-1 e o TIMP-3 são glicoproteínas e o TIMP-2 e o TIMP-4 não possuem hidratos de carbono. Estes quatro inibidores têm a capacidade de inibir todas as MMPs conhecidas e testadas até ao momento (Murphy & Nagase, 2008).

1.1. Inibidores tecidulares das metaloproteinases de matriz (TIMPs)

Os inibidores tecidulares das metaloproteinases (TIMPs) são inibidores específicos das MMPs e inibem estas enzimas por inibição competitiva, ligando-se ao seu centro activo de uma forma semelhante ao substrato das mesmas. Os quatro resíduos de cisteína presentes no domínio N-terminal do TIMP ligam-se ao centro activo da MMP de maneira similar ao substrato. Três resíduos de cisteína formam pontes de dissulfito com a enzima. Um dos quatro resíduos de cisteína é apenas instrumental na quelação do Zinco do centro activo pelo grupo α -amino e pelo grupo carbonilo que expõem a molécula de água que se encontra no centro activo. Como já referido, existem quatro TIMPs: o TIMP-1; o TIMP-2; o TIMP-3 e o TIMP-4. A sua expressão é regulada durante o desenvolvimento e a remodelação dos tecidos e alterações no nível das TIMPs são importantes pois estas afectam directamente a actividade das MMPs (Murphy & Nagase, 2008; Visse & Nagase, 2003).

O inibidor tecidular das metaloproteinases TIMP-1, como já foi referido anteriormente, tem a capacidade de inibir a actividade da maioria das MMPs. São inibidas pelo TIMP-1 sobretudo a MMP-1, a MMP-2, a MMP-3 e a MMP-9, que se liga a estas quatro metaloproteinases inactivando as mesmas. Além disso, o TIMP-1 consegue ligar-se ao domínio da hemopexina da proMMP-9, formando um complexo que impede a activação da enzima. Este inibidor revela-se como um fraco inibidor da MT1-MMP e da MMP-19 (Amălinei et al., 2007; Visse & Nagase, 2003).

O TIMP-2 consegue inibir a maioria das metaloproteinases de matriz excepto a MMP-9. Podemos observar a estrutura tridimensional deste inibidor observando a figura 2. O TIMP-2 consegue ligar-se ao domínio da hemopexina da proMMP-2, como podemos constatar na figura 2, impedido assim a sua activação (Amălinei et al., 2007).

O TIMP-3 inibe a actividade da MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-9 e MMP-13. O TIMP-3 é o único dos inibidores tecidulares das metaloproteinases de matriz que inibe também as ADAMs, sendo mesmo um inibidor mais eficaz da ADAM-17 do que das próprias MMPs. Este inibidor que passa mais tempo ligado à matriz extracelular do que na forma de proteína livre, sendo por isto, diferente de todas as outras (Amălinei et al., 2007; Raffetto & Khalil, 2008; Visse & Nagase, 2003).

O TIMP-4 é o inibidor das metaloproteinases de matriz descoberto mais recentemente. Este consegue inibir a actividade da MMP-2, MMP-9 e MMP-7. A sua actividade é expressa sobretudo no coração e no sistema vascular (Amálinei et al., 2007; Raffetto & Khalil, 2008).

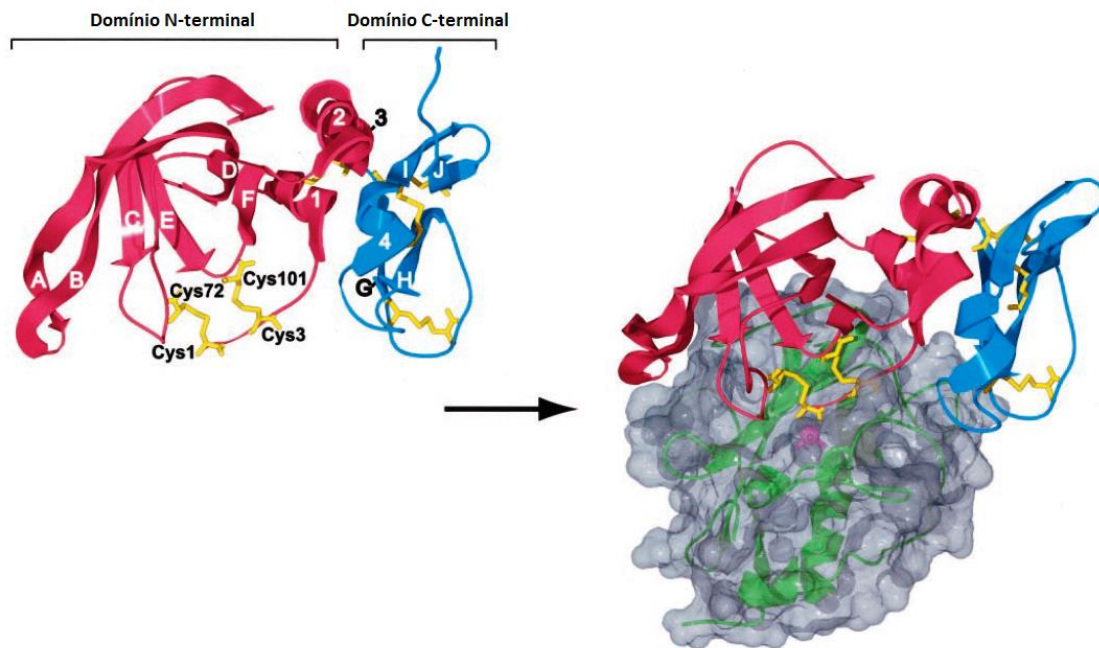


Figura 8. Inibição de uma MMP por um TIMP. À esquerda na figura aparece representada a estrutura da TIMP-2, à direita na figura aparece o complexo de inibição formado entre a TIMP-2 e a MT1-MMP. Referente a TIMP-2, esta aparece dividida pelo seu domínio N-terminal (à esquerda da TIMP-2) e o seu domínio C-terminal (à direita da TIMP-2). As letras de A a J representam as folhas- β ; os números de 1 a 4 representam as hélices- α ; as quatro cisteínas estão representadas como Cys1, Cys3, Cys72; Cys101. (Imagem adaptada de Visse & Nagase, 2003)

2. Inibidores sintéticos das metaloproteinases de matriz

Como já foi referido neste trabalho, as MMPs parecem estar na base de várias doenças do organismo humano. Deste modo, surgiu a necessidade de realizar estudos aprofundados sobre as MMPs e os seus inibidores com o objectivo de sintetizar substâncias com a capacidade de controlar a actividade destas enzimas e dessa forma encontrar tratamento para as referidas patologias.

Tem existido uma grande dificuldade em se obter um inibidor das metaloproteinases de matriz (MMPi) que reúna a selectividade necessária para a MMP pretendida juntamente com uma efectividade na homeostase da MMP durante a progressão de determinada doença. Os avanços científicos realizados na área mostraram que a actividade enzimática das MMPs é caracterizada por uma grande complexidade. Esta mesma complexidade parece ser a base da participação das MMPs nas referidas doenças o que tem levado a avanços químicos numa busca incessante pela síntese de um MMPi eficaz e selectivo nas últimas décadas. No entanto, este inibidor está ainda para ser encontrado (Fisher & Mobashery, 2006).

A dificuldade em encontrar um MMPi assenta na complexidade da química dos compostos. Estes apresentam um largo espectro de acção quando o que é pretendido é uma selectividade para uma MMP específica. São também instáveis metabolicamente e a principal preocupação é a grande toxicidade que estes acarretam para o organismo. Por tudo isto, nos últimos anos surgiu uma revolução no *design* das estruturas de novos inibidores das MMPs (Fisher & Mobashery, 2006; Puerta, Lewis, & Cohen, 2004).

A cura para o cancro tem estado na base de todos os esforços levados a cabo ao longo de décadas, sendo mesmo a patologia mais grave na qual as MMPs desempenham um papel activo. Este facto tem sido o principal impulsionador e tem servido de mote para encontrar um inibidor capaz de controlar a actividade das MMPs e consequentemente vencer a doença. Um inibidor de MMPs para ser um anticancerígeno eficaz deve apresentar selectividade para a MMP alvo, o seu efeito deve ser rápido para evitar as metástases e deve ser regulado mecanicamente para inibir a degradação da membrana e parar a progressão da doença. No entanto, nada invalida que um MMPi sintetizado com o objectivo de actuar sobre o cancro revele o seu valor no tratamento de outras doenças (Fisher & Mobashery, 2006).

Os inibidores das metaloproteinase produzidos são normalmente divididos em inibidores à base de ácido hidroxâmico e inibidores sem ácido hidroxâmico. Muitos dos compostos químicos que serão falados de seguida não possuem um nome sendo conhecidos por nove números que compõem o seu *Chemical Abstracts Registry*. Mais à frente neste trabalho, podemos constatar que tem existido um progresso significativo de inibidores à base de ácido hidroxâmico de largo espectro para inibidores selectivos à

base de ácido hidroxâmico e inibidores selectivos sem ácido hidroxâmico (Fisher & Mobashery, 2006).

2.1. Primeiro Inibidores das metaloproteinases de matriz (MMPi)

Os primeiros inibidores das metaloproteinases sintetizados consistiam em estruturas contendo ácido hidroxâmico. Estes inibidores baseavam-se na produção de moléculas similares ao substrato das MMPs, como por exemplo o colagénio, e assim criar um péptido que fosse reconhecido pela enzima, ou seja, mimetizando o efeito do seu substrato, sendo chamado de péptidomimético. Esse péptidomimético, continha na sua estrutura um grupo químico de ligação ao Zinco apelidado de *Zinc Binding Group* (ZBG) constituído por um grupo à base de ácido hidroxâmico. Após a enzima reconhecer o péptido sintético, o ZBG ligava-se ao Zinco do centro activo da MMP promovendo a sua quelação e garantindo dessa forma a inibição da mesma (Fisher & Mobashery, 2006; Murphy & Nagase, 2008; Pirard & Matter, 2006; Pirard, 2007).

Os primeiros inibidores da metaloproteinase de matriz (MMPi) sintetizados tinham como alvo o tratamento do cancro. Apesar de nos ensaios *in vitro* revelarem uma excelente actividade anticancerígena sobre as células tumorais, o resultado dos ensaios *in vivo* foram decepcionantes. Estes primeiros MMPi à base de ácido hidroxâmico revelaram *in vivo* ser clinicamente inviáveis devido a diversos factores: apresentavam uma grande inviabilidade oral, pois eram susceptíveis à acção enzimática na boca tornando-se inactivos por hidrólise; eram muito instáveis no organismo e apresentavam grande falta de selectividade pois grande parte das MMPs reconhecia o péptido sintético tal como reconhece o colagénio, e desta forma, um inibidor desenvolvido para inibir uma MMP responsável por determinada doença iria também inibir outras MMPs não desejadas bem como outros membros da família das enzimas *Metzins*, como as ADAMs, criando assim vários problemas ao organismo. O facto do ZBG quelar o zinco levantava outro do problema, pois estes MMPi poderiam acabar por interferir também com outras proteínas que contêm Zinco e outros metais, sendo que 30% das proteínas humanas possuem metais é compreensível a extensão do problema (Coussens, Fingleton, & Matrisian, 2002; Fisher & Mobashery, 2006; Puerta et al., 2004).

Aquando dos ensaios *in vivo* tornou-se evidente que esta primeira geração MMPi à base de ácido hidroxâmico acarretava um grande número de reacções adversas, sendo uma delas a MSS (*musculoskeletal syndrome*). Esta síndrome é uma das reacções adversas

mais graves causada por estes inibidores e é caracterizada por dores muito dolorosas nos ossos e nos músculos. Pensa-se que estes efeitos adversos como a MSS se devem à fraca selectividade destes inibidores, o que levou a comunidade científica a procurar desenvolver MMPi mais selectivos de forma a contornar as reacções adversas que esta geração de inibidores de largo espectro acarreta (Fisher & Mobashery, 2006; Murphy & Nagase, 2008; Pirard & Matter, 2006; Pirard, 2007).

Na figura 9 podemos observar a estrutura de alguns dos primeiros MMPi possuindo o ácido hidroxâmico no seu ZBG.

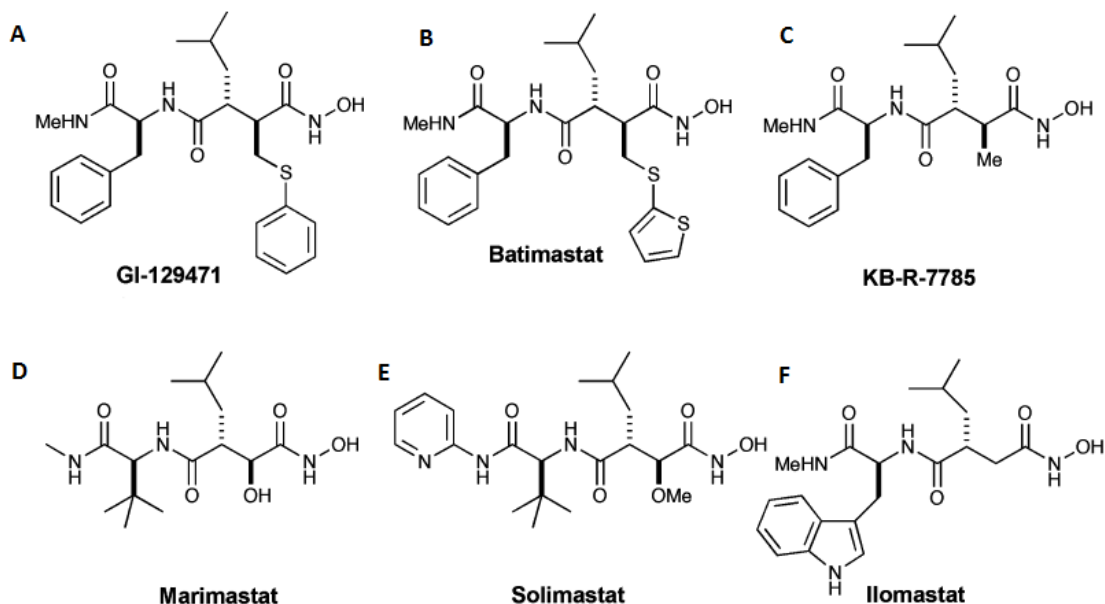


Figura 9. Estrutura química de inibidores das metaloproteínases de matriz (MMPi) de largo espectro de acção contendo um ZBG à base de ácido hidroxâmico ligado a um péptidomimético baseado no colagénio. (Imagem adaptada de Fisher & Mobashery, 2006)

Estes compostos foram estudados e avaliados ao longo de anos, sendo submetidos a vários ensaios clínicos, mas revelaram-se sempre inviáveis clinicamente, seja pela sua falta de eficácia, seja pela sua falta de selectividade e toxicidade (Fisher & Mobashery, 2006).

Tal como já foi referido anteriormente os primeiros inibidores sintéticos foram sobretudo produzidos como antineoplásicos. O Marimastat foi um destes compostos que

foi sujeito a vários ensaios clínicos e apresenta-se representado na figura 9 com a letra D e é um inibidor das MMPs 1, 2, 3, 7, 9 e 12. Num ensaio de fase III em pacientes que sofriam de cancro da mama com metástases, a dose oral num regime b.i.d. mostrou-se ineficaz além de ter apresentado um gradiente de II e III na escala de toxicidade musculoesquelética. Noutro ensaio de fase I também com Marimastat, mas desta vez combinado com carboplatina e paclitaxel, em pacientes com cancro de células não pequenas do pulmão em estado avançado, obteve-se uma resposta parcial em 12 doentes num universo de 21 pacientes e observou-se uma estabilização da doença noutros 5. Um ensaio clínico de fase I/II com pacientes que tiveram um reaparecimento do cancro da próstata, o Marimastat mostrou resultados eficazes em atrasar a progressão da doença, no entanto, a toxicidade apresentada pelo fármaco voltou a não ser a melhor, permitindo apenas a administração de doses muito pequenas do MMPi, o que mais uma vez comprovou o principal problema com estes primeiros inibidores, as suas limitações em termos de selectividade e toxicidade. Por tudo isto, chegou-se à conclusão que enquanto não se procedesse a um ajuste na estrutura química destes MMPi que fornecesse selectividade ao fármaco e pusesse termo à sua toxicidade, nenhum MMPi atingiria o seu objectivo clínico, neste caso específico, em termos de quimioterapia (Fisher & Mobashery, 2006).

Estes resultados desapontantes apresentados pelos primeiros inibidores sintéticos de largo espectro podem ser comprovados pela análise da tabela 2, em que foi comparada a actividade de inibição sobre a MMP-3 de dez de 11 novos ZBG de grande potencial inibidor sintetizados como alternativa aos ZBG à base de ácido hidroxâmico (compostos da figura 11 numerados de 1 a 11) com um quelante representativo da maioria dos primeiros MMPi de largo espectro, o *acetohydroxamic acid* (AHA), cuja sua estrutura química se apresenta representada na figura 10 e o seu ZBG contendo o grupo de ácido hidroxâmico representado com a sigla AHA na figura 11 (Puerta et al., 2004).

Os 11 novos grupos químicos testados presentes na figura 11 foram escolhidos por apresentarem similaridades com o ácido hidroxâmico na forma de quelação deste, mas foram também escolhidos tendo em conta várias diferenças com este ZBG, como por exemplo uma melhor estabilidade hidrolítica proveniente das estruturas cíclicas; uma melhor tolerância por parte do organismo humano como é o caso do composto 5 da figura 11 que pode ser utilizado como aditivo alimentar (maltol); e maior afinidade para o Zinco (Zn^{2+}) do centro activo. Os grupos químicos escolhidos consistem em

hidroxipiridinonas (1, 2, 3 e 6), em hidroxipiridinationas (7, 8 e 9), em pironas (4 e 5) e em tiopironas (10 e 11) (Coussens et al., 2002; Puerta et al., 2004).

Após a análise comparativa entre o AHA e os novos MMPi podemos comprovar observando a tabela 2 que, excluindo apenas o novo composto 3 cuja actividade não pôde ser avaliada devido à sua baixa solubilidade, todos os novos compostos apresentaram um IC₅₀ inferior ao AHA. O IC₅₀ traduz a quantidade necessária de inibidor, necessária para inibir 50% das MMP-3 utilizadas no estudo, logo podemos concluir que estes novos ZBGs apresentam um potencial inibitório muito superior ao AHA, composto representativo dos primeiros inibidores de largo espectro, o que se revela ser mais uma prova do quão ultrapassados estes estão nos dias de hoje (Puerta et al., 2004).

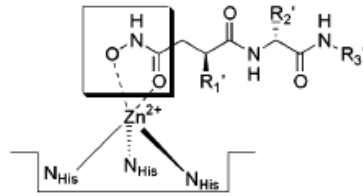


Figura 10. Estrutura química do *acetohydroxamic acid*, inibidor representativo de um inibidor de metaloproteinases de matriz (MMPi) de largo espectro característico dos inibidores de 1ª geração. O ZBG à base de ácido hidroxâmico apresenta-se dentro do quadrado, os restantes grupos representam o péptidomimético. (Imagem adaptada de Puerta et al., 2004)

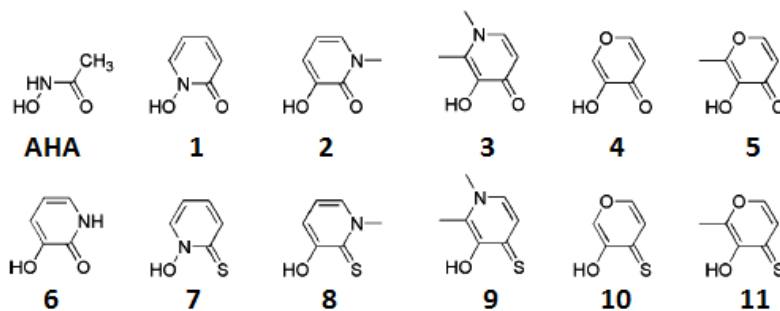


Figura 11. Novos ZBGs testados como alternativa aos ZBGs à base de ácido hidroxâmico. O grupo químico representado pela sigla “AHA” é referente ao *acetohydroxamic acid*; os grupos químicos representados pelos números 1, 2, 3 e 6 são referentes a hidroxipiridinonas; os grupos químicos representados pelos números 7, 8 e 9 são hidroxipiridinationas; os grupos químicos 4 e 5 são referentes a pironas; os grupos químicos 10 e 11 são tiopironas. (Imagem adaptada de Puerta et al., 2004)

ZBG	IC ₅₀ (μM)		
	fluorescence ^{a,b}	colorimetric ^a	potency vs AHA ^c
AHA	25100 (±4000)	–	n/a
1	1600 (±100)	1500 (±10)	16-fold
2	5100 (±200)	–	4.9-fold
4	7200 (±1200)	8300 (±900)	3.5-fold
5	5700 (±100)	16000 (±2000)	4.4-fold
6	5700 (±200)	5000 (±1000)	4.4-fold
7	35 (±3)	20 (±4)	717-fold
8	362 (±3)	–	69-fold
9	137 (±20)	–	183-fold
10	118 (±40)	–	213-fold
11	210 (±20)	–	120-fold

Tabela 2. Valores do IC₅₀ dos ZBGs sobre a MMP-3. O IC₅₀ traduz a quantidade de inibidor de metaloproteinases de matriz (MMPi) necessária para inibir metade da quantidade de MMP-3. Dentro do quadrado vermelho podemos observar os resultados, obtidos por fluorescência, de cada um dos novos ZBGs e do AHA. (Tabela adaptada de Puerta et al., 2004)

2.2. Objectivos do *design* de novos MMPi

A nova geração de estruturas contendo ácido hidroxâmico no seu ZBG estão ainda por ser descobertas. No entanto, existem três direcções principais no *design* de novos compostos.

A primeiras das três é a síntese de novos compostos utilizando grupos que não o ácido hidroxâmico no seu ZBG ao contrário do que se passava com os primeiros inibidores de largo espectro das MMPs. Apesar do ácido hidroxâmico ser extremamente eficiente na quelação do Zinco, a não ser que as estruturas do péptidomimético sejam completamente alteradas e optimizadas, estes MMPi nunca terão os resultados pretendidos. Como tal, surgiu uma nova geração de inibidores: aqueles que utilizam um ZBG diferente, podendo estes MMPi conter ou não a parte do péptidomimético; e aqueles que se baseiam no *design* de novos princípios como os derivados de tetraciclina, tióis, pirimidinas, pironas, entre outros (Fisher & Mobashery, 2006).

A segunda direcção baseia-se no *design* de inibidores selectivos para certas metaloproteinases de matriz responsáveis por determinadas doenças, como por exemplo, encontrar um MMPi eficaz na inibição da MMP-13, responsável pela osteoartrite, e sobretudo com o objectivo de encontrar um MMPi que se revele numa terapêutica anticancerígena eficaz. Outro objectivo bem demarcado desta segunda direcção é encontrar inibidores selectivos das metaloproteinases de matriz que permitam desta forma pôr termo à MSS provocada pela falta de especificidade das MMPi (Fisher & Mobashery, 2006).

A terceira e última direcção é utilizar a própria estrutura das MMPs como base para o *design* de novos inibidores selectivos. A descoberta de MMPi selectivos vai possibilitar aumentar a eficácia do inibidor e diminuir a toxicidade do mesmo como já vimos anteriormente. É muito importante comprovar experiencialmente a actividade destes MMPi e a produção destes já se encontra a decorrer. Na verdade, nenhum novo MMPi é preparado sem se ter acesso detalhado a estrutura da MMP alvo, que vai servir precisamente de base à produção do novo inibidor. Actualmente o número conhecido de estruturas de MMPs, de pro-MMPs e de complexos inibitórios de MMPs é já substancial e permite perceber as diferenças e semelhanças entre determinados locais das MMPs, como os chamados *pockets*. A análise computacional destas estruturas permite confirmar a maior contribuição dos *pockets* S1' e S2 para interacções selectivas, o que se tem mostrado determinante nesta estratégia de *design* de novos fármacos (Fisher & Mobashery, 2006).

2.3. Nova de geração de MMPi com ZBG à base de ácido hidroxâmico

A estrutura que desempenha um papel fulcral na transição entre os primeiros inibidores das metaloproteinases de largo espectro e a nova geração de MMPi à base de ácido hidroxâmico é provavelmente o MMI-270, representado na figura 12 com a letra A (Fisher & Mobashery, 2006).

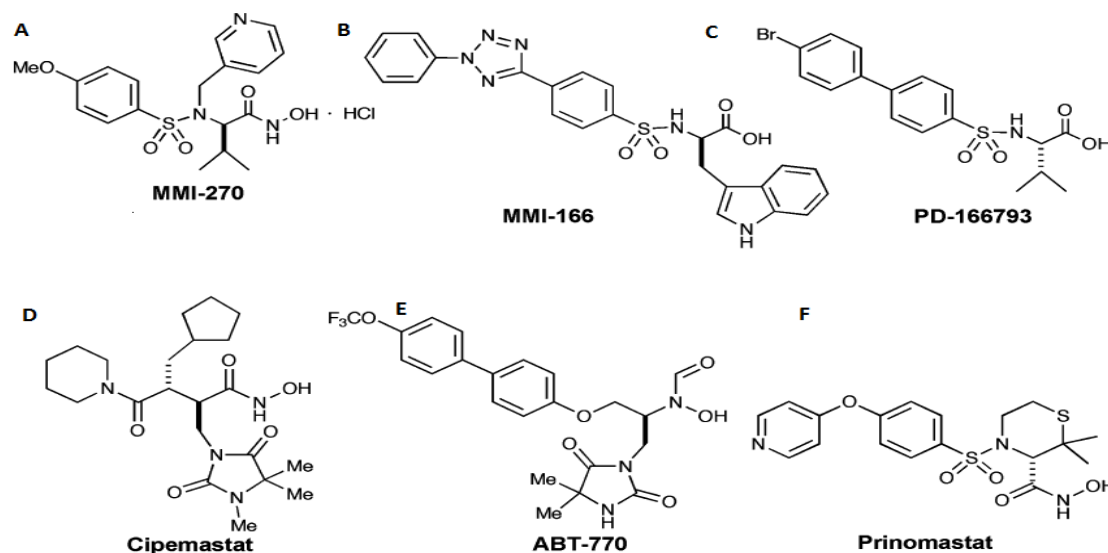


Figura 12. Estruturas de inibidores contendo grupos de ácido hidroxâmico e grupos de carboxilatos ligados a um péptidomimético. (Imagem adaptada de Fisher & Mobashery, 2006)

Esta molécula tem como características a possibilidade de administração oral, solubilidade em água, uma baixa massa molecular e ainda um largo espectro de acção. Apesar das características principais desta molécula se deverem à sua semelhança com as estruturas da figura 9 que lhe serviram de origem, é a sua simplicidade relativa que enfatiza os atributos estruturais que conferem a inibição à MMP. Observando a estrutura do MMI-270 na figura 12 podemos observar, da esquerda para a direita, que este possui um grupo arilo e um grupo acilo ligado a um aceitador, neste caso é a uma sulfonamida, separados por dois átomos do ácido hidroxâmico do *Zinc Binding Group*. Esta possui uma cadeia lateral de aminoácidos que tem substituintes no carbono α do ácido hidroxâmico e tem uma segunda cadeia lateral cuja substituição se encontra no nitrogénio da sulfonamida. O ácido hidroxâmico N-arilosulfonil- α mimetiza a acção do ácido succínico ou do *butanedioato* do Marimastat. Este composto, no entanto, tal como os primeiros inibidores de largo espectro apresentou instabilidade metabólica e provocou o aparecimento de MSS nos pacientes, não sendo por isso uma alternativa viável (Fisher & Mobashery, 2006).

O Cipemastat foi desenvolvido para ser um inibidor das MMPs 1, 3 e 9 e ser usado no tratamento da osteoartrite. Este também possui o ácido succínico e apesar de ter

apresentado eficácia em animais os ensaios clínicos deste composto terminaram prematuramente (Fisher & Mobashery, 2006).

O composto MMI-166 tem como ZBG um *N-arylsufonyl- α -aminocarboxylate*. Trata-se de um inibidor das metaloproteinases de matriz 2, 9 e 14. Apesar de ter demonstrado em vários modelos animais actividade anticancerígena sobre cancro dos pulmões, melanoma, carcinoma de células escamosas, cancro do colon e cancro cervical não existem registos sobre a sua performance em termos clínicos em humanos. Podemos perceber melhor a estrutura do MMI-166 observando a estrutura B da figura 12. A característica estrutural mais relevante é o seu “fundo” grupo arilo, neste caso uma substituição triarilo. Ainda relativamente à estrutura química deste composto, podemos ver através da observação da figura 12, da esquerda para a direita, os dois anéis fenilo ligados por um anel tetrazole (Fisher & Mobashery, 2006).

Relativamente ao composto ABT-770 representado na figura 12 com a letra E e ao composto PD-166793 representado na mesma figura com a letra C, os seus dois anéis fenilo estão directamente ligados; o composto Prinomastat representado na figura 12 com a letra F tem um átomo de oxigénio a ligar os seus dois anéis de fenilo. As características destes três inibidores afastam a sua selectividade da MMP-1, pois esta apresenta *pockets* pouco profundos, e as características destes compostos torna-os selectivos para *pockets* de maior profundidade como os MMPs semelhantes as gelatinases (Fisher & Mobashery, 2006).

A PD-166793, representado na figura 12 com a letra C demonstrou eficácia no tratamento da hipertensão arterial. O composto ABT-770, representado com a letra E na figura 12 é um ácido retrohidroxâmico que foi sintetizado com a finalidade de ser um inibidor que apresentasse uma maior actividade sobre a MMP-2 e sobre MMP-9 do que sobre a MMP-1. Este composto apresentou uma actividade anticancerígena significativa em modelos experimentais, mas em humanos são metabolizados muito facilmente provocando fosfolípidose (Fisher & Mobashery, 2006).

O Prinomastat, composto com a letra F na figura 12 é um dos inibidores mais estudados desta nova geração. Este tem um grupo *N-arylsufonyl- α -amino acid hydroxamate* e revelou-se um inibidor com grande eficácia como agente anticancerígeno em ensaios pré-clínicos quando administrado concomitantemente com paclitaxel e carboplatina. No entanto, há evidências de uma relação complexa entre a inibição do MMP e a metástase

de alguns cancros, já que o Prinomastat provoca inibição da MT1-MMP, responsável pela proteólise da vitronectina, facto que acaba por promover as metástases. Mais tarde, este inibidor mostrou ter actividade sobre a diabetes *mellitus* tipo I em modelos experimentais. Um estudo de fase I descreve que passados dois meses de terapêutica com o Prinomastat em doses elevadas surgiram casos de mialgia, artralgia e MSS. Também num ensaio de fase III com o mesmo inibidor contra cancro de células não pequenas do pulmão o Prinomastat mostrou-se ineficaz (Arlt, Kopitz, Pennington, & Watson, 2002; Fisher & Mobashery, 2006).

Como podemos observar, os compostos da figura 12 estiveram longe de atingir o resultado esperado, apresentando sempre problemas como a falta de eficácia, falta de selectividade, sem esquecer das reacções adversas provocadas por estes. Os problemas desta geração de inibidores assentam sobretudo na perda do ZBG do composto seja pela redução do ácido hidroxâmico a amida, seja pela sua hidrólise a ácido carboxílico, seja pela sua conjugação a ácido glucorónico (Fisher & Mobashery, 2006).

Pelos motivos que se prendiam com a metabolização indesejada do ZBG à base de ácido hidroxâmico noutros compostos indesejados o desenvolvimento de novos inibidores desta geração focava-se precisamente em terminar com este metabolismo indesejado e aumentar a selectividade sobretudo para a MMP-2, MMP-9, gelatinases e MMP-13 através da síntese de estruturas com um novo *design*. Desta forma surgiram os inibidores da figura 13 (Fisher & Mobashery, 2006).

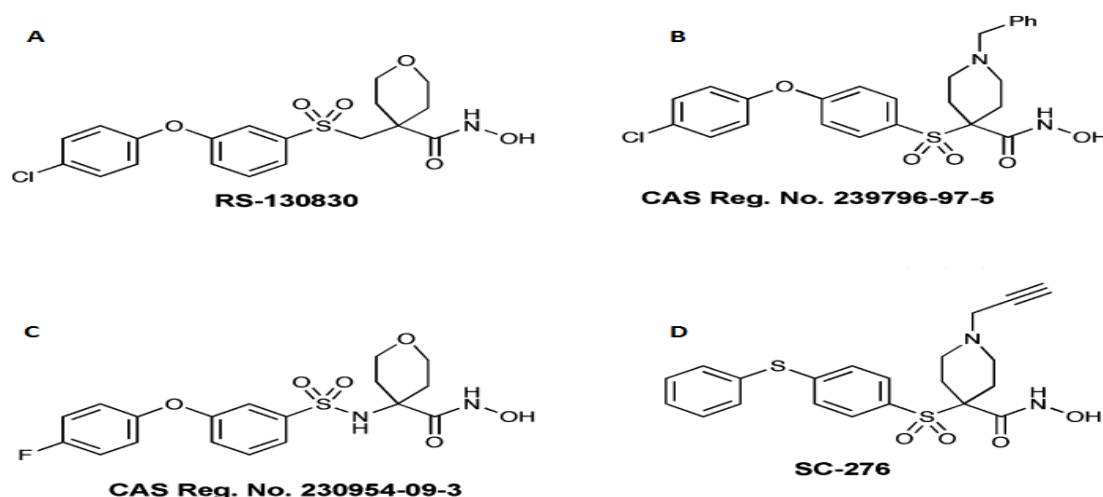


Figura 13. Estrutura de novos inibidores de metaloproteinases *diaryl ether hydroxamates* (Imagem adaptada de Fisher & Mobashery, 2006)

Todos os compostos da figura 13 possuem na sua estrutura química dois grupos arilo ligados entre si. Esta característica química é específica para MMPs que possuam um *pocket* S1' longo e estreito, o que de certa forma, exclui a MMP-1. O composto representado na figura com a letra A (RS-130830) foi sintetizado com o objectivo de ser um inibidor da MMP-13 e com a esperança de poder ser utilizado eficazmente como terapêutica contra a osteoartrite. O composto C (230954-09-3) é muito idêntico estruturalmente ao composto A, apresentando apenas a diferença de possuir um átomo de F em vez de um Cl, e foi testado em modelos animais que mais tarde apresentaram sintomas de MSS. Sendo os compostos A e C fracos inibidores da MMP-1, o aparecimento de MSS neste modelo animal sugeriu que a inibição desta enzima pode não estar na base desta patologia (Fisher & Mobashery, 2006).

Enquanto os compostos A e C comprovaram que podem ser administrados oralmente, o que pode ser uma mais-valia, os compostos B (239796-97-5) e o composto D (SC-276) revelaram uma ADME melhorada e uma selectividade para a MMP-1 concedida pela cadeia β -sulfonylhydroxamate (Fisher & Mobashery, 2006).

O composto 239796-97-5 é um excelente inibidor da MMP-9 e da MMP-13. Este composto representado pela letra B na figura 13 mostrou ter uma óptima eficácia, tão ou melhor que o composto RS-130830, quando administrado oralmente em modelos animais com osteoartrite. Já o composto SC-276 mostrou actividade inibitória para as MMPs 2 e 13 e revelou ser activo oralmente como fármaco antiangiogênico e anticancerígeno (Fisher & Mobashery, 2006).

A figura 14 que se segue ilustra um grupo de novos compostos, também eles com um ZBG à base de ácido hidroxâmico ligado a uma estrutura de um péptidomimético, fundamento que temos visto anteriormente (Fisher & Mobashery, 2006).

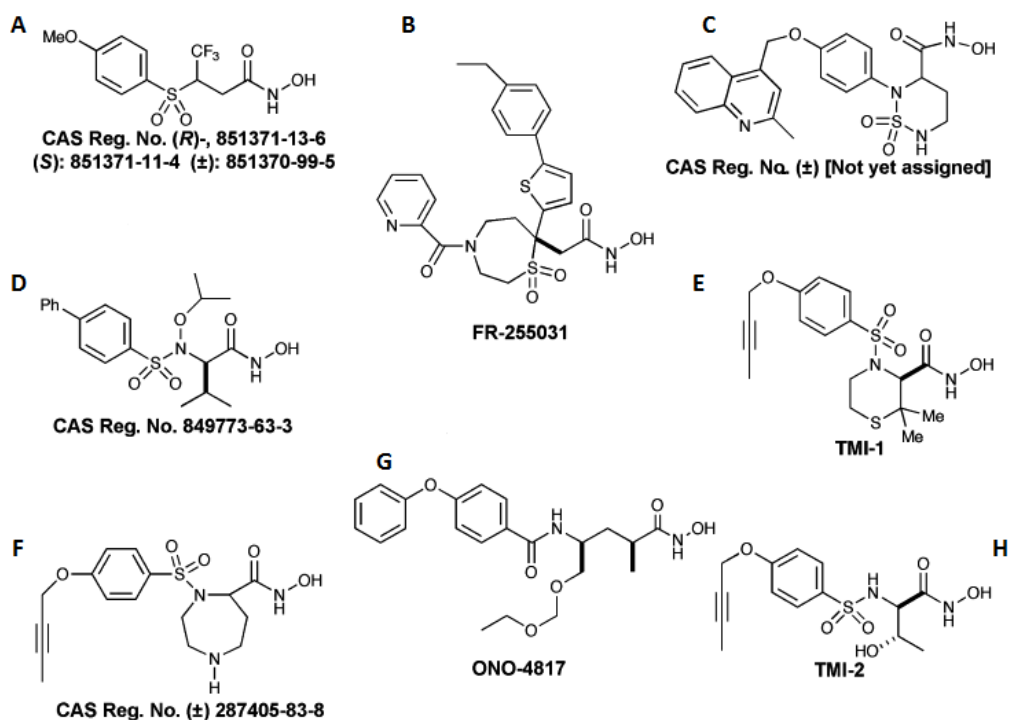


Figura 14. Novos inibidores MMPi de ácido hidroxâmico ligados a um péptidomimético (Imagem adaptada de Fisher & Mobashery, 2006)

Este grupo de estruturas químicas representa mais um conjunto de compostos sintetizados na sequência do *design* de novos MMPi. O composto 851371-13-6, representado na figura 14 com a letra A é um potente inibidor da MMP-3 e apresenta selectividade, embora não com a mesma efectividade, para a MMP-9 (Fisher & Mobashery, 2006).

O composto FR-255031, letra B na figura 14, ainda que fazendo parte desta nova geração de inibidores, tem um largo espectro de acção e apresentou eficácia contra a artrite em animais (Fisher & Mobashery, 2006).

O composto ONO-4817 apresentou disponibilidade oral e solubilidade em água. Este MMPi representado na figura 14 pela letra G apresentou também, à semelhança do FR-255031, um largo espectro de acção sobre as metaloproteinases e demonstrou também alguma eficácia no tratamento de doenças como o cancro, artrite, restenose, periodontite, hipercolesterolemia e colite inflamatória (Fisher & Mobashery, 2006).

Os compostos químicos 287405-83-8 representado na figura 14 pela letra F, o composto TMI-1 representado pela letra E e o composto TMI-2 representado pela letra H parecem ter demonstrado alguma actividade contra a artrite (Fisher & Mobashery, 2006).

Os inibidores compostos por um ZBG à base de ácido carboxílico ligado a um péptidomimético representado na figura 15 são também MMPi incluídos nesta nova geração de inibidores. A estrutura química representada pela letra A é referente a um composto químico que apresentou selectividade para a MMP-13, enquanto o composto representado pela letra B revelou ser um MMPi com selectividade para a MMP-2, MMP-9 e MMP-12 quando testado em animais nos quais foi induzido um enfisema (Fisher & Mobashery, 2006).

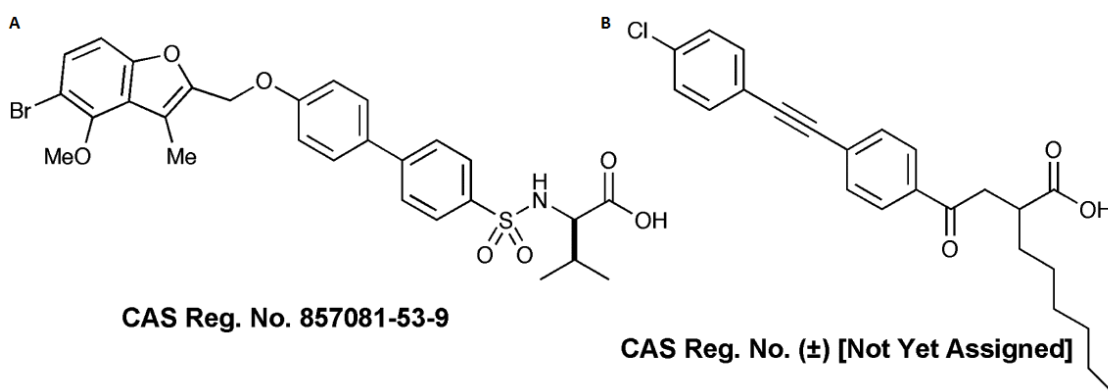


Figura 15. Novos inibidores *peptidomimetic carboxylates*. (Imagem adaptada de Fisher & Mobashery, 2006)

2.4. Nova geração de MMPi com ZBG à base de um grupo tiol

Esta geração de inibidores de metaloproteinases de matriz composta por um grupo de inibidores cujo seu *Zinc Binding Group* incorpora um grupo tiol. Na figura 16 estão representados quatro compostos químicos que foram estudados quanto a sua capacidade de inibir algumas MMPs (Fisher & Mobashery, 2006).

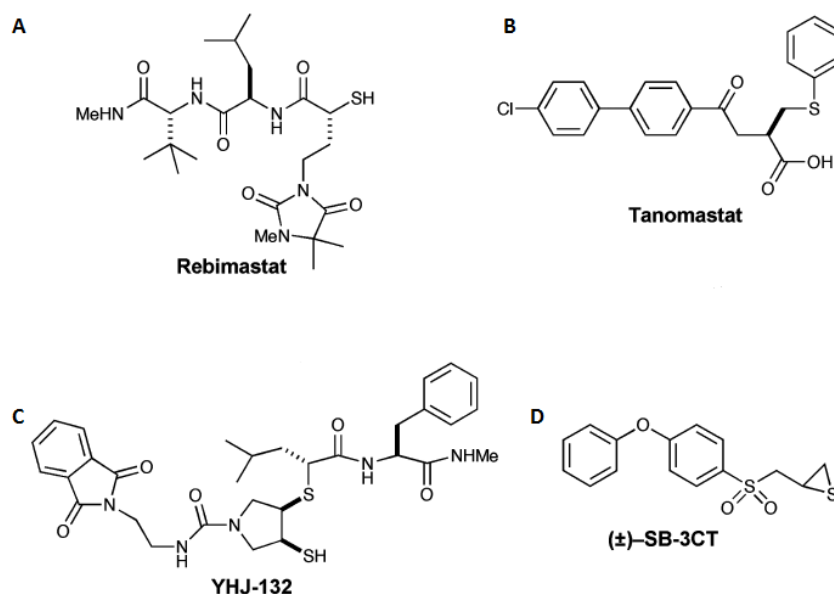


Figura 16. Novos inibidores com grupo tiol. (Imagem adaptada de Fisher & Mobashery, 2006)

Na figura 16, com a letra A, temos um composto químico conhecido como Rabimastat. Este composto foi um dos primeiros a ser sintetizado e a não possuir um ZBG à base de ácido hidroxâmico. O Rabimastat possui um ZBG à base de um grupo tiol, pode ser administrado oralmente e possui um largo espectro de acção, podendo inibir várias MMPs como a MMP-1, a MMP-2, a MMP-3, a MMP7, a MMP-9 e a MMP-14. O Rabimastat, ao contrário da grande maioria de MMPi que temos falado, não apresenta na sua estrutura um péptidomimético. No que diz respeito a ensaios clínicos, este MMPi foi administrado num ensaio de fase II em pacientes que sofriam de cancro da mama recentemente detectado e resultou em artralguas, o que foi interpretado como sendo resultado da toxicidade do MMPi, ou seja, como reacção adversa à administração do mesmo. Noutro ensaio, desta feita de fase III, o uso concomitante do Rabimastat com um regime de quimioterapia à base de paclitaxel/carboplatina, resultou no fim do estudo por não trazer qualquer tipo de efeito favorável. Portanto, apesar de inibir as MMPs, em termos práticos este inibidor não mostrou qualquer mais-valia (Fisher & Mobashery, 2006; Naglich, Jure-Kunkel, & Gupta, 2001).

Outro composto químico deste grupo é o Tanomastat. A sua estrutura química apresenta-se na figura 16 com a letra B. Este MMPi mostrou uma actividade inibitória superior para a MMP-2, MMP-3 e MMP-9 do que para a MMP-1 ou para a MMP-13,

ainda que também se revelasse efectivo na inibição destas duas últimas metaloproteinases de matriz. Relativamente a ensaios clínicos onde o Tanomastat foi testado, num ensaio de fase I em pacientes que sofriam de tumores sólidos num estado precoce este MMPi mostrou uma boa tolerância, no entanto, não revelou qualquer efeito considerável sobre o cancro. O Tanomastat, noutra ensaio de fase I, em doentes que sofriam de cancro em estado avançado, voltou a demonstrar uma boa tolerância por parte do organismo, mas de novo se mostrou ineficaz no tratamento da doença, mesmo num regime combinado com etopósido. A associação de Tanomastat com etopósido e cisplatina resultou numa toxicidade significativa, no entanto, a associação deste inibidor com doxorubicina num ensaio de fase I em pacientes com tumor sólido foi bem tolerado. Para finalizar, o estudo das associações deste MMPi com fármacos utilizados em quimioterapia, a toma de Tanomastat concomitantemente com 5-fluorouracilo e ácido folínico num ensaio de fase I em doentes que sofriam de tumor sólido, revelou também alguma toxicidade e chegou a provocar trombocitopenia (Fisher & Mobashery, 2006).

O composto químico YHJ-132 (letra C da figura 16) é um MMPi com actividade principalmente sobre a MT1-MMP mas também sobre a MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-7 e MMP-9. Este tipo de MMPi tem a capacidade também de inibição da proMMP-2 através da MT1-MMP. Como já referido, o YHJ-132 tem a capacidade de inibir a própria MT1-MMP e consequentemente inibir a degradação da fibronectina, o que pode ser extremamente benéfico aplicado a alguns tumores. Desta forma, este MMPi é visto como promissor inibidor potente e selectivo das MT1-MMP, estável e solúvel (Fisher & Mobashery, 2006).

Observando de novo a figura 16, podemos ver mais um inibidor deste grupo. O SB-3CT, representado pela letra D. Este composto químico apresenta um grupo de sulfeto de etilo. O sulfeto de etilo desta molécula liga-se ao Zinco do centro activo da metaloproteinase de matriz. Após essa ligação o sulfeto de etilo fica activado e abre o seu anel o que resulta numa ligação ao centro activo da enzima, inibindo-a durante um tempo mais prolongado do que as restantes inibições com outros compostos. O SB-3CT demonstra uma grande afinidade para a inibição da MMP-2 e para a MMP-9, o que a torna extremamente selectiva para estas duas metaloproteinases. Além disso, tem ainda a capacidade de inibir, ainda que de forma menos demarcada, as MMP-1, MMP-3 e MMP-7. A sua selectividade e sobretudo o seu mecanismo de inibição tornam este

composto químico único. No que diz respeito a ensaios, em experiências com animais, existem dados que indicam que este MMPi pode ser utilizado como um potente inibidor das metástases em linfomas de células T e que pode ter também efectividade sobre metástases de cancro da próstata quando as células tentam invadir o osso. Por fim, existe também literatura que documenta que o SB-3CT pode bloquear a degradação da laminina por parte da MMP-9. (Fisher & Mobashery, 2006)

2.5. MMPi com inibição baseada na pirimidina

Estes inibidores são caracterizados por não utilizam o ácido hidroxâmico no seu ZBG mas sim um grupo de ácido barbitúrico que podemos observar em qualquer das seguintes estruturas da figura 17. Dentro destes MMPi o mais conhecido é o composto Ro 28-2653. Este composto encontra-se representado, na figura acima referida, com a letra C. Este composto tem capacidade de inibir a MT1-MMP, a MT3-MMP, a MMP-2, a MMP-8 e a MMP-9. Este composto mostrou resultados ao reduzir o tamanho de tumores nasais em animais, em células de cancro da próstata em modelos animais submetidos a um xenoenxerto e em células de cancro da mama também em modelos animais por xenoenxerto. O Ro 28-2653 mostrou ainda capacidade em reduzir a vascularização de tumores, inibindo a actividade angiogénica da MMP-9e dessa forma inibindo a acção dos fibroblastos nesta vascularização. Segundo alguns autores (149 referencia) este composto pode ser administrados oralmente e é pouco provável que provoque as reacções neuromusculares adversas inerentes a alguns inibidores anteriores a este. Este composto inibe as MMPs por quelação do Zinco do centro activo através do seu grupo de ácido barbitúrico. Quanto à selectividade, este utiliza os seus grupos fenil e *piperidinyl* que ocupam, respectivamente, os *pockets* S1' e S2' da MMP-8 (Fisher & Mobashery, 2006).

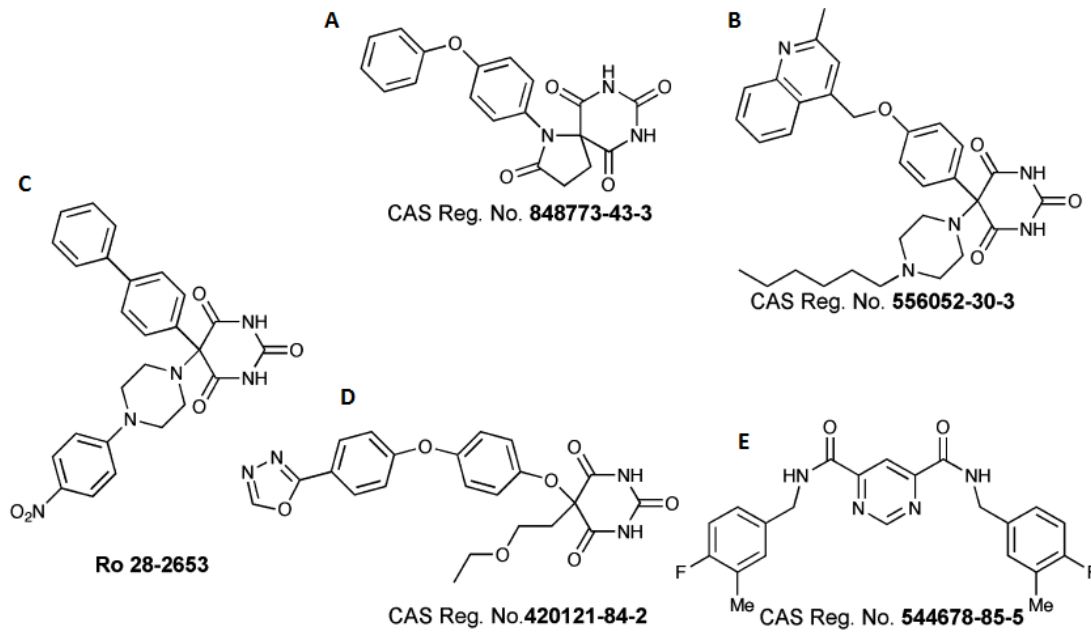


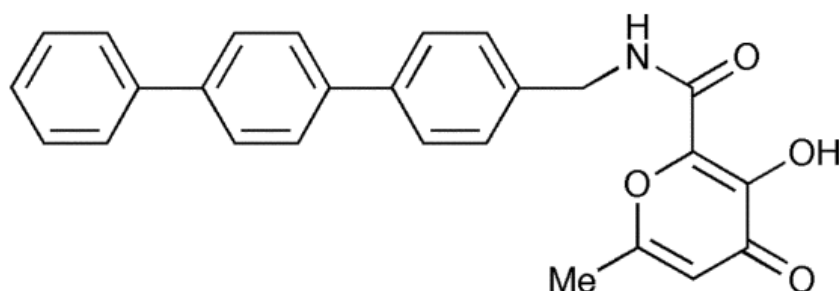
Figura 17. MMPi com grupo de ácido barbitúrico. (Imagem adaptada de Fisher & Mobashery, 2006)

O composto químico 556052-30-3, representado com a letra B, na figura 17 apresenta uma estrutura química muito semelhante ao Ro 28-2653, parecendo apresentar alguma actividade inibitória sobre as MMP-1, MMP-2, MMP-9 e MMP-13. O MMPi representado pela letra A na figura acima referida, o 848773-43-3 apresenta inibição sobre a MMP-2, MMP-9 e MMP-13. Observando ainda a figura 17, mais particularmente para o composto químico 420121-84-2, correspondente a letra D, é um MMPi que pode ser administrado oralmente. Apresenta actividade inibitória sobretudo na MMP-13, mas também na MMP-2, MMP-8 e MMP-12. Para terminar este grupo de inibidores, resta falar do composto químico 544678-85-5, representado na figura 17 pela letra E. Este MMPi é extremamente selectivo para a MMP-13 e apresenta um grande potencial inibitório sobre esta metaloproteínase de matriz. O complexo de inibição entre o 544678-85-5 e a MMP-13 revelou uma interacção entre os hidrogénios do composto químico com o *loop* Tyr244-Leu255 específico da MMP-13 sem haver qualquer contacto com o centro activo da enzima. A inibição da MMP-13 por este composto deve-se à ligação do MMPi com o *pocket* S1' da metaloproteínase, provocando assim uma alteração da conformação desta e consequentemente a enzima fica inibida pois não consegue ligar-se ao substrato. Este inibidor apresenta ainda uma boa disponibilidade oral o que aliado a tudo o que foi escrito anteriormente sobre este MMPi leva a

comunidade científica a crer que este possa vir a ser utilizado no tratamento da osteoartrite e no cancro da mama (Fisher & Mobashery, 2006).

2.6. MMPi com inibição baseada num grupo hidroxipirona

O composto 868368-30-3 apresenta uma estrutura química visível na figura 18. Este MMPi apresenta uma excelente selectividade para a MMP-3. Esta selectividade assenta na ocupação do *pocket* S1' da enzima por parte dos três grupos fenil do inibidor. Estes três grupos de fenil são visíveis na figura 18 à esquerda do composto. Em relação a inibição, esta dá-se através de uma quelação do Zinco do centro activo desta enzima através dos oxigénios do inibidor numa reacção ácido-base (Fisher & Mobashery, 2006).



CAS Reg. No. 868368-30-3

Figura 18. Estrutura química de um *pyrone* MMP inhibitor. (Imagem adaptada de Fisher & Mobashery, 2006)

Ainda em relação a este tipo de inibidores podemos observar na figura 11, com os números 4 e 5, dois grupos de pironas testados como alternativas aos ZBG à base de ácido hidroxâmico. Podemos visualizar que os grupos 4 e 5 desta figura são idênticos ao grupo que vai promover a inibição da figura 18. Através da análise da tabela 2 foi possível comprovar a maior eficácia de inibição da MMP-3 dos grupos 4 e 5 da figura 11 em relação à capacidade de inibição do composto AHA. O composto da figura 18, o 868368-30-3, é muito selectivo para a MMP-3 e o seu grupo inibitório é baseado numa pirona e também os grupos 4 e 5 da figura 11 são pironas e provaram ser melhores inibidores da MMP-3 do que a AHA, cruzando os dados da tabela 2 com o que sabemos sobre o composto químico da figura 18, permite-nos de certa forma confirmar a

veracidade em relação à grande selectividade e capacidade de inibição do composto 868368-30-3 sobre a MMP-3 uma vez que também se baseia num grupo pirona (Fisher & Mobashery, 2006; Puerta et al., 2004).

2.7. MMPi com inibição baseada em tetraciclinas

O composto químico que representa este grupo de MMPi é o Metastat e a sua estrutura química pode ser observada na figura 21. Este composto deriva das tetraciclinas antibacterianas e foi modificado quimicamente para ter uma actividade sobre as colagenases. Esta modificação química fez com que o composto perdesse a sua capacidade antibacteriana. As tetraciclinas são uma classe de inibidores naturais das metaloproteinases, sendo que o único composto aprovado como inibidor das MMPs é uma tetraciclina, a doxiciclina, utilizado na periodontite para inibir a actividade da MMP-7 e MMP-8 (Fisher & Mobashery, 2006).

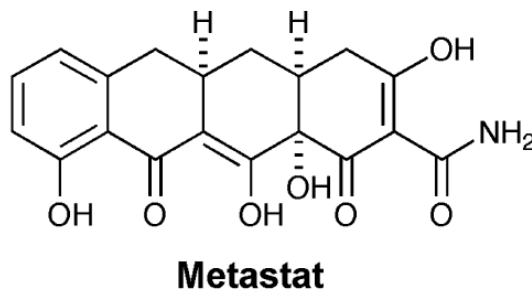


Figura 19. MMPi à base de uma tetraciclina quimicamente modificada. (Imagem adaptada de Fisher & Mobashery, 2006)

3. Papel dos subsites na inibição das MMPs

De modo a obter inibidores das metaloproteinases mais específicos procedeu-se à análise da estrutura das MMPs. As metaloproteinases de matriz apresentam uma estrutura e uma sequência de aminoácidos muito semelhante entre si, diferindo em poucos locais. No entanto, a zona onde as MMPs diferem mais uma das outras é a região do seu domínio catalítico que circunda o centro activo que contem o Zn^{2+} . Esta zona da enzima possui os chamados *subsites* ou *pockets*, que são muito específicos de cada MMP. Existem nas MMPs seis *subsites*, o S1, o S2, o S3, o S1', o S2' e o S3'. Os

pockets S1, S2 e S3 encontram-se à esquerda do centro activo enquanto o S1', S2' e o S3' encontram-se à direita do centro activo. Estes *subsites* têm também a capacidade de interagir com os substratos e com os inibidores das metaloproteinases de matriz, ainda que de uma forma menos eficiente que o centro activo. Como já foi referido, os *subsites* são muito específicos das MMP e cada *subsites* têm as suas próprias características, sendo os *pockets* da direita mais hidrofóbicos que os da esquerda. Os substratos e os inibidores capazes de se ligar a estes *pockets* têm o nome de P1, P2, P3, P1', P2' e P3' consoante o *pocket* com que vão interagir (Gupta & Patil, 2012; Jacobsen, Major Jourden, Miller, & Cohen, 2010; Lukacova et al., 2004; Murphy & Nagase, 2008; Pirard, 2007; Tallant et al., 2010).

O *pocket* mais importante e mais estudado tem sido S1'. Este *subsites* é chamado de *pocket* específico é o que revela maior importância devido a apresentar maior profundidade que os restantes, o que lhe confere uma forma de túnel que atravessa a estrutura da enzima, enquanto os restantes *pockets* não apresentam tanta profundidade. Além disso o *pocket* S1' apresenta uma grande hidrofobicidade o que pode revelar-se importante na altura de produzir um inibidor. A profundidade do S1' varia entre as MMPs consoante a sequência de aminoácidos presentes, o que pode ser desde logo um factor importante também na especificidade do inibidor (Cuniasse et al., 2005; Devel et al., 2010; Gupta & Patil, 2012; Lukacova et al., 2004).

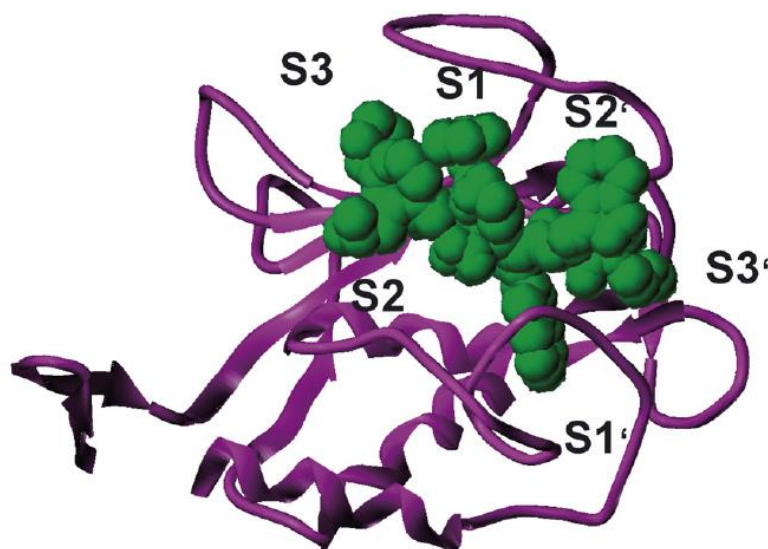


Figura 20. Estrutura do domínio catalítico de uma MMP e a localização dos seus *subsites*. Os *pockets* da metaloproteinase estão identificados por S1, S2, S3, S1', S2', S3'. (Imagem adaptada de Pirard, 2007)

g) Influência das MMPs em processos patológicos

A expressão das MMPs tem sido estudada e documentada ao longo de várias etapas do desenvolvimento humano: desde a nidação do óvulo até à formação morfológica de vários tecidos, como por exemplo, os pulmões, os ossos e as glândulas mamárias. Outros processos fisiológicos, incluindo o crescimento e a cicatrização dependem em grande parte da expressão destas enzimas. Da mesma forma, muitos processos patológicos, já referidos anteriormente, estão relacionados com a expressão das mesmas, sendo os mais importantes o cancro, as doenças cardiovasculares e a artrite. Vários ensaios clínicos sobre a influência das MMPs no aparecimento e na progressão das patologias mencionadas têm sido desenvolvidos e estudados na tentativa de encontrar a terapêutica adequada para os mesmos através de inibidores destas enzimas. Deduziram-se como os principais motivos para o aparecimento das mesmas, a natureza da célula, a fase das doenças e o genótipo do indivíduo (Murphy & Nagase, 2008; Raffetto & Khalil, 2008).

1. MMPs e o Cancro

Inúmeros estudos sobre este assunto correlacionaram a expressão das MMPs com esta patologia. As MMPs podem contribuir para o aparecimento do cancro não só através da degradação dos componentes da ECM mas também através da libertação de factores de crescimento que se encontram precisamente no interior destes componentes da matriz extracelular. Por exemplo, a MMP-9 é responsável pela extracção do factor de crescimento endotelial vascular a partir da ECM e cliva o colagénio do tipo IV levando a formação de tumastina que é um inibidor da angiogénese. As MMPs são também importantes na progressão do tumor e na invasão para outros tecidos (Murphy & Nagase, 2008; Raffetto & Khalil, 2008).

O principal problema tem residido em determinar especificamente o papel individual de cada MMP nesta patologia, no entanto esta tarefa tem vindo a ser facilitada com o crescente conhecimento em relação ao genoma humano e ao funcionamento fisiológico dos tecidos. Os avanços feitos nesta área são consideráveis: sabe-se que a MMP-1 e a MMP-2 mediam o aparecimento de metástases no tecido mamário; desenvolveu-se um ensaio (*Affymetrix Protease Microarray*) de forma a analisar a expressão das metaloproteinases e dos inibidores das mesmas no cancro do pulmão e concluiu-se que

a MMP-12 e MMP-13 estão também associadas a esta doença; as MMP-14 apesar de se poderem observar no crescimento de tumores, estes demonstraram pouca capacidade de se metastizar no tecido pulmonar, levantando também suspeita acerca do envolvimento desta enzima neste caso (Murphy & Nagase, 2008; Raffetto & Khalil, 2008).

A ablação dos genes que codificam para as MMP e os TIMPs em cobaias e o estudo dos efeitos consequentes na génese tumoral dos mesmos em animais tornou-se numa das principais abordagens para analisar a influência das enzimas na fisiopatologia do cancro. Ficou claro que as metaloproteinases desempenham papel activo no aparecimento e desenvolvimento da doença, como podemos ver pela análise da tabela 3 (Murphy & Nagase, 2008; Raffetto & Khalil, 2008).

2. MMPs e a Doença Vascular

Os vasos sanguíneos sofrem constantemente ajustes hormonais, neuronais e hemodinâmicos, ou seja, mudanças crónicas na função e na fisiologia vascular dependem quase sempre alterações estruturais na arquitectura do vaso sanguíneo. Sendo as MMPs enzimas que actuam principalmente na matriz extracelular, assume-se que estas irão ser umas das principais responsáveis pelas consequências a nível vascular, tanto positivas como negativas. Ainda assim, tem que haver uma maior elucidação no espectro de acção das mesmas e no papel específico de cada uma destas enzimas no desenvolvimento deste tipo de patologias para que haja a formulação de uma terapêutica cujo alvo sejam estas enzimas. As MMPs têm sido implicadas num aumento da espessura das paredes arteriais mas também num mecanismo conhecido como *intimal thickening*. Este mecanismo trata-se numa resposta do organismo para reparar as paredes das artérias de grande calibre lesadas pelas doenças ateroscleróticas bem como na consequente ruptura das placas ateroscleróticas (Murphy & Nagase, 2008; Raffetto & Khalil, 2008).

Estudos sugerem várias evidências da influência das MMPs e consequentemente dos seus inibidores endógenos na doença vascular: tanto a MMP-2 como a MMP-9 desempenham papéis importantes na ruptura de vasos sanguíneos depois do enfarte do miocárdio; a deficiência de TIMP-3 em animais desregulou a homeostase da matriz extracelular e causou dilatação ventricular esquerda, hipertrofia cardíaca e alterações na contracção cardíaca. No entanto, é de notar que a MMP-3 e a MMP-9 têm a capacidade

de retardar as doenças vasculares ao limitarem o crescimento e ao reforçarem placa arteriosclerótica evitando assim rupturas da mesma e consequentes coágulos. No entanto, tem sido identificado um espectro cada vez maior de MMPs (MMP-1, 2, 3, 9, 11, 12, 13 e 14) responsáveis pela destruição da matriz extracelular tendo envolvimento directo nas doenças vasculares ao contrário da regulação da mesma como se pensava até então (Murphy & Nagase, 2008; Raffetto & Khalil, 2008).

3. MMPs e artrite

A expressão das MMPs nas membranas sinoviais, cartilagens, tendões e nas junções musculares na artrite reumatóide e a na osteoartrite encontra-se bem documentada e está directamente relacionada com a destruição de tecido promovida por estas enzimas. Em ambas as patologias, mediadores inflamatórios estimulam a produção de MMPs que degradam a maioria dos componentes extracelulares da matriz. As collagenases (MMP-1 e MMP-3) são produzidas pelos fibroblastos sinoviais e por macrófagos e têm um papel crucial na artrite reumatóide e na osteoartrite já que elas medeiam a degradação do colagénio (Murphy & Nagase, 2008; Raffetto & Khalil, 2008).

Várias metaloproteinases têm sido associadas à degradação dos constituintes encontrados na matriz extracelular das articulações, existindo metaloproteinases responsáveis por degradar colagénio (MMP-14, MMP-18), proteoglicanos (MMP-13) e constituintes não relacionados com o colagénio (MMP-2, 3, 9, 10 e 19). As MMPs que degradam o colagénio estão envolvidas na regulação da matriz óssea ao terem um papel importante na destruição dos osteoblastos. Ainda assim a principal proteinase que influencia a degradação da matriz óssea é a proteinase cisteína – *cathepsin k*. Em suma, há alguns exemplos de que as MMPs têm influência na instabilidade da matriz óssea em condições patológicas como por exemplo, a MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-9, MMP-12 e MMP-14 (Murphy & Nagase, 2008; Raffetto & Khalil, 2008).

Gene	Influência sobre a patologia
Cancro	
MMP-2	Diminuição da tumorigénese do cancro pancreático
MMP-7	Diminuição da formação do adenoma intestinal
MMP-8	Aumento do tamanho de papilomas (homens)
MMP-9	Diminuição da tumorigénese do cancro pancreático
MMP-11	Atrasa a tumorigénese do cancro da mama
MMP-14	Acelera a tumorigénese do cancro da mama; reduz as metástases
MMP-9	Menos fibrosarcomas na pele; maior tempo de latência
TIMP-1	Supressão ou potenciação das metástases de cancro do pulmão. Aumento da sensibilidade do tumor à quimioterapia
TIMP-3	Aumenta a disseminação das metástases em melanomas e linfomas
Doenças vasculares	
MMP-2	Reduz a formação da neointima na vascularização da lesão Protecção contra ruptura cardíaca pós-infarte do miocárdio
MMP-9	Reduz a formação da neointima na vascularização da lesão Protecção contra ruptura cardíaca pós-infarte do miocárdio
MMP-11	Acelera a formação da neointima na vascularização da lesão
TIMP-1	Reduz a formação da neointima na vascularização da lesão Dilatação cardíaca espontânea, disfunção pós-enfarte do miocárdio aumentada
TIMP-3	Dilatação cardíaca espontânea
Artrite	
MMP-2	Aumenta a formação do complexo auto-imune
MMP-9	Diminui a formação do complexo auto-imune
MMP-12	Diminuição da contagem de macrófagos em lesões de ligamentos
MMP-13	Crescimento anormal e espontâneo das placas Aumento da formação de osso esponjoso
MMP-14	Osteogénese imperfeita, doença do tecido conjuntivo e artrite
TIMP-3	Aumento da resposta inflamatória

Tabela 3. Processos patológicos resultantes da ablação do gene que codifica para determinada MMP ou para determinado TIMP. Esta ablação genética foi promovida em modelos animais que serviram de cobaia. (Tabela adaptada de Murphy & Nagase, 2008)

Na tabela 3 podemos observar os efeitos das metaloproteinases e dos seus inibidores endógenos TIMP nas várias patologias referidas ao longo deste trabalho. Este efeito é passível de ser observado através do estudo de cobaias às quais lhe foram retirados os genes que codificam para uma determinada MMP ou para um determinado TIMP. Ao visualizar a tabela 3 é possível perceber o efeito que a falta de uma MMP ou de um TIMP tem no organismo do animal utilizado, sendo possível fazer uma proporção directa entre a relação individual de cada uma das metaloproteinases e dos seus inibidores endógenos com o Cancro, com Doenças Vasculares e com a Artrite.

III. CONCLUSÃO

As metaloproteinases de matriz, como podemos constatar ao longo deste estudo, estão envolvidas em inúmeros processos biológicos e patológicos. Este envolvimento deve-se sobretudo à sua capacidade para degradar um largo espectro de componentes da matriz extracelular o que lhes permite controlar a extensão da remodelação dos tecidos do organismo humano, sendo esta a sua principal função (Hannas et al., 2007; Visse & Nagase, 2003).

Esta degradação de proteínas constituintes da matriz extracelular é um processo biológico que necessita de ser controlado pelo organismo, pois sabemos que uma actividade em excesso das MMPs poderia gerar uma degradação em demasia, o que seria indesejável ao mesmo. Por isto, as MMPs são controladas endogenamente por inibidores endógenos como a α 2-Macroglobulina e principalmente por inibidores tecidulares das metaloproteinases de matriz, conhecidos como TIMPs. Esta inibição feita pelo próprio organismo regula a actividade das MMPs e conseqüentemente o *turnover* da ECM (Nagase et al., 2006; Visse & Nagase, 2003).

Um organismo saudável apresenta um perfeito equilíbrio entre a actividade enzimática das MMPs e a actividade inibitória levada a cabo pelas TIMPs. No entanto, uma alteração deste equilíbrio pode levar as MMPs a provocar no organismo uma serie de complicações que podem resultar em processos patológicos indesejados, sendo que os mais graves são a artrite, doenças vasculares e sobretudo o cancro (Raffetto & Khalil, 2008; Visse & Nagase, 2003).

A importante participação das metaloproteinases de matriz em processos biológicos e em processos patológicos levou a avanços consideráveis no estudo das funções, da especificidade para com o substrato, da activação e sobretudo da estrutura e da inibição destas enzimas (Amălinei et al., 2007; Visse & Nagase, 2003).

A necessidade em ter bem documentado a actividade bioquímica e os aspectos estruturais das metaloproteinases de matriz e dos seus inibidores, advém particularmente da referida participação destas enzimas em processos patológicos. O envolvimento das metaloproteinases de matriz nestes processos levou à ideia de sintetizar um inibidor que fosse capaz de controlar a actividade destas endopeptidases

exogenamente, principalmente para actuar nas doenças mais graves (Amălinei et al., 2007; Nagase et al., 2006).

Os primeiros inibidores das metaloproteinases de matriz sintéticos apresentavam um largo espectro de acção pois, apoiavam-se no conhecimento sobre a actuação e especificidade da enzima para com o seu substrato. Estes MMPi utilizavam um *Zinc Binding Group* (ZBG) de ácido hidroxâmico numa estrutura de um péptidomimético. Apesar de serem eficazes na inibição das MMPs, estes inibidores apresentavam uma série de factores limitantes como a inviabilidade oral, instabilidade *in vivo* e falta de selectividade. Esta falta de selectividade para uma MMP específica levou ao aparecimento de toxicidade e consequentemente de reacções adversas no organismo (Coussens et al., 2002; Fisher & Mobashery, 2006; Murphy & Nagase, 2008; Pirard & Matter, 2006; Pirard, 2007; Puerta et al., 2004).

Devido às limitações dos primeiros inibidores sintéticos produzidos surgiram uma série de estudos com o objectivo de criar novos MMPi com a mesma, ou maior capacidade inibitória, mas com menos reacções adversas. Para isso, foram criadas estratégias de *design* de novos inibidores para as metaloproteinases de matriz. Essas três estratégias assentam em experimentar novos ZBG e não apenas o ácido hidroxâmico, produzir MMPi com grande selectividade para uma MMP específica, e utilizar a própria estrutura da metaloproteinase de matriz como base para o *design* de novos inibidores (Fisher & Mobashery, 2006; Puerta et al., 2004).

No que diz respeito a primeira estratégia, foram experimentados diversos novos grupos químicos e diversas novas estruturas com potencial inibitório sobre as MMP. São exemplos disso os inibidores com tióis, pirimidinas, pironas, hidroxipirona e tetraciclina (Fisher & Mobashery, 2006; Puerta et al., 2004).

Os novos grupos químicos e moléculas com potencial inibitório das MMP foram sintetizadas de acordo com a segunda e terceira estratégia do *design* de novos inibidores de metaloproteinases de matriz. O conhecimento da estrutura das MMP permitiu a produção de MMPi com abordagens de inibição diferentes. A inibição feita por alteração da conformação em vez da quelação do Zinco do centro activo da enzima por um ZBG é um exemplo disso. Para esta referida inibição utilizou-se o conhecimento sobre os *subsites* das MMP, outros locais de ligação alternativos ao centro activo também conhecidos como *pockets* ou *subsites*. Estes locais do domínio catalítico da

enzima, periféricos ao centro activo, são conhecidos por serem dos poucos locais onde as MMP diferem significativamente entre si. Este facto levou ao *design* de novos inibidores que interagissem com os *subsites* e não com o centro activo, permitindo dessa forma a tão desejada selectividade dos MMPi. O *subsite* S1' revelou ser o mais relevante pois é aquele que difere mais entre MMPs, sendo por isso chamado de *pocket* específico. O inibidor 544678-85-5, presente na figura 17 com a letra E, é um exemplo de um inibidor que utiliza a inibição através do *subsite* S1' (Cuniasse et al., 2005; Devel et al., 2010; Fisher & Mobashery, 2006; Gupta & Patil, 2012; Jacobsen et al., 2010; Lukacova et al., 2004; Murphy & Nagase, 2008; Pirard, 2007; Tallant et al., 2010).

O único MMPi aprovado é a doxiciclina, utilizada na periodontite. No entanto, apesar dos grandes esforços levados a cabo na tentativa de sintetizar um MMPi com grande capacidade inibitória e grande selectividade para MMPs específicas, que possa também ser utilizado como terapêutica nas doenças mais graves em que as MMPs participam, podemos constatar que esse inibidor ainda não foi aprovado (Fisher & Mobashery, 2006).

IV. BIBLIOGRAFIA

Amălinei, C., Căruntu, I., & Bălan, R. (2007). Biology of metalloproteinases. *Rom J Morphol Embryol*, 48(4), 323–34.

Arlt, M., Kopitz, C., Pennington, C., & Watson, K. (2002). Increase in gelatinase-specificity of matrix metalloproteinase inhibitors correlates with antimetastatic efficacy in a T-cell lymphoma model. *Cancer Research*, 62(2), 5543–50.

Coussens, L. M., Fingleton, B., & Matrisian, L. M. (2002). Matrix metalloproteinase inhibitors and cancer: trials and tribulations. *Science*, 295(5564), 2387–92.

Cuniasse, P., Devel, L., Makaritis, a, Beau, F., Georgiadis, D., Matziari, M., ... Dive, V. (2005). Future challenges facing the development of specific active-site-directed synthetic inhibitors of MMPs. *Biochimie*, 87(3-4), 393–402.

Devel, L., Czarny, B., Beau, F., Georgiadis, D., Stura, E., & Dive, V. (2010). Third generation of matrix metalloprotease inhibitors: Gain in selectivity by targeting the depth of the S1' cavity. *Biochimie*, 92(11), 1501–8.

Engel, C. K., Pirard, B., Schimanski, S., Kirsch, R., Habermann, J., Klingler, O., ... Wendt, K. U. (2005). Structural basis for the highly selective inhibition of MMP-13. *Chemistry & Biology*, 12(2), 181–9.

Fisher, J. F., & Mobashery, S. (2006). Recent advances in MMP inhibitor design. *Cancer Metastasis Reviews*, 25(1), 115–36.

Gupta, S. P., & Patil, V. M. (2012). Matrix Metalloproteinase Inhibitors. *Experientia Supplementum*, 103(2), 35–56.

- Hannas, A. R., Pereira, J. C., Granjeiro, J. M., & Tjäderhane, L. (2007). The role of matrix metalloproteinases in the oral environment. *Acta Odontologica Scandinavica*, 65(1), 1–13.
- Jacobsen, J. a, Major Jourden, J. L., Miller, M. T., & Cohen, S. M. (2010). To bind zinc or not to bind zinc: an examination of innovative approaches to improved metalloproteinase inhibition. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1803(1), 72–94.
- Klein, T., & Bischoff, R. (2011). Physiology and pathophysiology of matrix metalloproteases. *Amino Acids*, 41(2), 271–90.
- Lukacova, V., Zhang, Y., Mackov, M., Baricic, P., Raha, S., Calvo, J. a, & Balaz, S. (2004). Similarity of binding sites of human matrix metalloproteinases. *The Journal of Biological Chemistry*, 279(14), 14194–200.
- Maskos, K. (2005). Crystal structures of MMPs in complex with physiological and pharmacological inhibitors. *Biochimie*, 87(3-4), 249–63.
- Maskos, K., & Bode, W. (2003). Structural Basis of Matrix Metalloproteinases and Tissue Inhibitors of Metalloproteinases. *Molecular Biotechnology*, 25, 241–66.
- Melo, E. (2012). A QSAR Study of Matrix Metalloproteinases Type 2 (MMP-2) Inhibitors with Cinnamoyl Pyrrolidine Derivatives. *Scientia Pharmaceutica*, 80(2), 265–81.
- Murphy, G., & Nagase, H. (2008). Progress in matrix metalloproteinase research. *Mol Aspects Med*, 29(5), 290–308.
- Nagase, H., Visse, R., & Murphy, G. (2006). Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs. *Cardiovascular Research*, 69(3), 562–73.
- Naglich, J., Jure-Kunkel, M., & Gupta, E. (2001). Inhibition of angiogenesis and metastasis in two murine models by the matrix metalloproteinase inhibitor, BMS-275291. *Cancer Research*, 61(1), 8480–5.

- Pirard, B. (2007). Insight into the structural determinants for selective inhibition of matrix metalloproteinases. *Drug Discovery Today*, 12(15-16), 640–6.
- Pirard, B., & Matter, H. (2006). Matrix metalloproteinase target family landscape: a chemometrical approach to ligand selectivity based on protein binding site analysis. *Journal of Medicinal Chemistry*, 49(1), 51–69.
- Puerta, D. T., Lewis, J. A., & Cohen, S. M. (2004). New Beginnings for Matrix Metalloproteinase Inhibitors: Identification of High-Affinity Zinc-Binding Groups. *American Chemical Society*, 126(27), 8388–9.
- Raffetto, J. D., & Khalil, R. a. (2008). Matrix metalloproteinases and their inhibitors in vascular remodeling and vascular disease. *Biochemical Pharmacology*, 75(2), 346–59.
- Stöcker, W., Grams, F., Baumann, U., Reinemer, P., Gomis-Rüth, F. X., McKay, D. B., & Bode, W. (1995). The metzincins--topological and sequential relations between the astacins, adamalysins, serralysins, and matrixins (collagenases) define a superfamily of zinc-peptidases. *Protein Science : A Publication of the Protein Society*, 4, 823–40.
- Suenaga, N., Mori, H., Itoh, Y., & Seiki, M. (2005). CD44 binding through the hemopexin-like domain is critical for its shedding by membrane-type 1 matrix metalloproteinase. *Oncogene*, 24(5), 859–68.
- Tallant, C., Marrero, A., & Gomis-Rüth, F. X. (2010). Matrix metalloproteinases: fold and function of their catalytic domains. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1803(1), 20–8.
- Verma, R. P., & Hansch, C. (2007). Matrix metalloproteinases (MMPs): chemical-biological functions and (Q)SARs. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 15(6), 2223–68.
- Visse, R., & Nagase, H. (2003). Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. *Circulation Research*, 92(8), 827–39.

Zhang, Y., Lukacova, V., Bartus, V., Nie, X., Sun, G., Manivannan, E., ... Balaz, S. (2008). Binding of matrix metalloproteinase inhibitors to extracellular matrix: 3D-QSAR analysis. *Chemical Biology and Drug Design*, 72(4), 237–48.