UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

LUCIANA BÄRG KUNTZE

**EFEITO INIBITÓRIO DO CAPTOPRIL SOBRE A METALOPROTEINASE-2 DA
MATRIZ EXTRACELULAR (MMP-2) *IN VITRO***

Ribeirão Preto – SP

2012

LUCIANA BÄRG KUNTZE

**EFEITO INIBITÓRIO DO CAPTOPRIL SOBRE A METALOPROTEINASE-2
DA MATRIZ EXTRACELULAR (MMP-2) *IN VITRO***

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina de Ribeirão Preto da Universidade
de São Paulo para obtenção do título de
Mestre em Ciências.

Área de concentração: Farmacologia

Orientadora: Profa. Dra. Raquel Fernanda
Gerlach

RIBEIRÃO PRETO

2012

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Kuntze, Luciana Bãrg
Efeito inibitório do captopril sobre a Metaloproteinase-2
da Matriz Extracelular (MMP-2) *in vitro*. Ribeirão
Preto, 2012.
77 p. : il. ; 30 cm

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de
Medicina de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração:
Farmacologia.

Orientador: Gerlach, Raquel Fernanda.

1. Metaloproteinase-2 da matriz extracelular. 2. Inibidores da
enzima conversora da angiotensina. 3. Captopril.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Luciana Bärge Kuntze

“Efeito inibitório do captopril sobre a metaloproteinase-2 da matriz extracelular (MMP-2) *in vitro*”

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Farmacologia

Aprovado em: _____

Banca examinadora:

Profa. Dra. Raquel Fernanda Gerlach

Instituição: FMRP – USP Assinatura: _____

Prof. Dr. Eduardo Brandt de Oliveira

Instituição: FMRP - USP Assinatura: _____

Profa. Dra. Paula Cristina Trevilatto

Instituição: CCBS-PUC - PR Assinatura: _____

*Ao meu pai, por me ensinar que
“a beleza da vida está em vencer os desafios”;*

À minha mãe, minha melhor professora;

À minha irmã, minha primeira aluna.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao Criador, por ser um Deus que nos permite mais do que apenas vislumbrar Sua criação e por ter tornado isso uma realidade em minha vida, que hoje se concretiza na forma da conclusão do curso de Mestrado.

Aos meus pais, Dênio Cêsar Kuntze e Sônia Bärge Kuntze, por todo o amor e respeito por minhas escolhas, que são expressos na compreensão da minha ausência e no incentivo incondicional que tenho recebido ao longo destes anos. Vocês são meu “porto seguro”. Obrigada pela certeza de saber que há um lar para voltar. Sempre.

À minha irmã Fabiana Bärge Kuntze, por todo o seu apoio e torcida.

Aos meus avós maternos, Peter e Ruth Bärge, e paternos, João e Louri Kuntze, pelo carinho e por suas orações diárias em meu favor.

À professora Dra. Raquel Fernanda Gerlach pela orientação, confiança e oportunidade de compartilhar de seus conhecimentos e experiência. Registro aqui minha admiração pela profissional dedicada e pessoa amiga, em quem sempre encontro uma palavra de encorajamento.

Às técnicas Junia Ramos e Sandra Conde Tella, por tornarem meus dias no laboratório muito mais agradáveis com sua ajuda e amizade.

Aos amigos Raquel Carros Antonio, Evandro M. Neto-Neves e Ozélia Sousa Santos, por me incentivarem nos estudos para o ingresso na pós-graduação.

Aos amigos Alisson Martins de Oliveira e Carla Speroni Ceron por me acompanharem de forma tão prestativa desde o início com seus ensinamentos e motivação, que foram fundamentais para a progressão deste trabalho e certamente de minha formação.

A todos os amigos e companheiros de laboratório, em especial a Alejandro Ferraz do Prado, Aline de Azevedo e Gabriela Ferian Molina, por dividirem comigo não só a bancada, mas também muitos dos momentos bons e ruins.

Ao professor Dr. José Eduardo Tanus dos Santos e a todos os colegas do laboratório de Farmacologia Cardiovascular, pela parceria e todos os conhecimentos transmitidos.

Aos funcionários do departamento de Farmacologia Sônia Maria Stefanelli, Fátima Helena Ferreira Petean e José Waldik Ramon pelo auxílio técnico sempre tão prestativo e eficaz, pela colaboração e amizade.

À professora Dra. Débora Fernandes Costa Guedes e ao colega Flávio Venâncio Nakadi pela ajuda tão prestativa que encontrei em vocês.

Ao fotógrafo da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Hermano Teixeira Machado, por ser sempre tão receptivo e auxiliar na formatação das figuras.

Aos professores Dr. Eduardo Brandt de Oliveira e Dra. Paula Cristina Trevilatto, por suas considerações que contribuíram para este trabalho.

Aos amigos da Igreja Adventista do Sétimo Dia de Ribeirão Preto, pelos momentos que compartilhamos.

Ao apoio financeiro da CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior).

“De tudo ficaram três coisas:
a certeza de que estamos começando,
a certeza de que é preciso continuar e
a certeza de que podemos ser interrompidos antes de terminar.
façamos da interrupção um caminho novo,
da queda, um passo de dança,
do medo, uma escada,
do sonho, uma ponte,
da procura, um encontro!”

Fernando Sabino

RESUMO

Kuntze, L. B. **Efeito inibitório do captopril sobre a metaloproteinase-2 da matriz extracelular (MMP-2) *in vitro***. 2012. 77 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2012.

A MMP-2 é uma protease que está envolvida em muitos eventos fisiológicos e patológicos e que compartilha similaridades estruturais com a enzima conversora de angiotensina (ECA), de modo que os inibidores da ECA passaram a ser estudados com relação ao efeito inibitório também sobre a MMP-2. No entanto, este potencial inibitório não foi ainda testado na MMP-2 altamente purificada. Este estudo teve como objetivo investigar o potencial inibitório do captopril sobre a atividade da MMP-2. Primeiramente, supôs-se que a dissolução do captopril poderia induzir a mudanças no pH de soluções tampão. Em segundo lugar, avaliou-se o efeito direto do captopril sobre a MMP-2 presente no plasma humano e a MMP-2 recombinante humana (rhMMP-2) produzida e purificada de *E. coli*. As análises de atividade *in vitro* incluíram zimogramas com gelatina e ensaios fluorimétricos com DQ gelatin. A solubilização do captopril reduziu significativamente o pH da solução tampão 50 mM ($p < 0,01$) mas não alterou o pH da solução tampão 200 mM ($p > 0,05$). Resultados de zimografia do plasma e da rhMMP-2 mostraram inibição da atividade gelatinolítica com significância estatística somente em concentrações iguais ou maiores que 4 e 1 mM de captopril, respectivamente ($p < 0,05$). A presença de captopril nos ensaios de fluorimetria resultaram na inibição significativa da atividade de rhMMP-2 somente em concentrações iguais ou maiores que 2 mM ($p < 0,01$), enquanto a rhMMP-2 ativada com APMA apresentou inibição significativa diante de 0,5 mM de captopril ($p < 0,01$). As concentrações de captopril efetivas em inibir a MMP-2 *in vitro* foram muito superiores às aquelas referentes à concentração plasmática máxima encontrada no plasma humano após a administração de uma dose de 50 mg de captopril. Em conjunto nossos resultados sugerem que o captopril não parece promover inibição significativa da MMP-2 nas concentrações relatadas *in vivo*. Além disso, o pH das soluções tamponantes é um aspecto que requer mais atenção durante ensaios de inibição de protease *in vitro*.

Palavras-chave: Metaloproteinase-2 da matriz extracelular; inibidores da enzima conversora da angiotensina; captopril.

ABSTRACT

Kuntze, L. B. **Inhibitory effect of captopril on matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) activity *in vitro***. 2012. 77 f. Tese (Mestrado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2012.

MMP-2 is involved in many physiological and pathological processes. This protease shares structural similarities with the angiotensin-converting enzyme (ACE), and ACE inhibitors have been described to inhibit MMP-2. However, this inhibitory potential has not been tested using a highly purified MM-2 so far. This study aimed at investigating the inhibitory potential of captopril on MMP-2 activity. First it was tested whether the dissolution of captopril would induce changes in the pH of the solutions. Secondly, the direct inhibitory effect of captopril on plasma MMP-2 and on a recombinant human MMP-2 (rhMMP-2) produced and purified from *E. coli* was tested. The *in vitro* activity assays included gelatin zymography and a fluorimetric assay with DQ gelatin. Captopril solubilization significantly decreased the pH of the 50 mM Tris buffer solution ($p < 0.01$) but did not decreased the pH of the 200 mM Tris Buffer solution ($p > 0.05$). Zymography results of plasma and rhMMP-2 showed that inhibition of the activity only reached statistical significance ≥ 4 and 1 mM of captopril, respectively ($p < 0,05$). The presence of captopril in the fluorimetric assay resulted in a significant inhibition of the rhMMP-2 activity only at concentrations ≥ 2 mM ($p < 0.01$), whereas APMA-activated rhMMP-2 was inhibited by 0.5 mM of captopril ($p < 0.01$). The captopril concentrations found to inhibit MMP-2 are several times of magnitude higher than the maximum plasma concentration after a dose of 50 mg of captopril. In conclusion, captopril does not seem to cause significant inhibition of MMP-2 in the concentrations found *in vivo*, and more attention has to be given to the pH of the solutions when testing protease inhibition *in vitro*.

Keywords: Matrix metalloproteinase-2; angiotensin-converting enzyme inhibitors; captopril.

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

ANOVA – Análise de variância

APMA – Acetato *p*-aminofenilmercúrico

APS – Persulfato de amônio

AT1 – Receptor de angiotensina II subtipo 1

Big ET-1 – Big endotelina-1

BRAII – Bloqueador dos receptores de angiotensina II

C_{máx} – Concentração plasmática máxima

ConA – Concanavalina A

DQ gelatin – Substrato fluorescente para determinar a atividade gelatinolítica

ECA – Enzima conversora de angiotensina

EPM – Erro padrão da média

ET-1 – Endotelina-1

IC₅₀ – Concentração capaz de inibir 50% da atividade enzimática

K_a – Constante de dissociação ácida

K_b – Constante de dissociação básica

kDa – Quilodaltons

K_i – Constante de dissociação do complexo enzima-inibidor

K_M – Constante de Michaelis-Menten

MEC – Matriz extracelular

MMP – Metaloproteinase da matriz extracelular

MT-MMP – Metaloproteinase da matriz extracelular ligada à membrana

n – Número

NEM – N-etilmaleimida

PAD – Padrão interno

PAGE – Eletroforese em gel de poliacrilamida

pK_a – cologaritmo do K_a

pK_b – cologaritmo do K_b

PMSF – Fluoreto fenilmetilsulfonil

rhMMP-2 – MMP-2 recombinante humana

SDS – Dodecil sulfato de sódio

sECA – Isoforma testicular da ECA

tECA – Isoforma testicular da ECA

TEMED – Tetrametil etilenediamina

TIMP – Inibidor tecidual de MMP

Tris – Tris(hidroximetil)amino metano

U.A. – Unidades arbitrárias

ZBG – Grupo de ligação ao zinco

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 -	Principais MMPs e suas características estruturais	17
Figura 2 -	Principais vias de ativação da MMP-2	19
Figura 3 -	Estrutura química do captopril	25
Figura 4 -	Efeito da solubilização do captopril sobre o pH de soluções tampão Tris-CaCl ₂ nas concentrações 50 mM e 200 mM.....	45
Figura 5 -	Efeito do captopril sobre a atividade gelatinolítica da MMP-2 de plasma humano	47
Figura 6 -	Efeito do captopril sobre a atividade gelatinolítica da rhMMP-2 por zimografia	49
Figura 7 -	Efeito do captopril sobre a atividade gelatinolítica da rhMMP-2 por fluorimetria	51

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	16
1.1. METALOPROTEINASES DA MATRIZ EXTRACELULAR.....	16
1.2. METALOPROTEINASE-2 DA MATRIZ EXTRACELULAR.....	18
1.3. INIBIÇÃO DA MMP-2 COMO ESTRATÉGIA TERAPÊUTICA	21
1.4. ENZIMA CONVERSORA DE ANGIOTENSINA E FÁRMACOS INIBIDORES ...	22
1.4.1. Captopril.....	23
1.5. INIBIDORES DA ECA COMO INIBIDORES DE GELATINASES.....	25
 2. HIPÓTESE	 31
 3. OBJETIVOS.....	 33
 4. MATERIAIS E MÉTODOS	 35
4.1. MATERIAIS	35
4.1.1. Reagentes utilizados nos experimentos	35
4.1.2. Soluções utilizadas nos experimentos.....	35
4.1.3. Droga.....	36
4.1.4. Equipamentos utilizados nos experimentos.....	36
4.1.5. Programas de aquisição de dados	37
4.2. MÉTODOS	37
4.2.1. Determinação do pH de soluções tampão Tris-CaCl₂ na presença de captopril	37
4.2.2. Preparação das mostras.....	38
<i>4.2.2.1. Plasma</i>	<i>38</i>
<i>4.2.2.2. MMP-2 Recombinante Humana (rhMMP-2)</i>	<i>38</i>
4.2.3. Dosagem de proteína pelo método de Bradford.....	39
4.2.4. Determinação da atividade da MMP-2 por zimografia em gel	39
4.2.5. Determinação da atividade gelatinolítica por fluorimetria.....	40
4.2.6. Análise estatística	41

5. RESULTADOS	44
5.1. EFEITO DO CAPTOPRIL SOBRE O pH DAS SOLUÇÕES DE Tris-CaCl ₂	44
5.2. EFEITO DO CAPTOPRIL SOBRE A ATIVIDADE DA MMP-2 DE PLASMA HUMANO	46
5.3. EFEITO DO CAPTOPRIL SOBRE A ATIVIDADE DA rhMMP-2 POR ZIMOGRÁFIA.....	48
5.4. EFEITO DO CAPTOPRIL SOBRE A ATIVIDADE DA rhMMP-2 POR FLUORIMETRIA.....	50
 6. DISCUSSÃO	 53
 7. CONCLUSÃO	 60
 REFERÊNCIAS	 62
 APÊNDICES	 71
APÊNDICE A - CÁLCULO DAS CONCENTRAÇÕES DAS FORMAS PROTONADAS E DESPROTONADAS DE TRIS NAS SOLUÇÕES TAMPÃO DE Tris-CaCl ₂ (Tris-HCl 50 mM E 200 mM) DIANTE DA SOLUBILIZAÇÃO DE CAPTOPRIL (8 mM).....	71
APÊNDICE B - CÁLCULO DE K_i PARA O COMPLEXO MMP-2-Captopril	77

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1. METALOPROTEINASES DA MATRIZ EXTRACELULAR

As MMPs (EC 3.4.24) constituem uma família de proteinases estruturalmente e funcionalmente relacionadas, descobertas em 1962 como agentes de atividade colagenolítica responsáveis pela involução da cauda de girinos durante o processo de metamorfose (CHOW; CENA; SCHULZ, 2007). Coletivamente são capazes de degradar, *in vivo* e *in vitro*, vários dos componentes proteicos da MEC, tais como colágenos, elastinas, proteoglicanas e fibronectinas. Deste modo participam ativamente do processo de remodelamento tecidual associado a diversos processos fisiológicos, dentre eles a embriogênese, morfogênese, angiogênese, ovulação, remodelagem tecidual e óssea, apoptose (CHOW; CENA; SCHULZ, 2007; PAGE-McCAW; EWALD; WERB, 2007).

As MMPs são endopeptidases zinco e cálcio-dependentes que pertencem à família das matrixinas e compreendem mais de 20 membros já descritos na literatura, classificados segundo a especificidade de degradação do substrato da MEC e o perfil estrutural da MMP expressa. Assim sendo, são classificados nos seguintes subgrupos como collagenases, estromelisinases, matrilisinases, MT-MMPs e gelatinases, da qual fazem parte as MMP-2 (gelatinase A) e MMP-9 (gelatinase B) (Figura 1) (NAGASE; VISSE; MURPHY, 2006; SCHULZ, 2007).

Inicialmente, as MMPs são expressas sob uma forma enzimaticamente inativa conhecida como “zimogênio” ou “pró-MMP”, cuja organização estrutural básica é comum a todos os membros já identificados e apresenta três domínios distintos: pró-peptídeo N-terminal, sítio catalítico e extremidade C-terminal (Figura 1). A região N-terminal apresenta um peptídeo sinal que permite o trânsito da enzima para o ambiente extracelular, seguido de um domínio pró-peptídico de caráter hidrofóbico. Esse domínio confere autoinibição para a enzima por meio da interação com o domínio catalítico, que ocorre entre o grupo sulfidril do resíduo de cisteína existente no pró-peptídeo e o íon Zn^{2+} presente no sítio ativo. Ligado ao domínio catalítico intermediado por um pequeno domínio rico em prolina formando uma região flexível (“*hinge region*”), há por fim na região C-terminal um domínio “*haemopexin-like*”, que

permite a ligação de outras proteínas capazes de modificar a atividade das metaloproteases, estando envolvido no reconhecimento e adesão aos substratos (BORKAKOTI, 2000; CHOW; CENA; SCHULZ, 2007; PAPAZAFIROPOULOU & TENTOLOURIS, 2009). Todavia, as matrilisinas não apresentam tal domínio “*haemopexin-like*”, enquanto as MT-MMPs contêm um domínio transmembrana adicional que as mantém fixas na superfície celular (BODE; MASKOS, 2003; HIDALGO; ECKHARDT, 2001).

Figura 1 – Principais MMPs e suas características estruturais. As gelatinases (em destaque) diferem das demais em virtude da presença de três domínios “*fibronectin like*” no domínio catalítico, que lhes conferem alta afinidade pela gelatina (Modificado de Chow; Cena; Schulz, 2007).

A ativação das formas pró-MMPs exige a dissociação da ligação covalente entre o aminoácido cisteína e o íon Zn^{2+} do sítio ativo a fim de expor o sítio catalítico, passo que consiste em um importante nível de regulação das MMPs e que, na maioria das vezes, requer a clivagem do pró-peptídeo através a ação de outras proteases, como por exemplo, a trombina, plasmina e MT-MMPs (CAUWE; OPDENAKKER, 2010; SCHULZ, 2007).

Entretanto, alterações conformacionais capazes de perturbar a interação do tiol com o zinco catalítico também consistem em uma forma de ativação, resultante

da ação de fatores como o estresse oxidativo e o estresse nitrosativo *in vivo*, ou ainda de compostos de mercúrio como o APMA e o cloreto de mercúrio, agentes caotrópicos ou ainda detergentes, como o SDS *in vitro* (HADLER-OLSEN et al., 2011; CAUWE; OPDENAKKER, 2010).

Embora as MMPs sejam proteases constitutivamente expressas por várias células e tecidos, como células da musculatura lisa vascular, endotélio, fibroblastos e células inflamatórias (SPINALE, 2002; SCHULZ, 2007), sua atividade é regulada não somente por meio da ativação das formas latentes, mas também em nível transcricional e pós-traducional. Fatores de crescimento, hormônios e citocinas são alguns dos fatores capazes de aumentar a expressão gênica das MMPs (NAGASE; WOESSNER, 1999). Por outro lado, a ação dos TIMPs constitui uma das vias mais importantes de regulação pós-traducional das MMPs, já que compõem uma família de quatro proteínas estruturalmente relacionadas – TIMP-1, TIMP-2, TIMP-3 e TIMP-4 – que exercem controle mediante à inibição tanto do processo de ativação quanto das formas enzimáticas ativas (HIDALGO; ECKHARDT, 2001).

1.2. METALOPROTEINASE-2 DA MATRIZ EXTRACELULAR

A MMP-2 (EC 3.4.24.24) é uma gelatinase caracterizada pela presença de três domínios “*fibronectin like*” em seu domínio catalítico, responsáveis pela adesão e reconhecimento aos componentes da MEC (Figura 1) (CHOW; CENA; SCHULZ, 2007). Dessa forma, a MMP-2 é particularmente responsável pela clivagem de substratos como colágeno tipo I, II, III de modo similar às collagenases, degradando também colágeno tipo IV, V e XI, colágeno desnaturado (gelatina) e laminina (NAGASE; VISSE; MURPHY, 2006).

Estruturalmente o domínio catalítico da MMP-2 adota uma conformação que compreende cinco “*beta-sheets*”, três alfa-hélices e “*connective loops*”, além de três íons cálcio de dois íons zinco, um dos quais catalítico (BORKAKOTI, 2000; TALLANT; MARRERO; GOMIS-RÜTH, 2010; VERMA; HANSCH, 2007). Esta conformação está organizada de modo a exibir na superfície seis regiões de depressão em torno do Zn^{2+} catalítico, os “*recognition pockets*” ($S_1'-S_3'$ e S_1-S_3), que são reconhecidas pelo substrato (DORMÁN et al., 2010; MURPHY; NAGASE, 2008).

Neste sentido, o “S₁' pocket” é um dos principais determinantes no reconhecimento do substrato, pois varia em tamanho e formato entre as MMPs, tendo sido descrito na MMP-2 como de tamanho médio (DORMÁN et al., 2010).

Assim como as demais MMPs, a MMP-2 é sintetizada como uma pró-forma latente (“pró-MMP-2”), com massa molecular de 72 kDa. Especificamente, a MMP-2 tem como principal via de ativação a clivagem proteolítica mediada extracelularmente via M1-MMP (MMP-14), que envolve a formação de um complexo quaternário juntamente com o TIMP-2, seguida da remoção do pró-domínio, que consequentemente resulta na forma ativa da MMP-2 com menor massa molecular (64 kDa) (Figura 2) (KANDASAMY et al., 2010; NAGASE; VISSE; MURPHY, 2006).

Outras formas de ativação da MMP-2 já descritas pela literatura envolvem a ação de agentes oxidantes. Estudos mostraram que baixas concentrações de peroxinitrito (ONOO⁻) promovem a ativação da pró-MMP-2 (72 kDa), por meio da glutatonação da cisteína e sem a proteólise do pró-peptídeo (Figura 2) (KANDASAMY et al., 2010; VIAPPIANI et al., 2009). Além disso, processos de fosforilação também têm sido relacionados à ativação não proteolítica da gelatinase A (SARIAHMETOGLU et al., 2007).

Figura 2 – Principais vias de ativação da MMP-2: ativação proteolítica, resultando na forma ativa de 64 kDa (seta inferior); não proteolítica, que desloca o pró-domínio e gera uma forma enzimaticamente ativa de 72 kDa (seta da esquerda) (Modificado de Kandasamy et al., 2010).

Mesmo sendo considerada uma enzima constitutiva, a expressão da MMP-2 parece ser rigorosamente controlada. Em células cardíacas, por exemplo, a expressão pode ser induzida em resposta a fatores como hipóxia, angiotensina II, ET-1, interleucinas, fator de necrose tumoral alfa, hormônios e fatores de crescimento (CHOW; CENA; SCHULZ, 2007).

Tendo-se uma vez a enzima ativa, o substrato é direcionado ao sítio catalítico em que a ligação peptídica é clivada ao sofrer ataque nucleofílico por uma molécula de água (VERMA; HANSCH, 2007). A proporção em que essa atividade ocorre depende da ação regulatória de outras proteases existentes *in vivo*, dentre as quais se destacam a alfa-2-macroglobulina e o TIMP-2, haja vista que apesar dos TIMPs em geral não demonstrarem especificidade por metaloproteinases em particular, o TIMP-2 demonstra certa afinidade maior pela MMP-2 (MURPHY; NAGASE, 2008).

A MMP-2 possui um papel importante na regulação da pressão arterial, uma vez que pode clivar o peptídeo vasoativo derivado do endotélio, conhecido como Big ET-1, no potente vasoconstritor ET-1 (FERNANDEZ-PATRON; RADOMSKI; DAVIDGE, 1999). Também já se demonstrou que esta metaloprotease é capaz de clivar peptídeos vasodilatadores, tais como o peptídeo relacionado ao gene da calcitonina e a adrenomedulina, levando a formação de metabólitos com menor ação vasodilatadora e até mesmo resultando na produção de metabólitos vasoconstritores (FERNANDEZ-PATRON et al., 2000; MARTINEZ et al., 2004). Portanto, a MMP-2 possui notável influência sobre a regulação do tônus vascular mediante a diminuição da ação de peptídeos vasodilatadores.

Estudos mostram que o desequilíbrio ou excesso na atividade da MMP-2 está associado a doenças cardiovasculares, tais como insuficiência cardíaca, aterosclerose e hipertensão (CASTRO et al., 2011).

De fato, há evidências indicando que os níveis de expressão e atividade da MMP-2 são elevados em aortas (CASTRO et al., 2008) e no coração (RIZZI et al., 2010) de ratos com hipertensão renovascular, enquanto a inibição das MMPs pela administração de doxiciclina é associada a completa reversão da hipertrofia encontrada neste modelo animal em aortas e no coração, ainda que a pressão arterial não tenha retornado completamente aos níveis controle (CASTRO et al., 2008; RIZZI et al., 2010). Além disso, o tratamento de ratos hipertensos com drogas antioxidantes promoveu diminuição da disfunção e do remodelamento vascular, que

foram associadas com a diminuição das concentrações e atividade da MMP-2 (CASTRO et al., 2009).

Até o momento a MMP-2 foi a única MMP descrita no interior de cardiomiócitos (KWAN et al., 2004; ZHOU et al., 2007), de modo que vários autores relatam a interação com enzimas de reparação do DNA (poli(ADP-ribose) polimerase) (KWAN et al., 2004), troponina I (WANG et al., 2002) e miosina de cadeia leve (SAWICKI et al., 2005).

Portanto, fica claro que a MMP-2 torna-se um importante alvo farmacológico para as estratégias terapêuticas de intervenção nas doenças cardiovasculares.

1.3. INIBIÇÃO DA MMP-2 COMO ESTRATÉGIA TERAPÊUTICA

Ao longo dos últimos 20 anos, o envolvimento das MMPs em diversas patologias tem motivado estudos com o propósito de investigar a inibição dessas proteases e de desenvolver compostos capazes de inibi-las *in vivo* de maneira seletiva. Neste sentido, recentemente vários trabalhos foram publicados (DEVEL et al., 2010; DURRANT et al., 2011; NUTI et al., 2011).

A maioria dos inibidores de MMPs é caracterizada pela presença de um grupo de ligação ao Zn^{2+} catalítico, o ZBG, como os grupos hidroxamato, sulfidrilo e carboxilato, além de cadeias laterais capazes de interagir com a proteína, em especial uma porção hidrofóbica para interagir com S_1' *pocket* (DORMÁN et al., 2010). Entretanto apesar de potentes inibidores, apresentam fortes efeitos adversos e baixa seletividade, de modo que os estudos têm procurado compostos inibidores que não apresentem ZBG e com maior seletividade para o S_1' *pocket* (DEVEL et al., 2010).

Ainda assim, não existem inibidores seletivos para a MMP-2 comercialmente disponíveis. Atualmente a doxíciclina é o único inibidor de MMPs aprovado pelo FDA (Food and Drug Administration) chamado Periostat®. Doxíciclina é um antibiótico da classe das tetraciclina que quando administrado em doses subantimicrobianas atua como um potente inibidor não seletivo de MMPs, sendo por este motivo utilizado no tratamento de doença periodontal (GOLUB et al., 1998).

1.4. ENZIMA CONVERSORA DE ANGIOTENSINA E FÁRMACOS INIBIDORES

A ECA (peptidil dipeptidase A, EC 3.4.15.1) é um dos principais membros do sistema renina-angiotensina-aldosterona e pertence à superfamília das zinco metalopeptidases, no grupo M2 das gluzincinas (SPYROULIAS et al., 2004). Estão descritas duas isoformas principais da ECA, a somática (sECA) e a testicular (tECA), ambas transcritas a partir do mesmo gene mas que apresentam algumas diferenças estruturais. A sECA é composta por 1277 aminoácidos em dois domínios homólogos, domínios N e C-terminal, ao passo que a tECA apresenta 701 aminoácidos e é semelhante ao domínio C-terminal da sECA (CORRADI et al., 2006; NATESH et al., 2003) .

Tendo em vista esta similaridade e o fato de que o domínio C-terminal parece ser dominante na função de controle da pressão sanguínea (NATESH et al., 2003), iremos nos deter em considerar a estrutura da tECA. Estruturalmente a tECA compreende 27 hélices (das quais são 20 alfa-hélices e 7 são 3(10)-hélices) e 6 beta-sheets, organizados em subdomínios denominados “I” e “II” em torno de uma cavidade central em que o Zn^{2+} catalítico é abrigado na hélice alfa-13 coordenado por duas histidinas (His 383 e His 387) da sequência HEXXH, que é comum a todos os membros da subfamília das gluzincinas (CORRADI et al., 2006; NATESH et al., 2003).

Como uma carboxipeptidase, a ECA tem papel decisivo no controle da pressão sanguínea não somente por clivar a angiotensina I no vasoconstrictor angiotensina II, mas por inativar também o vasodilatador bradicinina (DORER et al., 1974; STURROCK et al., 2004). Além disso, a angiotensina II circulante promove a liberação do hormônio aldosterona (TABRIZCHI, 2003), acentuando a atividade simpática e intensificando os efeitos vasopressores da ECA.

Buscando prevenir as ações relacionadas às ações da angiotensina II, fármacos inibidores da ECA e BRAII são amplamente utilizados na clínica, cujos mecanismos de ação compreendem basicamente a inibição da formação da angiotensina II e o bloqueio da ligação da angiotensina II aos receptores AT1, respectivamente. Assim, ambos são efetivos na terapia anti-hipertensiva, bem como prevenção da disfunção cardíaca e do acidente vascular cerebral (YAMAMOTO et al., 2007; YAMAMOTO; TAKAI, 2009).

Todavia há relatos de que os inibidores da ECA reduzem significativamente o acometimento e a mortalidade associados ao infarto agudo do miocárdio, enquanto os BRA não apresentam o mesmo efeito (YAMAMOTO; TAKAI, 2009). Experimentalmente, observou-se em modelo de insuficiência cardíaca induzida por “*rapid-pacing*”, que os animais tratados com fosinopril (um inibidor da ECA) mostraram diminuição da dilatação do ventrículo esquerdo e melhora da função contrátil dos cardiomiócitos (SPINALE et al., 1997). De acordo com os autores, tais efeitos benéficos parecem não ser mediados através da modulação da ativação dos receptores AT1, mas sim por mecanismos alternativos, uma vez que o tratamento dos animais com irbesartan (um BRAII) não mostrou resultados semelhantes.

Sabe-se de fato que os principais mecanismos de ação dos inibidores da ECA envolvem não somente a redução da síntese de angiotensina II, mas também a potencialização da ação da bradicinina e o aumento da liberação de óxido nítrico e prostaglandinas (GOODMAN; HARDMAN; LIMBIRD, 2006; RIBEIRO; FLORENCIO, 2000). Neste contexto, alguns autores passaram a investigar também a hipótese de que inibidores da ECA poderiam inibir as MMPs, como um mecanismo responsável pelos efeitos cardioprotetores observados exclusivamente em relação a esta classe de fármacos.

É importante citar ainda que os inibidores da ECA são classificados nos seguintes grupos, com base na sua estrutura química:

- a) fármacos estruturalmente relacionados com o captopril, que apresentam um grupo sulfidríla (p. ex., alacepril, fentiapril, pivalopril e zofenopril);
- b) fármacos estruturalmente relacionados com o enalapril, que apresentam um grupo dicarboxila (p. ex., lisinopril, benazepril, quinapril, moexipril, ramipril, trandolapril, espirapril, perindopril e cizalapril);
- c) fosinopril, que apresenta um radical fósforo (GOODMAN; HARDMAN; LIMBIRD, 2006).

1.4.1. Captopril

O captopril é uma das principais drogas de escolha na terapêutica da hipertensão arterial, em esquemas de monoterapia ou em associações. Encontra-se

comercialmente disponível em comprimidos de 12,5 mg, 25 mg e 50 mg e é utilizado também no tratamento da insuficiência cardíaca congestiva, infarto do miocárdio e nefropatia diabética (GOODMAN; GILMAN; LIMBIRD, 2006; SOARES et al., 2006).

Em um trabalho pioneiro, Ferreira e Rocha e Silva (1965) mostraram a existência de um fator peptídico no veneno da *Bothrops jararaca* que potencializava o efeito hipotensor da bradicinina. A partir destes resultados o captopril foi desenvolvido por Ondetti et al. (1977), culminando em 1981 na liberação comercial deste que foi o primeiro fármaco inibidor da ECA oralmente ativo (SKRBIC; IGIC, 2009). Devido à ausência de trabalhos que descrevessem a estrutura tridimensional da ECA até aquele momento, o captopril foi desenvolvido com base em informações estruturais descritas sobre a carboxipeptidase A, assumindo que o mecanismo catalítico dessas duas metalopeptidases seria semelhante (NATESH et al., 2004; SPYROULIAS et al., 2004).

Administrado por via oral, o captopril é absorvido pelo trato gastrointestinal, atingindo pico de concentração plasmática entre 60-90 minutos após a administração, com biodisponibilidade de 62-65% (GOODMAN; GILMAN; LIMBIRD, 2006; SOARES et al., 2006). Experimentalmente, a $C_{\text{máx}}$ do captopril tem sido determinada por diferentes métodos analíticos, cujos resultados variam entre $692,5 \pm 368,7$ ng/mL (MEDVEDOVICI et al., 2009), 1228 ± 495 ng/mL (SOARES et al., 2006) e $1335,16 \pm 302,61$ ng/mL (REZENDE et al., 2006), após administração oral de dose única de 50 mg.

O captopril (1-[(2S)-3-mercapto-2-metilpropionil]-L-prolina; $C_9H_{15}NO_3S$) é um ácido diprótico e o menor inibidor da ECA em estrutura, com massa molecular de 217,3 g/mol (ANDÚJAR-SÁNCHEZ; CÁMARA-ARTIGAS; JARA-PÉREZ, 2004; PEREIRA et al., 2011; SOARES et al., 2006). Apresenta um grupo sulfidril de $pK_a=9,8$ (Figura 3) e assim como os demais tióis, está sujeito a degradação por oxidação desse radical, originando o composto inativo “dissulfeto de captopril” que é excretado juntamente com a urina. Segundo Timmins, Jackson e Wang (1982) o captopril é estável em $pH < 4$, uma vez que sob condições de pH mais elevado a oxidação do tiol é aumentada, constituindo a via majoritária de degradação da droga. De acordo com Remko (2007), sob pH 7,4 o grupo carboxila de $pK_a=3,7$ é que se encontra completamente ionizado.

Estudos com cristalografia de raios X indicam que o captopril inibe a atividade da tECA por meio da interação entre o radical sulfidril e o Zn^{2+} catalítico, enquanto o

complexo é estabilizado por ligações de hidrogênio entre a carbonila central do captopril e os resíduos His 353 e His 513. Um oxigênio do radical carboxila da prolina interage com *S₂'pocket* (Tyr 520, Gln 281 e Lys 511), enquanto o outro interage com moléculas de água do meio (KIM et al., 2003; NATESH et al., 2004). Essas interações parecem ser suficientes para o posicionamento da molécula, de forma que o captopril inibe competitivamente a ECA com $K_i=1,7$ nM (CUSHMAN et al., 1977).

Figura 3 – Estrutura química do captopril. Em destaque, a presença do grupo sulfidril. (Modificado de Yamamoto et al., 2010).

1.5. INIBIDORES DA ECA COMO INIBIDORES DE GELATINASES

Como a ECA e gelatinases são metaloproteases, uma possível sobreposição do efeito inibitório poderia ser predita, já que compartilham similaridades estruturais. Somado ao papel anti-hipertensivo dos inibidores da ECA, a interessante ação antiproteinúrica destes fármacos fez com que eles passassem a ser utilizados em doentes renais, no entanto sem a elucidação do mecanismo pertinente a tal efeito (HEEG et al. 1987).

Considerando estudos que propunham um efeito primário dos inibidores da ECA sobre a permeabilidade da membrana basal glomerular e que alguns pacientes tratados com captopril desenvolviam disgeusia, Sorbi et al. (1993) investigaram a inibição das gelatinases por inibidores da ECA como possível mecanismo para redução da proteinúria, de modo que este foi o primeiro estudo realizado sobre o assunto.

Sorbi et al. (1993) utilizaram para este estudo gelatinases parcialmente purificadas a partir do sobrenadante de cultura de células mesenquimais do córtex renal de ratos. A purificação foi realizada mediante a passagem do sobrenadante através de coluna cromatográfica de afinidade em ConA seguida do fracionamento por gel-filtração em coluna de Sephadex G-200. As gelatinases MMP-2 e MMP-9 foram então utilizadas para realização de ensaios de atividade gelatinolítica em gel (zimografia) e em solução. Os resultados obtidos nos zimogramas mostraram inibição da MMP-2 e da MMP-9 em solução Tris-CaCl₂ (Tris-HCl 50 mM) pelo captopril nas concentrações de 20 mM e 40 mM. Já no caso do ensaio em solução, realizou-se um ensaio de ELISA modificado no qual a gelatina desprendida do fundo das placas pela ação das gelatinases foi quantificada pelo método avidina-biotina-peroxidase. Por este ensaio 30-50 nM da droga foram capazes de inibir 50% da atividade gelatinolítica de ambas MMP-2 e MMP-9. Os autores discutem neste trabalho que a discrepância verificada entre as concentrações inibitórias do ensaio zimográfico (da ordem de mM) e o ensaio em solução (da ordem de nM) seria devida à dificuldade do captopril em penetrar no interior do gel.

Desde então vários outros estudos passaram a investigar a hipótese de que fármacos inibidores da ECA também possam atuar como inibidores de gelatinases. Dentre eles, cinco estudos empregaram a zimografia em gel como método de quantificação, quatro dos quais utilizaram como amostras o sobrenadante não purificado de extratos de tecido. Outros estudos por sua vez, utilizaram a construção de modelos moleculares para prever as interações químicas pertinentes aos complexos enzima-inibidor.

No estudo de Reinhardt et al. (2002), amostras de ventrículo esquerdo de humanos foram obtidas durante o transplante cardíaco de indivíduos com insuficiência cardíaca ou ainda de indivíduos com morte cerebral. Estes tecidos foram incubados em tampão de extração de proteínas por 72 horas, cujas alíquotas da solução tampão foram utilizadas diretamente para visualização da atividade gelatinolítica em géis de zimografia, na presença ou ausência de inibidores da ECA. A MMP-2 foi inibida significativamente pelo captopril e o ramiprilato ($IC_{50}=2,00 \pm 0,06$ mM e $IC_{50}=2,10 \pm 0,09$ mM, respectivamente), mas não pelo lisinopril, ao passo que a MMP-9 foi inibida pelos três fármacos. Segundo os autores, as concentrações das drogas nos zimogramas foram muito superiores às aquelas presentes no sangue em virtude da dificuldade de acesso que o gel representaria para as drogas.

Brower, Levick e Janicki (2007) investigaram não somente se os inibidores da ECA podem atuar diretamente sobre as metaloproteinases, mas também se esta ação é responsável por efeitos benéficos dos inibidores da ECA em pacientes com insuficiência cardíaca. Neste sentido, extratos de tecido cardíaco de ratos com fístula aortocaval foram utilizados para realização de zimogramas, cujos géis foram incubados somente em solução tampão de Tris- CaCl_2 ou na presença dos inibidores da ECA. Tais experimentos mostraram que a atividade da MMP-2 foi significativamente reduzida pelo captopril (0,25 mM), lisinopril (0,035 mM) e quinapril (0,1 mM), quando comparada ao controle sem droga. Por outro lado, esses fármacos foram utilizados ainda para o tratamento de outro grupo de ratos, que teve início 24 horas antes da cirurgia para criação da fístula. Enquanto a fístula levou a um aumento da atividade da MMP-2 nos animais não tratados com relação aos controles, o tratamento com captopril (200 mg/Kg/dia), lisinopril (10 mg/Kg/dia) ou quinapril (10 mg/Kg/dia) impediu este aumento, de modo que a atividade da MMP-2 se manteve no nível dos controles. Além disso, o lisinopril administrado por oito semanas impediu a dilatação do ventrículo esquerdo nos animais com fístula, preservando função diastólica. Estes resultados em conjunto sugerem um efeito direto destas drogas sobre a MMP-2, que parece ser o mecanismo responsável pela atenuação do remodelamento do miocárdio em modelo de insuficiência cardíaca, independente do sistema renina-angiotensina-aldosterona.

Por outro lado, verificou-se que o modelo de hipertensão pulmonar induzida por monocrotalina em ratos levava ao aumento da expressão de MMP-2 e de MMP-9 no ventrículo direito após 25 dias. Os animais que receberam captopril tiveram redução do aumento da expressão de MMP-2 e MMP-9 em níveis similares aos dos animais controle, assim como diminuição da fibrose e da hipertrofia do ventrículo direito. As concentrações de MMP-2 e MMP-9 no grupo controle que recebeu somente captopril não apresentaram diferença do grupo controle sem captopril (OKADA et al., 2008). Este estudo mostra que a administração *in vivo* do captopril melhora vários parâmetros de função cardiovascular e também diminui a expressão de gelatinases.

Recentemente, Efsen et al. (2011) examinaram a atividade proteolítica das MMPs presentes no tecido de fístulas gastrointestinais obtidas cirurgicamente de indivíduos portadores da doença de Crohn. Os extratos que foram incubados com ramiprilato mostraram 42% de inibição da atividade proteolítica devida a MMPs em

ensaio com substrato fluorimétrico seguido da detecção por HPLC, enquanto a incubação com doxiciclina não alterou significativamente a atividade das MMPs. Os ensaios com o kit “*MMP Biotrack activity assays*” (GE Healthcare Life Sciences, UK) por sua vez, mostraram que o ramiprilato inibiu a atividade da MMP-3 presente nas fístulas em 72%, enquanto a MMP-9 teve a atividade reduzida em 97%, se comparados aos controles. Estes resultados concordam com aqueles obtidos com MMP-3 e MMP-9 recombinantes, nos quais o ramiprilato inibiu tais proteases de forma concentração-dependente, com efeito inibitório máximo na concentração de 10 µg/mL, que corresponde a 25,7 µM.

Com o propósito de investigar *in silico* o possível efeito direto dos inibidores da ECA sobre as gelatinases, estudos construíram modelos tridimensionais para investigar as interações moleculares envolvidas na inibição da MMP-9 pelo lisinopril (YAMAMOTO; TAKAI; MIYAZAKI, 2007) e pelo imidapril (YAMAMOTO et al., 2007). As interações moleculares previstas pelos modelos de ambos os trabalhos sugerem que o complexo MMP-9-inibidor em cada caso seja estabilizado preferencialmente mediante de interações hidrofóbicas entre o grupo feniletil da droga e o sítio “*S₁ pocket*” da enzima, uma vez que a interação deste mesmo grupo com o “*S₁' pocket*” requer rotações significativas dos anéis imidazólicos das His 405 e His 411 da MMP-9. Além disso, o lisinopril é também estabilizado no sítio ativo da MMP-9 por meio de ligações de hidrogênio, de forma similar ao que ocorre com o lisinopril e enalaprilato no sítio ativo da ECA.

A inibição da atividade proteolítica da MMP-9 pela ação do captopril também foi estudada. Yamamoto, Takai e Miyazaki (2008) utilizaram amostras de plasma humano colhidas de indivíduos que se encontravam durante a fase aguda do após infarto do miocárdio para realização de ensaios de atividade da MMP-9 com kit específico (Amersham Biosciences Co, NJ). A incubação prévia das amostras com captopril promoveu uma inibição concentração-dependente da atividade da MMP-9, com IC₅₀=87 nM. Neste trabalho, o modelo tridimensional proposto para o complexo MMP-9-captopril sugere que as interações hidrofóbicas com o domínio catalítico não sejam essenciais. Isto porque o captopril não apresenta uma grande porção hidrofóbica (como o grupo feniletil do lisinopril e imidapril) e ainda assim parece interagir diretamente com o domínio catalítico da MMP-9 sem promover distorções moleculares, em virtude de sua menor estrutura.

De acordo com Yamamoto et al. (2010), o captopril é capaz de inibir diretamente também a atividade da MMP-2. Este efeito foi observado sobre as gelatinases presentes em amostras da solução de diálise drenada de indivíduos submetidos à diálise peritoneal ambulatorial contínua, que foram incubadas em concentrações crescentes de captopril e utilizadas para realização de ensaios específicos de atividade ("*MMP-2 activity assay system*", Amersham Biosciences Co, NJ). Os resultados destes ensaios mostraram que houve inibição da atividade da MMP-2 pelo captopril, com $IC_{50}=48\ \mu M$.

Nesse mesmo trabalho, o modelo molecular mais estável construído para o complexo MMP-2-captopril compreende uma ligação de hidrogênio entre a carbonila central do captopril e o resíduo Leu164, ao passo que o anel pirrolidina do fármaco estabelece interações hidrofóbicas com os resíduos Leu 163 e Leu 164 (YAMAMOTO et al., 2010). Adicionalmente, os autores relataram que os modelos moleculares sustentam a hipótese de que o grupo sulfidril do captopril pode interagir diretamente o Zn^{2+} do sítio ativo da MMP-2. Nota-se que este mecanismo também foi descrito como responsável pela inibição da ECA pelo captopril (NATESH et al., 2004).

Todavia existe ainda uma grande carência de estudos sobre essa questão utilizando preparações purificadas de gelatinases. Além disso, os estudos *in vitro* utilizando a incubação de géis de zimografia não descreveram nenhuma consideração sobre aspectos químicos destas drogas quando em solução.

HIPÓTESE

2. HIPÓTESE

Levando-se em consideração que:

1. os domínios estruturais da ECA e gelatinases compartilham de similaridades;
2. existem evidências na literatura quanto à inibição das MMP-2 e MMP-9 por vários inibidores da ECA;
3. o captopril é um ácido diprótico com $pK_{a1}=3,7$;
4. a carência de estudos que investiguem a inibição da atividade gelatinolítica da MMP-2 pela ação de inibidores da ECA em preparações purificadas e que considerem o possível efeito dessas drogas sobre o pH das soluções tampão utilizadas;

a hipótese deste trabalho é de que a solubilização do captopril induza a mudanças no pH de soluções tampão e de que essa droga detenha propriedades inibitórias sobre a MMP-2 humana em concentrações que possam ser comparadas àquelas encontradas *in vivo*.

OBJETIVOS

3. OBJETIVOS

- 1- Verificar se a dissolução do captopril em soluções tampão Tris- CaCl_2 (Tris-HCl 50 mM e 200 mM) promove alterações significativas no pH destas soluções;
- 2- verificar se o captopril promove diminuição da atividade da MMP-2 presente no plasma de humanos;
- 3- avaliar se o captopril inibe diretamente a rhMMP-2 purificada.

MATERIAIS E MÉTODOS

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. MATERIAIS

4.1.1. Reagentes utilizados nos experimentos

- Ácido acético glacial (VETEC, São Paulo, SP, Brasil);
- Acrilamida (VETEC, São Paulo, SP, Brasil);
- Agarose (Merck S.A., São Paulo, SP, Brasil);
- APS (Amersham Biosciences GE, Uppsala, Suécia);
- Azul de bromofenol (Usb Corporation, Cleveland, Ohio, USA);
- Bisacrilamida (Amersham Biosciences GE, Uppsala, Suécia);
- CaCl_2 (Sigma, St. Louis, MO, USA);
- Coomassie Brilliant Blue G-250 (Usb Corporation, Cleveland, Ohio, USA);
- Gelatina (Sigma, St. Louis, MO, USA);
- Metanol (VETEC, São Paulo, SP, Brasil);
- Reagente de Bradford (Sigma, St. Louis, MO, USA);
- SDS (Usb Corporation, Cleveland, Ohio, USA);
- TEMED (Sigma, St. Louis, MO, USA);
- Tris Base (Amersham Biosciences GE, Uppsala, Suécia);
- Triton X-100 (Merck S.A., São Paulo, SP, Brasil);
- 1,10-fenantrolina (Amersham Biosciences GE, Uppsala, Suécia).

4.1.2. Soluções utilizadas nos experimentos

- solução tampão utilizado no gel de separação: Tris-HCl/SDS (Tris 1,5 M, SDS 0,4%, pH 8,8);
- solução tampão utilizado no gel de largada: Tris-HCl/SDS (Tris 0,5 M, SDS 0,4%, pH 6,8);

- solução tampão de amostra não-redutor (Tris-HCl/SDS 0,1 M pH 6,8, glicerol 20%, azul de bromofenol 0,02%);
- solução de Triton X-100 2%;
- solução de Agarose 3%;
- APS 10%;
- solução de acrilamida 30% e bisacrilamida 0,8%;
- solução de coloração com Coomassie Brilliant Blue G-250 (metanol 30%, ácido acético 10%, Coomassie Brilliant Blue G-250 0,05%);
- solução descorante (metanol 25% e ácido acético 17%);
- solução Tris-HCl (1 M);
- solução tampão de Tris-CaCl₂ (Tris-HCl 50 e 200 mM, CaCl₂ 10 mM, ZnCl₂ 1μM, pH 7,4);
- solução de DQ gelatin 5 μg/mL (Molecular Probes, Oregon, USA);
- solução de *Clostridium* sp. 2U/mL (Molecular Probes, Oregon, USA).

4.1.3. Droga

Captopril (1-[(2S)-3-mercaptopropionil]-L-prolina) foi adquirido de Sigma-Aldrich (C4042-5G; St. Louis, MO, USA).

4.1.4. Equipamentos utilizados nos experimentos

- Balança de precisão (Shimadzu AY220);
- banho-maria (Nova Ética);
- pHmetro (Incibrás);
- centrífuga refrigerada (CELM – 3 plus);
- coluna de gelatina (Gelatin Sepharose™ 4B, Amersham Biosciences GE, Uppsala, Suécia);
- fonte de eletroforese (Electrophoresis Power Supply – EPS 301);
- espectrofluorímetro (Gemini EM, Molecular Devices, Sunnyvale, CA);
- estufa (Soc. FABBE Ltda.).

4.1.5. Programas de aquisição de dados

- ImageJ Program (NIH – National Institutes of Health);
- KCJunior e SoftMax Pro (Molecular Probes, Oregon, USA).

4.2. MÉTODOS

4.2.1. Determinação do pH de soluções tampão Tris-CaCl₂ na presença de captopril

Nos estudos de inibição descritos na literatura, os ensaios de zimografia utilizaram solução tampão com Tris a 50 mM e CaCl₂ a 10 mM (BROWER; LEVICK; JANICKI, 2007; REINHARDT et al., 2002; SORBI et al., 1993), que com pH de 7,4 é reconhecidamente a solução mais adequada para que as gelatinases apresentem atividade. Considerando a hipótese de que o captopril poderia ter algum efeito sobre o pH da solução tampão foram preparadas soluções Tris-CaCl₂ (Tris-HCl 50 mM) e Tris-CaCl₂ (Tris-HCl 200 mM) (pH 7,4), em que o captopril foi solubilizado na concentração de 8 mM. Em seguida, foram realizadas diluições seriadas utilizando novamente solução tampão Tris-CaCl₂ (Tris-HCl 50 ou 200 mM) a partir da solução de 8 mM para obtenção das demais concentrações. O pH das soluções foi então determinado e, quando necessário, reajustado para 7,4 com NaOH (1 e 10 mM).

Após a incubação dos géis de zimograma em estufa por 17 horas a 37° C nestas soluções tamponantes, o pH de cada concentração de captopril em Tris-CaCl₂ foi novamente aferido.

4.2.2. Preparação das mostras

4.2.2.1. Plasma

Colheram-se amostras de sangue de seis voluntários saudáveis em tubos Vacutainer (Becton-Dickinson, Brasil) contendo heparina lítica e centrifugados por 15 minutos a 1000g (4°C) para obtenção do plasma. Essas amostras foram aliquotadas em tubos Eppendorf e armazenadas a uma temperatura de -80°C para análises posteriores.

4.2.2.2. MMP-2 Recombinante Humana (rhMMP-2)

A rhMMP-2 em sua forma de zimogênio (72 kDa) foi expressa em *E. coli* e purificada como descrito por Gonçalves et al. (2012). Em suma, para a expressão da proteína recombinante em bactérias utilizamos a transformação do DNA plasmidial pET5a-MMP-2 em cepas de *E. coli* BL21(DE3)/pLysS CaCl₂ competentes utilizando o método de choque térmico (SAMBROOK; FRITSCH; MANIATIS, 1989). Células foram plaqueadas em meio LB-ágar (Tryptona 10 g/L, extrato de levedura 5 g/L, cloreto de sódio 5 g/L, pH 7,4 e ágar 1,5%), contendo 100 µg/mL ampicilina e 34 µg/mL cloranfenicol e incubadas por um período 14 a 18 horas à 37°C. Dessas placas foi então recolhida uma colônia para inoculação de 5 mL de meio LB (contendo 100 µg/mL de ampicilina e 34 µg/mL de cloranfenicol), que permaneceu sob agitação constante a 37°C por 18 horas, resultando no pré-inóculo. Em seguida 500 µL desse pré-inóculo foi transferido para 50 mL de meio LB líquido, acrescido dos respectivos antibióticos e de 5 mL de glicose. A cultura foi incubada, sob as mesmas condições, ao longo de 2 a 4 horas até atingir a absorbância entre 0,5 e 0,7 a 600 nm, quando foi adicionado ao meio 0,05 mM isopropil beta-tiogalactosídeo (IPTG) para indução da expressão gênica. Após 18 horas o meio foi centrifugado para obtenção das células em “pellets”, que foram sonicados e novamente centrifugados, separando-se o sobrenadante para purificação da rhMMP-2 em coluna de gelatina-sepharose (Gelatin Sepharose™ 4B, Amersham

Biosciences). Já purificada, a rhMMP-2 foi aliquotada em tubos Eppendorf, liofilizada e armazenada a -80°C .

Amostras recolhidas durante diferentes etapas do processo de purificação foram submetidas à eletroforese em géis de SDS-PAGE corados com AgNO_3 (0,2%) a fim de checar a purificação das amostras. A atividade da rhMMP-2 purificada foi verificada em zimogramas, em que se observaram duas bandas com pesos moleculares correspondentes a 72 kDa e ~60 kDa (que é compatível com o peso molecular da forma enzimática na ausência do domínio pró-peptídico). Realizam-se também, ensaios de fluorimetria utilizando DQ gelatin como substrato.

4.2.3. Dosagem de proteína pelo método de Bradford

A fim de determinar a quantidade de rhMMP-2 presente em cada alíquota e evitar variações proteicas nos ensaios subsequentes, utilizou-se o método de Bradford de quantificação de proteínas. Nesse método espectrofotométrico, o reagente adquire uma coloração azul ao se ligar às proteínas da amostra, que é quantificada em espectrofotômetro de luz visível (595 nm). Assim, como a intensidade da cor varia de acordo com a quantidade de proteína, é possível quantificar as concentrações de proteína total presentes em cada amostra.

A curva padrão foi realizada com albumina do soro bovino (BSA) diluída em água destilada nas seguintes concentrações em mg/mL: 0,03; 0,06; 0,12; 0,25; 0,50; 1,00; e 2,00. Para cada 5 μL de amostra (rhMMP-2 ressuspensa em água destilada) adicionando-se 250 μL de reagente de Bradford. Com os valores obtidos após a leitura, em $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, foi possível padronizar a quantidade de proteína empregada nos ensaios de zimografia e de fluorimetria.

4.2.4. Determinação da atividade da MMP-2 por zimografia em gel

A atividade gelatinolítica das MMP-2 presente no plasma humano e rhMMP-2 foram determinadas pelo método de zimografia, que envolve a separação

eletroforética das proteínas das amostras sob condições desnaturantes e não-redutoras em géis de SDS-PAGE permeados com o substrato da enzima (gelatina) (KUPAI et al., 2010).

As amostras foram diluídas em tampão de amostra não redutor (SDS 2%, Tris-HCl 125 mM, glicerol 10% e azul de bromofenol 0,001%; pH 6,8) e aplicadas em géis de poliacrilamida a 7% contendo 1% gelatina (1 mm de espessura), de forma que estavam presentes em cada canaleta do gel 1,25 µL de plasma ou 0,25 µg de rhMMP-2. Conforme a técnica SDS-PAGE, as proteínas foram separadas por eletroforese a 16 mA.

Em seguida, os géis foram submetidos a dois banhos, de 30 minutos cada, em Triton X-100 a 2% à temperatura ambiente para remoção do SDS e renaturação das proteínas. Os géis foram cortados em tiras de aproximadamente 1 cm que foram incubadas a 37°C por 17 horas em solução tampão Tris-CaCl₂ (Tris-HCl 200 mM, CaCl₂ 10 mM, pH 7,4), na ausência ou presença de captopril nas concentrações de 0,5; 1,0; 2,0; 4,0 ou 8,0 mM. Como já descrito, o pH de todas essas soluções foi verificado e corrigido para 7,4 após a diluição da droga. Os géis foram então fixados e corados por 3 horas em solução Coomassie Blue 0,05%, sendo posteriormente descorados.

A atividade gelatinolítica foi observada como bandas descoradas contra o fundo azul do Coomassie em virtude da gelatina incorporada ao gel, que foram quantificadas usando o programa ImageJ software (NIH, Bethesda, MD, USA). As eventuais variações nas bandas decorrentes de diferenças na intensidade de coloração dos géis foram normalizadas através do padrão interno utilizado em cada gel (soro fetal bovino a 2%), de modo a permitir a comparação entre os géis. As formas da MMP-2 foram identificadas pelos seus pesos moleculares (72 e ~60 kDa) e inibidas por 1,10-fenantrolina (1mM).

4.2.5. Determinação da atividade gelatinolítica por fluorimetria

A fim de examinar se o captopril inibe diretamente a atividade da MMP-2 *in vitro*, a atividade gelatinolítica de amostras de rhMMP-2 foi avaliada na ausência e presença da droga utilizando o kit EnzChek Gelatinase/Colagenase (E-12055,

Molecular Probes, Oregon, USA). Antes da execução do ensaio, realizou-se a dosagem de proteína das amostras pelo método de Bradford, segundo descrito anteriormente (item 4.2.3). Assim, 300 ng de proteína foram aplicados em cada um dos poços de uma microplaca, juntamente com o substrato fluorescente DQ gelatin (E-12055, Molecular Probes, Oregon, USA) na concentração de 5 µg/mL em tampão Tris-CaCl₂ (Tris-HCl 200 mM, CaCl₂ 10 mM, ZnCl₂ 1 µM). Além disso, uma hora antes do início do experimento, parte das amostras de rhMMP-2 incubada com APMA (1 mM). O APMA é um composto de mercúrio amplamente utilizado para ativação das formas latentes pró-MMPs por um mecanismo alostérico, onde o pró-peptídeo é deslocado de sua interação com o sítio catalítico da enzima, sem o clivagem deste domínio (HADLER-OLSEN et al., 2011).

A intensidade de fluorescência foi determinada em espectrofluorímetro ($\lambda_{\text{excitação}}$: 495 e $\lambda_{\text{emissão}}$: 515 nm; Gemini EM, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA) durante 2 horas de incubação a 37°C na ausência e presença de captopril (0,25; 0,50; 1,00; 2,00; 4,00; e 8,00 mM). A curva padrão foi preparada de acordo com a recomendação do fabricante, com a diluição de *Clostridium sp.* em tampão Tris-CaCl₂ (Tris-HCl 200 mM) nas concentrações de 1000 µU a 6,2 µU. O veículo isoladamente, 1,10-fenantrolina (1 mM) e PMSF (1 mM) foram utilizados para confirmar a especificidade do ensaio, sendo que a atividade gelatinolítica foi reduzida significativamente apenas pela 1,10-fenantrolina.

4.2.6. Análise estatística

Os resultados obtidos entre os grupos (diferentes concentrações de captopril) foram analisados pelo teste ANOVA de uma via seguido de teste Tukey. Quando comparados apenas dois grupos as diferenças foram analisadas pelo teste t de *student*.

Os cálculos das concentrações protonadas e desprotonadas do Tris nas soluções tampão foram realizados considerando as condições de equilíbrio químico e a equação de Henderson-Hasselbalch (Apêndice A). O IC₅₀ foi estimado por regressão linear e o valor de K_i foi estimado através da aplicação da equação de Cheng-Pursoff (Apêndice B).

Todos os resultados foram expressos como média $\pm$ EPM e as diferenças com valores de $p < 0,05$ foram consideradas estatisticamente significantes. Para os cálculos estatísticos e elaboração gráfica, utilizou-se aplicativo informatizado GraphPad Prism 5 for Windows (GraphPad Software Inc., USA, 2007).

RESULTADOS

5. RESULTADOS

5.1. EFEITO DO CAPTOPRIL SOBRE O pH DAS SOLUÇÕES DE Tris-CaCl₂

Primeiramente, como mostra a figura 4A, verificou-se o efeito da solubilização do captopril sobre o pH de soluções tampão Tris-CaCl₂ (Tris-HCl 50 mM) e Tris-CaCl₂ (Tris-HCl 200 mM). Após a adição do captopril em Tris-CaCl₂ (Tris-HCl 50 mM) foi observada uma redução significativa do pH nas soluções com concentrações iguais ou maiores que 1 mM da droga quando comparados aos grupos controle (ausência da droga) ($p < 0,05$), alcançando valores com média de $3,87 \pm 0,22$ nas soluções contendo 8 mM de captopril. Por outro lado, a solução Tris-CaCl₂ (Tris-HCl 200 mM) se manteve próxima da neutralidade mesmo diante da concentração mais elevada de captopril (8 mM: $7,18 \pm 0,12$). Deste modo, nenhuma diferença significativa foi observada entre os valores médios de pH das crescentes concentrações de captopril em solução Tris-CaCl₂ de 200 mM e o controle sem droga ($p > 0,05$; Figura 4A). Finalmente, quando comparados os valores de pH obtidos com a solução tampão Tris-CaCl₂ (Tris-HCl 50 mM) *versus* Tris-CaCl₂ (Tris-HCl 200 mM), diferenças significativas foram verificadas entre as soluções com concentrações iguais ou maiores que 1 mM ($p < 0,01$). Os cálculos das concentrações protonadas e desprotonadas do Tris que descrevem esses efeitos sobre o pH observados experimentalmente estão demonstrados no Apêndice A.

Além disso, foi avaliada a capacidade dessas soluções em manter o pH neutro durante a incubação em estufa a 37°C por 17 horas (Figura 4B), uma vez que após a solubilização do captopril todos pHs foram reajustados para 7,4. Assim, não se detectou nenhuma diferença significativa entre valores médios de pH em ambos os Tris-CaCl₂ com Tris-HCl a 50 mM e 200 mM ($p > 0,05$).

Assim sendo, em todos os experimentos deste estudo somente a solução tampão de Tris-CaCl₂ (Tris-HCl 200 mM) foi utilizada. Embora para este tampão as pequenas alterações do pH não tenham se mostrado estatisticamente significantes, quando necessário elas foram devidamente corrigidas com NaOH (1 e 10 mM) para pH=7,4.

Figura 4 – Efeito da solubilização do captopril sobre o pH de soluções tampão Tris-CaCl₂ nas concentrações de 50 mM e 200 mM antes (A) e após a correção do pH para 7,4 seguida da incubação por 17 horas (B). Valores expressos como média $\pm$ EPM (n=3 por grupo). * $p < 0,01$ e ** $p < 0,0001$ para cada concentração de captopril em Tris-CaCl₂ (Tris-HCl 50 mM) versus a concentração correspondente em Tris-CaCl₂ (Tris-HCl 200 mM).

5.2. EFEITO DO CAPTOPRIL SOBRE A ATIVIDADE DA MMP-2 DE PLASMA HUMANO

Géis de zimografia com gelatina foram utilizados para avaliar se concentrações crescentes de captopril inibiram a atividade da MMP-2 de plasma humano, como mostrado na figura 5. Quando comparados ao controle (ausência de droga) encontraram-se diferenças estatisticamente significativas somente para as concentrações de 4 e 8 mM de captopril ($p < 0,05$; Figura 5B), com redução de aproximadamente 55,4% e 50,8%, respectivamente, na atividade proteolítica no gel (quando comparados ao controle sem droga, considerado 100% de atividade). Os resultados sugerem que mesmo as concentrações de 1 e 2 mM de captopril podem ter efeitos inibitórios, porém que não foram suficientemente fortes nos ensaios para alcançar significância estatística.

Figura 5 – Efeito do captopril sobre a atividade gelatinolítica da MMP-2 de plasma humano. (A) Painel representativo das tiras de zimografia SDS-PAGE de plasma humano após incubação na ausência (0) ou presença de captopril (1, 2, 4 e 8 mM). PAD: padrão interno. (B) Representação gráfica dos valores para a atividade gelatinolítica da pró-MMP-2 (72 kDa). Valores expressos como média $\pm$ EPM. (n=3 por grupo, em quintuplicata). * $p<0,05$ versus controle (0).

5.3. EFEITO DO CAPTOPRIL SOBRE A ATIVIDADE DA rhMMP-2 POR ZIMOGRAFIA

Um painel representativo dos ensaios de zimografia realizados com rhMMP-2 é apresentado na figura 6A, mostrando a inibição da atividade enzimática em função das concentrações crescentes de captopril. Foram detectadas bandas de massa molecular de 72 kDa que correspondem a forma pró-MMP-2 e outras de menor peso molecular (~60 kDa), provavelmente resultantes da perda do pró-domínio durante o processo de purificação.

A partir da concentração de 1 mM de captopril a redução da atividade gelatinolítica da MMP-2 (72 kDa) alcançou diferenças com significância estatística, quando comparada ao controle sem droga ($p < 0,05$; Figura 6B). Diante da concentração de 8 mM de captopril houve uma redução de aproximadamente 59,5% na atividade gelatinolítica comparado com o grupo controle (de $0,89 \pm 0,10$ U.A. para $0,36 \pm 0,02$ U.A.; $p < 0,01$; Figura 6B).

A análise desses resultados permitiu estimar $IC_{50} = 3,47$ mM ($r^2 = 0,98$; $p = 0,003$). Considerando o valor médio de K_M referente à MMP-2 e ao substrato (gelatina) utilizado na técnica de zimografia igual a $89,3 \pm 23,6$ nM (YOUNG; PIZZO; STACK, 1995), foi possível calcular também $K_i = 3,08$ μ M através da equação de Cheng-Pursoff (Apêndice B).

Na presença de 0,5 mM de captopril, a atividade gelatinolítica também foi inibida, porém é provável que mais repetições sejam necessárias para que os dados alcancem significância estatística.

Figura 6 – Efeito do captopril sobre a atividade gelatinolítica da rhMMP-2 por zimografia. (A) Painel representativo das tiras de zimografia SDS-PAGE de rhMMP-2 após incubação na ausência (0) ou presença de captopril (0,5, 1, 2, 4 e 8 mM). (B) Representação gráfica dos valores para a atividade gelatinolítica da Pro-rhMMP-2 (72 kDa). Valores expressos como média $\pm$ EPM. (n=3 por grupo, em quintuplicata). * $p<0,05$ e ** $p<0,01$ versus controle (0).

5.4. EFEITO DO CAPTOPRIL SOBRE A ATIVIDADE DA rhMMP-2 POR FLUORIMETRIA

Tendo em vista que a zimografia consiste em um ensaio em que o substrato permeia uma matriz de gel de poliacrilamida, é possível que a atividade proteolítica apresente diferenças quando o substrato considerado é livre em solução. Por isso teve-se como propósito avaliar o perfil inibitório do captopril também em ensaios fluorimétricos realizados em solução, utilizando DQ gelatin como substrato.

Observou-se que a presença de captopril promoveu uma inibição significativa da rhMMP-2 somente em concentrações iguais ou superiores a 2 mM ($p < 0,01$; Figura 7A). Considerando o grupo controle como 100% de atividade gelatinolítica, a concentração mais elevada de captopril promoveu uma redução de aproximadamente 21,6% da atividade gelatinolítica (de $1349,75 \pm 38,81$ U.A. para $1057,76 \pm 32,82$ U.A. em 8 mM; $p < 0,0001$; Figura 7A).

Nota-se, porém, que quando previamente ativada com APMA a rhMMP-2 foi inibida de modo mais intenso pelo captopril, tendo a atividade reduzida em aproximadamente 42,3% diante da concentração de 8 mM. Assim, diferenças significativas foram observadas a partir de 0,5 mM de captopril ($p < 0,01$; Figura 7B). Registrou-se em uma concentração mais baixa (0,25 mM), a tendência a inibição da rhMMP-2, que no entanto, não atingiu significância estatística.

Concentrações ainda menores de captopril (125 μ M; 62,5 μ M; 31,25 μ M e 15,62 μ M) também foram testadas, mas não foi observada redução significativa na atividade gelatinolítica da rhMMP-2 em ambos os ensaios em que o APMA esteve presente ou não (dados não mostrados).

Figura 7 – Efeito de concentrações crescentes de captopril sobre a atividade gelatinolítica da rhMMP-2 por fluorimetria na ausência (A) ou presença (B) de APMA (0,5 mM). 1,10-Fenantrolina (Phe) foi utilizada como controle negativo para inibição da atividade da MMP-2. Valores expressos como média $\pm$ EPM; (n=4 por grupo, em duplicata); * p <0,01 e ** p <0,0001 versus controle (0).

DISCUSSÃO

6. DISCUSSÃO

Há vários trabalhos na literatura que relatam a inibição efetiva das gelatinases por fármacos desenvolvidos a princípio como inibidores da ECA, como o captopril. Embora o captopril seja considerado um ácido diprótico em virtude da presença de dois hidrogênios ionizáveis em sua molécula, os estudos baseados em ensaios de atividade gelatinolítica *in vitro* que empregaram como metodologia a dissolução do captopril em soluções tamponantes, não descreveram alterações no pH destas soluções (BROWER; LEVICK; JANICKI, 2007; SORBI et al., 1993; REINHARDT et al., 2002).

Desta maneira, supôs-se que a solubilização do captopril poderia alterar o pH de soluções tampão, sendo este um efeito relevante que poderia interferir na atividade proteolítica das MMPs. Neste sentido, verificaram-se os valores de pH referentes às concentrações de captopril em soluções Tris- CaCl_2 de 50 e 200 mM, cujos resultados mostraram que o captopril de fato acidifica a solução tampão Tris- CaCl_2 de 50 mM, enquanto o Tris- CaCl_2 a 200 mM não teve seu pH significativamente afetado pela droga.

Estes efeitos foram descritos através da relação de Henderson-Hasselbalch e das condições de equilíbrio químico encontradas diante da adição de 8 mM de captopril às soluções tampão (Apêndice A). No caso do Tris- CaCl_2 (Tris-HCl 50 mM), as formas desprotonadas do reagente Tris foram consumidas quase por completo pelo captopril, caracterizando uma condição crítica de limite da capacidade da tamponante, já que a adição de qualquer quantidade mínima da droga poderia reduzir drasticamente o pH da solução. Em contrapartida, o Tris- CaCl_2 de 200 mM se mostrou eficaz em manter o pH estável mesmo após a solubilização do captopril pois as formas desprotonadas do Tris estavam em concentração muito superior àquela consumida pela ionização completa do captopril.

Perante essas constatações, todos os experimentos seguintes que compõem este trabalho foram realizados exclusivamente com solução tampão Tris- CaCl_2 (Tris-HCl 200 mM), sendo assim pouco provável que os resultados obtidos tenham sofrido alguma interferência por conta de variações no pH do meio.

Gerlach e Line (2000) escreveram em uma carta ao editor sobre a importância de prestar atenção ao pH das soluções tampão utilizadas para testar o efeito de sais

metálicos sobre o atividade de proteases. Este aspecto foi notado quando testaram o efeito de diversos metais na atividade de gelatinases encontradas em explantes de tecido gengival, em MMP-2 e MMP-9 humanas purificadas (DE SOUZA; GERLACH; LINE, 2000), e em proteinases do esmalte dentário (GERLACH ET AL., 2000).

A atividade enzimática é sensível a variações do pH, que podem promover, por exemplo, a ionização do grupo responsável pela atividade catalítica, resultando na inibição enzimática mesmo sem alterações estruturais severas. Outro fator importante é que, uma vez o pH seja distante do ponto isoelétrico, existe a tendência das proteínas perderem sua conformação (“*unfolding*”). Resíduos de histidina, por exemplo, são grandes responsáveis pelo “*unfolding*” de proteínas em pH ácido. A princípio este processo poderia ser revertido com o simples reajuste do pH, entretanto no caso das proteases este aspecto é ainda mais relevante, pois muitas dessas enzimas se tornam mais susceptíveis à degradação proteolítica pela exposição de certos aminoácidos após a acidificação do meio, o que pode levar à proteólise por outras proteases e à autólise (VOLKIN; KLIBANOV, 1997).

Segundo Davis e Martin (1990) a forma latente da MMP-9 é ativada após pré-tratamento em meios ácidos de pH 2-3,6 e o possível mecanismo de ação seria a alteração conformacional da enzima seguida de autoativação. Resultados semelhantes foram obtidos posteriormente por Okada et al. (1995), que relataram a ativação da MMP-9 após incubação em pH 2,3. Já com relação à MMP-3, a auto-ativação do zimogênio foi relatada em pH 5,5, sem envolver alteração do peso molecular (GUNJA-SMITH; WOESSNER, 1993). Tjäderhane et al. (1998) por sua vez, mostraram que a ativação ácida em pH=4,5 leva a um aumento na atividade gelatinolítica das MMP-2 e MMP-9 em amostras em que estavam presentes as isoformas latentes.

O captopril é instável em pH acima de 4 e seu grupo carboxila se encontra completamente ionizado em pH 7,4 (REMKO, 2007; TIMMINS et al., 1982), justificando o perfil de alteração do pH da solução Tris-CaCl₂ observado no presente estudo após a dissolução do fármaco. Assim sendo, esse é um aspecto que deve ser considerado em estudos que avaliam a atividade gelatinolítica das MMPs *in vitro* utilizando concentrações maiores ou iguais a 1mM de captopril em solução Tris-CaCl₂ (Tris-HCl 50 mM).

Além disso, supôs-se que o captopril poderia inibir diretamente a rhMMP-2 altamente purificada nos dois ensaios de atividade gelatinolítica mais utilizados, a

zimografia e ensaio fluorimétrico. A fim de verificar se há diferenças na inibição observada em preparações não purificadas, plasma humano também foi utilizado para realização de zimogramas.

Foi possível observar o efeito inibitório do captopril sobre a atividade da MMP-2 tanto nos ensaios de zimografia com plasma humano quanto aqueles que utilizaram a rhMMP-2 purificada. Nota-se, no entanto, que os resultados obtidos nos experimentos com a rhMMP-2 apresentaram diferenças estatisticamente significantes desde a concentração de 1 mM de captopril, enquanto somente a partir da concentração 4 mM de captopril houve inibição significativa da MMP-2 nos ensaios com amostras de plasma. Os resultados dos zimogramas realizados com a enzima recombinante purificada também atingiram maior significância estatística que aquela apresentada pela inibição da MMP-2 plasmática. Assim sendo, essas discrepâncias indicam que a utilização de enzimas purificadas também é importante para a realização de ensaios de inibição da MMP-2 pelo captopril através da técnica de zimografia.

De acordo com Cushman et al. (1977) o captopril inibe a ECA com K_i de 1,7 nM, ao passo que o enalaprilato (metabólito ativo do enalapril) é um potente inibidor da ECA apresentando um valor de $K_i=0,2$ nM (GOODMAN; HARDMAN; LIMBIRD, 2006). Sabendo que a constante de inibição K_i expressa o grau de interação entre um respectivo inibidor enzimático e a enzima, sendo um parâmetro mais adequado para a comparação da potência entre diferentes inibidores que o IC_{50} , o valor de K_i do captopril para a MMP-2 foi estimado em 3,08 μ M a partir dos zimogramas realizados com a rhMMP-2, sugerindo uma menor potência do captopril diante da MMP-2 se comparado à ECA.

Contudo, ainda com relação a esses experimentos, observou-se a inibição da MMP-2 somente concentrações do captopril muito superiores às aquelas encontradas na forma livre no plasma humano após a administração do captopril. Resultados semelhantes já haviam sido obtidos por estudos que também realizaram a incubação de géis de zimografia em soluções de Tris- $CaCl_2$ a 50 mM contendo captopril. Sorbi et al. (1993), por exemplo, relataram que a MMP-2 foi inibida perante concentrações de 20 mM e 40 mM do fármaco. Reinhardt et al. (2002) por sua vez, observaram a inibição da MMP-2 pelo captopril de forma concentração-dependente, com $IC_{50}=2 \pm 0,16$ mM, enquanto Brower, Levick e Janicki (2007) obtiveram inibição significativa dessa gelatinase utilizando 0,25 mM de captopril. Logo, o efeito do

captopril sobre a MMP-2 descrito por estes estudos também se refere a altas concentrações da droga que não refletem as condições encontradas *in vivo*.

Nesses trabalhos os autores justificaram a necessidade de usar concentrações elevadas do captopril em virtude de uma possível dificuldade da droga em penetrar o gel de zimografia para atingir a enzima (BROWER; LEVICK; JANICKI, 2007; REINHARDT et al., 2002; SORBI et al., 1993). Com o propósito de excluir esse fator de provável interferência nos resultados, em nosso estudo foram realizados ensaios fluorimétricos com a rhMMP-2 em solução. Supondo ainda que a interação entre o pró-domínio e o sítio catalítico da enzima represente um impedimento para realização da ligação do grupo sulfidril do captopril com o Zn^{2+} catalítico, não permitindo inibição da MMP-2, parte das alíquotas de rhMMP-2 foram previamente incubadas com APMA para promover a ativação das enzimas latentes pela indução de mudanças conformacionais na pró-enzima, seguidas pela autoclivagem do pró-peptídeo (HADLER-OLSEN et al., 2011).

Os dados obtidos por fluorimetria mostraram inibição significativa da rhMMP-2 pelo captopril somente em concentrações iguais ou maiores que 2 mM. Por outro lado, a incubação prévia da rhMMP-2 com APMA permitiu a inibição da atividade gelatinolítica desta enzima a partir da concentração de 0,5 mM de captopril, que alcançou ainda maior significância estatística nas concentrações iguais ou maiores que 2 mM. Dessa maneira, tais resultados concordam com outros trabalhos com relação à tese de que o captopril inibe a MMP-2 por meio da interação de seu grupo sulfidril com o Zn^{2+} catalítico, sendo compatíveis com a hipótese de que o pró-domínio esteja protegendo o sítio catalítico dessa enzima da interação com a droga.

O fato de termos encontrado inibição da MMP-2 em ambos os ensaios (zimografia e fluorimetria) por concentrações da mesma ordem de magnitude (mM) sugere que o argumento da suposta dificuldade do captopril em se difundir pelo gel talvez não tenha fundamento nas condições experimentais mais comumente utilizadas. Todavia, as concentrações de captopril que foram efetivas em inibir a rhMMP-2 nos ensaios fluorimétricos, apesar de serem menores que aquelas referentes aos zimogramas, ainda são muito superiores se comparadas às concentrações no contexto *in vivo*.

Com exceção de Sorbi et al. (1993) nenhum outro estudo sobre a inibição da MMP-2 pelo captopril desenvolveu com ensaios de atividade em solução. Como já citado na introdução, estes autores utilizaram um ensaio de ELISA modificado para

avaliar a atividade de frações purificadas de gelatinases, no qual a leitura de absorbância do sinal emitido pela peroxidase estava inversamente correlacionada com a atividade gelatinolítica. Como resultado, estes autores obtiveram a inibição de 50% da atividade proteolítica da MMP-2 após a incubação desta enzima em soluções de 30-50 nM de captopril, sendo que neste caso, as referidas concentrações de captopril *in vitro* são facilmente alcançadas *in vivo*. No entanto, esta técnica realiza uma medida indireta da atividade enzimática, por meio da ação de outra enzima, que de alguma forma também poderia ser afetada. É possível que, por este motivo, nossos resultados de atividade da MMP-2 em solução tenham sido obtidos somente em concentrações muito superiores.

Em todos os resultados deste estudo foi possível observar a inibição da MMP-2 somente perante concentrações do captopril muito superiores às aquelas encontradas na forma livre no plasma humano após a administração do captopril. Como exposto na introdução, estudos determinaram experimentalmente concentração plasmática máxima do captopril após a administração oral de dose única de 50 mg como da ordem de nM (MEDVEDOVICI et al., 2009; REZENDE et al., 2006; SOARES et al., 2006). Portanto, os resultados obtidos *in vitro* no presente estudo não refletem as situações encontradas *in vivo*.

Tendo isto em vista, a princípio não é possível atribuir parte das ações benéficas do captopril na função cardiovascular à inibição da MMP-2. Como exposto na introdução, alguns autores sugeriram a inibição de MMPs como mecanismo alternativo de ação dos inibidores da ECA, uma vez que alguns dos efeitos destes fármacos não parecem dependentes da modulação da ativação dos receptores AT1, pois não são observados mediante tratamentos com BRAII (SPINALE et al., 1997; YAMAMOTO; TAKAI, 2009). Neste sentido é importante que as ações dos inibidores da ECA sobre a bradicinina, óxido nítrico e prostaglandinas também sejam consideradas com relação a esses efeitos.

O efeito inibitório do captopril foi observado em nosso estudo apenas em concentrações seis ordens de magnitude maiores que as concentrações descritas *in vivo*. Para que esta discrepância seja mais fidedigna, faz-se necessária a caracterização da inibição da MMP-2 pelo captopril de forma mais completa, através da inclusão de cálculos dos parâmetros cinéticos. Embora nossos resultados tenham mostrado esta inibição, uma limitação do presente estudo foi justamente a inviabilidade de estimar estes parâmetros cinéticos devido à utilização da gelatina

como substrato nos zimogramas e da DQ gelatin como substrato nos ensaios fluorimétricos, uma vez que são substratos complexos clivados pela MMP-2 em múltiplos sítios. Essa limitação é facilmente contornada com o uso de substratos com um único sítio de clivagem pela MMP-2, sendo que ensaios dessa natureza deverão ser realizados em breve.

Em resumo, a análise conjunta desses resultados sugere que a inibição da MMP-2 pelo captopril não seja relevante nas concentrações encontradas *in vivo* desta droga. Além disso, as evidências aqui relatadas indicam que a inibição descrita previamente pelos demais estudos na presença de concentrações menores do inibidor podem em parte ser resultantes de um artefato, devido a imperícia com relação ao pH das solução tamponantes, que é alterado pelo captopril.

CONCLUSÃO

7. CONCLUSÃO

- 1- O captopril em concentrações iguais ou maiores que 1 mM reduz o pH da solução tampão Tris- CaCl_2 (Tris-HCl 50 mM);
- 2- quando avaliado pela técnica de zimografia, o captopril inibe a MMP-2 presente no plasma humano somente diante das concentrações de 4 e 8 mM, enquanto concentrações iguais ou maiores de 1 mM da droga foram suficientes para inibir a rhMMP-2;
- 3- quando avaliado por ensaios fluorimétricos o captopril inibe a rhMMP-2 em concentrações iguais ou maiores que 2 mM. Por outro lado, quando a rhMMP-2 foi previamente ativada com APMA, o captopril foi capaz de inibir a atividade gelatinolítica da enzima em concentrações iguais ou maiores que 0,5 mM.

Portanto nossos resultados demonstram a relevância do pH como um aspecto a ser considerado em estudos que avaliam a atividade de MMPs *in vitro*, bem como a utilização de enzimas purificadas. Além disso, sugere-se que a inibição da MMP-2 pelo captopril não seja um efeito relevante *in vivo*.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

ANDÚJAR-SÁNCHEZ, M.; CÁMARA-ARTIGAS, A.; JARA-PÉREZ, V. A calorimetric study of the binding of lisinopril, enalaprilat and captopril to angiotensin-converting enzyme. **Biophys Chem**, v.111, n.2, p.183-189, 2004.

BODE, W.; MASKOS, K. Structural basis of the matrix metalloproteinases and their physiological inhibitors, the tissue inhibitors of metalloproteinases. **Biol Chem**, v.384, n.6, p.863-872, 2003.

BORKAKOTI, N. Structural studies of matrix metalloproteinases. **J Mol Med**, v.78, n.5, p.261-68, 2000.

BROWER, G. L.; LEVICK, S. P.; JANICKI, J. S. Inhibition of matrix metalloproteinase activity by ACE inhibitors prevents left ventricular remodeling in a rat model of heart failure. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, v.292, n.6, H3057-H3064, 2007.

CASTRO, M. M. et al. Metalloproteinase inhibition ameliorates hypertension and prevents vascular dysfunction and remodeling in renovascular hypertensive rats. **Atherosclerosis**, v.198, n.2, p.320-31, 2008.

CASTRO, M. M. et al. Antioxidant treatment reduces matrix metalloproteinase-2-induced vascular changes in renovascular hypertension. **Free Radic Biol Med**, v.46, n.9, p.1298-1307, 2009.

CASTRO, M. M. et al. Matrix metalloproteinase inhibitor properties of tetracyclines: therapeutic potencial in cardiovascular diseases. **Pharmacol Res**, v.64, n.6, p.551-560, 2011.

CAUWE, B.; OPDENAKKER, G. Intracellular substrate cleavage: a novel dimension in the biochemistry, biology and pathology of matrix metalloproteinases. **Crit Rev Biochem Mol Biol**, v.45, n.5, p.351-423, 2010.

CHOW, A. K.; CENA, J.; SCHULZ, R. Acute actions and novel targets of matrix metalloproteinases in the heart and vasculature. **Br J Pharmacol**, v.152, n.2, p.189-205, 2007.

CORRADI, H. R. et al. Crystal structure of the N domain of human somatic angiotensin I-converting enzyme provides a structural basis for domain-specific inhibitor design. **J Mol Biol**, v.357, n.3, p.964-974, 2006.

CUSHMAN, D. W. et al. Design of potent competitive inhibitors of angiotensin-converting enzyme. Carboxyalkanoyl and mercaptoalkanoyl amino acids. **Biochemistry**, v.16, n.25, p.5484-5491, 1977.

DAVIES, D. M.; LAWThER, J. M. Kinetics and mechanism of electron transfer from dithionite to microsomal cytochrome b5 and to forms of the protein associated with charged and neutral vesicles. **Biochem J**, v.258, n.2, p.375-380, 1989.

DAVIS, G. E.; MARTIN, B. M. A latent Mr 94,000 gelatin degrading metalloprotease induced during differentiation of HL-60 promyelocytic leukemia cells: a member of the collagenase family of enzymes. **Cancer Res**, v.50, n.4, p.1113-1120, 1990.

DEVEL, L. et al. Third generation of matrix metalloproteinase inhibitors: gain in selectivity by targeting the depth of the S₁' cavity. **Biochimie**, v.92, n.11, p.1501-1508, 2010.

DE SOUZA, A. P.; GERLACH, R. F.; LINE, S. R. Inhibition of human gingival gelatinases (MMP-2 and MMP-9) by metal salts. **Dent Mater**, v.16, n.2, p.103-108, 2000.

DORER, F.E. et al. Hydrolysis of bradykinin by angiotensin-converting enzyme. **Circ Res**, v.34, n.6, p.824-827, 1974.

DORMÁN, G. et al. Matrix Metalloproteinase Inhibitors: a critical appraisal of design principles and proposed therapeutic utility. **Drugs** v.70, n.8, p.949-964, 2010.

DURRANT, J. D.; OLIVEIRA, C. A. F.; McCAMMON, J. A. Pyrone-based inhibitors of metalloproteinase type 2 and 3 may work as conformation-selective inhibitors. **Chem Biol Drug Des**, v.78, n.2, p.191-198, 2011.

EFSEN, E. et al. Ramiprilate inhibits functional matrix metalloproteinase activity in Crohn's disease fistulas. **Basic Clin Pharmacol Toxicol**, v.109, n.3, p.208-216, 2011.

FERNANDEZ-PATRON, C.; RADOMSKI, M. W.; DAVIDGE, S. T. Vascular matrix metalloproteinase-2 cleaves big endothelin-1 yielding a novel vasoconstrictor. **Circ Res**, v.85, n.10, p.906-911, 1999.

FERNANDEZ-PATRON, C. et al. Vascular matrix metalloproteinase-2-dependent cleavage of calcitonin gene-related peptide promotes vasoconstriction. **Circ Res**, v.87, n.8, p.670-676, 2000.

FERREIRA, S.H.; ROCHA E SILVA, M. Potentiation of bradykinin and eledoisin by BPF (bradykinin potentiating factor) from Bothrops jararaca venom. **Experientia**, v.21, n.6, p.347-349, 1965.

GERLACH, R. F. et al. Effect of lead, cadmium and zinc on the activity of enamel matrix proteinases in vitro. **Eur J Oral Sci**, v.108, n.4, p.327-334, 2000.

GERLACH, R.F.; LINE, S.R. Mechanisms of cell activation by metal ions: influence of pH. **J. Biomed Mater Res**, v.51, n.3, p.540, 2000.

GOLUB, L. M. Tetracyclines inhibit connective tissue breakdown by multiple non-antimicrobial mechanisms. **Adv Dent Res**, v.12, n.2, p.12-26, 1998.

GONÇALVES, A. N. et al. Expression of soluble and functional full length human MMP-2 in the Escherichia coli cytoplasm. **J Biotechnol**, v.157, n.20, p.20-24, 2012.

GOODMAN, L. S.; HARDMAN, J. G.; LIMBIRD, L. E. **Goodman & Gilman: as bases farmacológicas da terapêutica**. 11. ed. Rio de Janeiro: Mc Graw Hill, 2006. 1647p.

GUNJA-SMITH, Z.; WOESSNER, J. F. Jr. Activation of cartilage stromelysin-1 at acid pH and its relation to enzyme pH optimum and osteoarthritis. **Agents Actions**, v.40, n.3-4, p.228-231, 1993.

HADLER-OLSEN, E. et al. Regulation of matrix metalloproteinase activity in health and disease. **FEBS J**, v.278, n.1, p.28- 45, 2011.

HEEG, J. E. et al. Reduction of proteinuria by ACE inhibition. **Kidney Int**, v.32, n.1, p.78-83, 1987.

HIDALGO, M.; ECKHARDT, S. G. Development of matrix metalloproteinase inhibitors in cancer therapy. **J Natl Cancer Inst**, v.93, n.3, p.178-193, 2001.

KANDASAMY, A. D. et al. Matrix metalloproteinase-2 and myocardial oxidative stress injury: beyond the matrix. **Cardiovasc Res**, v.85, n.3, p.413-423, 2010.

KIM, H. M. et al. Crystal structure of Drosophila angiotensin I-converting enzyme bound to captopril and lisinopril. **FEBS Lett**, v.538, n.1-3, p.65-70, 2003.

KUPAI, K. et al. Matrix metalloproteinase activity assays: importance of zymography. **J Pharmacol Toxicol Methods**, v.61, n.2, p.205-209, 2010.

KWAN, J.A. et al. Matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) is present in the nucleus of cardiac myocytes and is capable of cleaving poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) in vitro. **FASEB J**, v.18, n.6, p.690-692, 2004.

MARTINEZ, A. et al. Matrix metalloproteinase-2 cleavage of adrenomedullin produces a vasoconstrictor out of a vasodilator. **Biochem J**, v.383, Pt. 3, p.413-418, 2004.

MEDVEDOVICI, A. et al. Assay of free captopril in human plasma as monobromobimane derivative, using RPLC/ (+)ESI/MS/MS: validation aspects and bioequivalence evaluation. **Biomed Chromatogr**, v.23, p.1092-1100, 2009.

MURPHY, G.; NAGASE, H. Progress in matrix metalloproteinase research. **Mol Aspects Med**, v.29, n.5, p.290-308, 2008.

NAGASE, H.; VISSE, R.; MURPHY, G. Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs. **Cardiovasc Res**, v.69, n.3, p.562-573, 2006.

NAGASE, H.; WOESSNER JR, F. Matrix Metalloproteinases. **J Biol Chem**, v.274, n.31, p.21491-21494, 1999.

NATESH, R. et al. Crystal structure of the human angiotensin-converting enzyme-lisinopril complex. **Nature**, v.421, n.6922, p.551-554, 2003.

NATESH, R. et al. Structural details on the binding of antihypertensive drugs captopril and enalaprilat to human testicular angiotensin I-converting enzyme. **Biochemistry**, v.43, n.27, p.8718-8724, 2004.

NUTI, E. et al. Synthesis and biological evaluation in U87MG glioma cells of (ethynylthiophene)sulfonamido-based hydroxamates as matrix metalloproteinase inhibitors. **Eur J Med Chem**, v.46, n.7, p.2617-2629, 2011.

OKADA, Y. et al. Localization of matrix metalloproteinase 9 (92-kilodalton gelatinase/type IV collagenase=gelatinase B) in osteoclasts: implications for bone resorption. **Lab Invest**, v.72, n.3, p.311-322, 1995.

OKADA, M. et al. Captopril attenuates matrix metalloproteinase-2 and -9 in monocrotaline-induced right ventricular hypertrophy in rats. **J Pharmacol Sci** v.108, n.4, p.487-494, 2008.

PAGE-McCaw, A.; EWALD, A. J.; WERB, Z. Matrix metalloproteinases and the regulation of tissue remodeling. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v.8, n.3, p.221-233, 2007.

PAPAZAFIROPOULOU, A.; TENTOLOURIS, N. Matrix metalloproteinases and cardiovascular diseases. **Hippokratia**, v.13, n.2, p.76-82, 2009.

PEREIRA, A. V. et al. Determinação da constante de dissociação (Ka) do captopril e da nimesulida – experimentos de química analítica para o curso de farmácia. **Quím Nova**, v.34, n.9, p.1656-1660, 2011.

REINHARDT, D. et al. Cardiac remodelling in end stage heart failure: upregulation of matrix metalloproteinase (MMP) irrespective of the underlying disease, and evidence for a direct inhibitory effect of ACE inhibitors on MMP. **Heart**, v.88, n.5, p.525-530, 2002.

REMKO, M. Acidity, lipophilicity, solubility, absorption, and polar surface area of some ACE inhibitors. **Chem Pap**, v.61, n.2, p.133-141, 2007.

REZENDE, K. R. et al. Determination of captopril in human plasma, using solid phase extraction and high-performance liquid chromatography, coupled to mass spectrometry: application to bioequivalence study. **J Chromatogr B**, v.850, p.59-67, 2007.

RIBEIRO, J. M.; FLORÊNCIO, L. P. Bloqueio farmacológico do sistema renina-angiotensina-aldosterona: inibição da enzima de conversão e antagonismo do receptor AT1. **Rev Bras Hipertens**, v.7, n.3, p.293-302, 2000.

RIZZI, E. et al. Matrix metalloproteinase inhibition improves cardiac dysfunction and remodeling in 2-kidney, 1-clip hypertension. **J Card Fail**, v.16, n.7, p.599-608, 2010.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning: a laboratory manual**. 2 ed. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

SARIAHMETOGLU, M. et al. Regulation of matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) activity by phosphorylation. **FASEB J**, v.21, n.10, p.2486-2495, 2007.

SAWICKI, G. et al. Degradation of myosin light chain in isolated rat hearts subjected to ischemia-reperfusion injury: a new intracellular target for matrix metalloproteinase-2. **Circulation**, v.112, n.4, p.544–552, 2005.

SCHULZ, R. Intracellular targets of matrix metalloproteinase in cardiac disease: rationale and therapeutic approaches. **Annu Rev Pharmacol Toxicol**, v.47, p.211-242, 2007.

SKRBIC, R.; IGIC, R. Seven decades of angiotensin (1939-2009). **Peptides**, v.30, n.10, p.1945-1950, 2009.

SOARES, A. K. A. et al. Comparative biodisponibility of a single dose captopril formulations. **RBPS**, v.19, n.1, p.5-10, 2006.

SORBI, D. et al. Captopril inhibits the 72 kDa and 92 kDa matrix metalloproteinases. **Kidney Int**, v.44, n.6, p.1266-1272, 1993.

SPINALE, F.G. et al. Angiotensin-converting enzyme inhibition and angiotensin II subtype-1 receptor blockade during the progression of left ventricular dysfunction: differential effects on myocyte contractile processes. **J Pharmacol Exp Ther**, v.283, n.3, p.1082-1094, 1997.

SPINALE, F. G. Matrix metalloproteinases: regulation and dysregulation in the failing heart. **Circ Res**, v.90, n.5, p.520-530, 2002.

SPYROULIAS, G. A. et al. Structural features of Angiotensin-I Converting Enzyme catalytic sites: conformational studies in solution, homology models and comparison with other zinc metallopeptidases. **Curr Top Med Chem**, v.4, n.4, p.403-429, 2004.

STURROCK, E.D. et al. Structure of angiotensin I-converting enzyme. **Cell Mol Life Sci**, v. 61, n.21, p.2677-2686, 2004.

TABRIZCHI, R. Dual ACE and neutral endopeptidase inhibitors: novel therapy for patients with cardiovascular disorders. **Drugs**, v.63, n.20, p. 2185-2202, 2003.

TALLANT, C.; MARRERO, A.; GOMIS-RÜTH, F. X. Matrix metalloproteinases: fold and function of their catalytic domains. **Biochim Biophys Acta**, v.1803, n.1, p.20-28, 2010.

TIMMINS, P.; JACKSON, I. M.; WANG, Y. J. Factors affecting captopril stability in aqueous solution. **Int. J Pharm**, v.11, p.329-336, 1982.

TJÄDERHANE, L. et al. The Activation and Function of Host Matrix Metalloproteinases in Dentin Matrix Breakdown in Caries Lesions. **J Dent Res**, v.77, n.8, p.1622-1629, 1998.

VERMA, R. P.; HANSCH, C. Matrix metalloproteinases (MMPs): chemical-biological functions and (Q)SARs. **Bioorg Med Chem**, v.15, n.6, p.2223-2268, 2007.

VIAPPIANI, S. et al. Activation and modulation of 72 kDa matrix metalloproteinase-2 by peroxynitrite and glutathione. **Biochem Pharmacol**, v.77, n.5, p.826-834, 2009.

VISSE, R.; NAGASE, H. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function and biochemistry. **Circ Res**, v.92, n.8, p.827-839, 2003.

VOLKIN, D. B.; KLIBANOV, A. M. Minimizing protein inactivation. In: CREIGHTON, T.E. (Ed.) **Protein function: a practical approach**. 2nd ed. Oxford: IRL Press; 1997. p4-5.

WANG, W. et al. Intracellular action of matrix metalloproteinase-2 accounts for acute myocardial ischemia and reperfusion injury. **Circulation**, v.106, n.12, p.1543–1549, 2002.

YAMAMOTO, D.; TAKAI, S. Pharmacological implications of MMP-9 inhibition by ACE inhibitors. **Curr Med Chem**, v.16, n.11, p.1349-1354, 2009.

YAMAMOTO, D.; TAKAI, S.; MIYAZAKI, M. Prediction of interaction mode between a typical ACE inhibitor and MMP-9 active site. **Biochem Biophys Res Commun**, v.354, n.4, p.981-984, 2007.

YAMAMOTO, D. et al. Molecular mechanism of imidapril for cardiovascular protection via inhibition of MMP-9. **J Mol Cell Cardiol**, v.43, n.6, p.670-676, 2007.

YAMAMOTO, D.; TAKAI, S.; MIYAZAKI, M. Inhibitory profiles of captopril on matrix metalloproteinase-9 activity. **Eur J Pharmacol**, v.588, n.2-3, p.277-279, 2008.

YAMAMOTO, D. et al. Captopril directly inhibits matrix metalloproteinase-2 activity in continuous ambulatory peritoneal dialysis therapy. **Clin Chim Acta**, v.411, n.9-10, p.762-764, 2010.

YOUNG, T.N.; PIZZO, S.V.; STACK, M.S. A plasma membrane-associated component of ovarian adenocarcinoma cells enhances the catalytic efficiency of matrix metalloproteinase-2. **J Biol Chem**, v.270, n.3, p.999-1002, 1995.

ZHOU, H.Z . et al. Transgenic MMP-2 expression induces latent cardiac mitochondrial dysfunction. **Biochem Biophys Res Commun**, v.358, n.1, p.189-195, 2007.

APÊNDICES

APÊNDICES

APÊNDICE A

CÁLCULO DAS CONCENTRAÇÕES DAS FORMAS PROTONADAS E DESPROTONADAS DE TRIS NAS SOLUÇÕES TAMPÃO DE Tris- CaCl_2 (Tris-HCl 50 mM E 200 mM) DIANTE DA SOLUBILIZAÇÃO DE CAPTOPRIL (8 mM)

A solução tampão Tris-HCl compreende a base fraca Tris e seu ácido conjugado e HTris^+ formado a partir da adição da HCl à solução. Para melhor compreensão dos efeitos sobre o pH das soluções tampão observados experimentalmente após a solubilização de 8 mM de captopril, consideram-se inicialmente os seguintes equilíbrios para o Tris- CaCl_2 (Tris-HCl 50mM):

Mols no início:	$50 \cdot 10^{-3}$	0	0
Variação:	$(50 \cdot 10^{-3}) - x$	x	x

onde:

- $(\text{HOCH}_2)_3\text{CNH}_2$ = forma desprotonada ou neutra do Tris;
- $\text{H}(\text{HOCH}_2)_3\text{CNH}_2^+$ = forma protonada do Tris;
- x = fator de equilíbrio.

Considerando que $\text{p}K_a$ do Tris=8,1(25°C)(DAVIES; LAWThER, 1989) e que:

$$\text{p}K_a = -\log K_a \quad (\text{III})$$

encontramos K_a do Tris= $7,94 \cdot 10^{-9}$.

Sabendo ainda que K_a é dado pela equação:

$$K_a = [\text{H}^+][\text{A}^-] / [\text{HA}] \quad (\text{IV})$$

substituindo os valores na equação, temos:

$$7,94 \cdot 10^{-9} = x^2 / (50 \times 10^{-3}) - x$$

$$x^2 = 3,97 \cdot 10^{-10}$$

$$x = 1,99 \cdot 10^{-5} \text{ M}$$

Assim, substituindo “x” no equilíbrio II, encontramos que:

- $[\text{H}(\text{HOCH}_2)_3\text{CNH}_2^+] \approx 50 \times 10^{-3} \text{ M}$
- $[(\text{HOCH}_2)_3\text{CNH}_2] = 1,99 \cdot 10^{-5} \text{ M}$.

Tendo em vista que o pH inicial da solução tampão foi ajustado para 7,4 e que:

$$\text{pH} + \text{pOH} = 14 \quad (\text{V})$$

$$\text{pOH} = -\log[\text{OH}^-] \quad (\text{VI})$$

calculamos $\text{pOH} = 6,6$, que corresponde à $[\text{OH}^-] = 2,51 \cdot 10^{-7} \text{ M}$ de acordo com a equação VI.

Logo, continuando a considerar apenas o Tris- CaCl_2 (Tris-HCl 50 mM) em solução, temos ainda o seguinte equilíbrio:

onde “y” é o fator de equilíbrio desta equação.

Já que neste caso o equilíbrio envolve a $[\text{OH}^-]$, passamos a considerar K_b , dada pelas equações:

$$\text{p}K_b = -\log K_b \quad (\text{VIII})$$

$$K_b = [\text{BH}^+][\text{OH}^-] / [\text{B}] \quad (\text{IX})$$

Partindo ainda da relação:

$$\text{p}K_a + \text{p}K_b = 14 \quad (\text{X})$$

temos que $\text{p}K_b = 5,9$ (pois o $\text{p}K_a$ do Tris=8,1), de modo que de acordo com a equação IX, $K_b = 1,26 \cdot 10^{-6}$. Utilizando então a equação VIII, encontramos que:

$$\begin{aligned}
K_b &= [\text{BH}^+][\text{OH}^-] / [\text{B}] \\
1,26 \cdot 10^{-6} &= (50 \cdot 10^{-3} + y) \cdot (2,51 \cdot 10^{-7}) / (1,99 \cdot 10^{-5}) - y \\
2,50 \cdot 10^{-11} - 1,26 \cdot 10^{-6} y &= 1,25 \cdot 10^{-8} + 2,51 \times 10^{-7} y \\
-1,51 \cdot 10^{-6} y &= 1,24 \cdot 10^{-8} \\
y &= -8,2 \cdot 10^{-3}
\end{aligned}$$

Substituindo “y” no equilíbrio VII encontramos que:

- $[(\text{HOCH}_2)_3\text{CNH}_2] = 8,2 \text{ mM}$;
- $[\text{H}(\text{HOCH}_2)_3\text{CNH}_2^+] = 58 \text{ mM}$,

Diante da solubilização de 8 mM de captopril, por sua vez, observa-se uma redução significativa do pH da solução tampão Tris- CaCl_2 (Tris-HCl 50mM). Lembrando que o captopril apresenta $\text{p}K_{a1}=3,7$ referente ao grupo carboxílico, sabe-se que este radical se encontra completamente ionizado em $\text{pH}=7,4$, ao passo que o $\text{p}K_{a2}=9,8$ referente ao grupo sulfidril não sofre ionização. Logo, temos o seguinte equilíbrio do captopril em solução:

onde $\text{C}_8\text{H}_{14}\text{NOS}(\text{COOH})$ corresponde à fórmula molecular do captopril.

Assim, passamos então a considerar a protonação do Tris da solução tampão em função do próton cedido pela ionização do captopril, de modo que:

Encontramos então que:

- $[(\text{HOCH}_2)_3\text{CNH}_2] = 0,2 \text{ mM}$
- $[\text{H}(\text{HOCH}_2)_3\text{CNH}_2^+] = 66 \text{ mM}$.

Portanto sabemos que a solubilização do captopril em Tris- CaCl_2 (Tris-HCl 50mM) consumiu a forma neutra do Tris quase por completo, restando somente 0,2 mM, levando à uma condição crítica no qual qualquer adição de ácido pode promover uma intensa redução do pH.

Neste caso quando aplicada a equação de Henderson-Hasselbalch, temos:

$$\begin{aligned} \text{pH} &= \text{pK}_a + \log ([\text{A}^-] / [\text{AH}]) & (\text{XIII}) \\ \text{pH} &= 8,1 + \log ([\text{HOCH}_2)_3\text{CNH}_2] / [\text{H}(\text{HOCH}_2)_3\text{CNH}_2^+]) \\ \text{pH} &= 8,1 + \log (0,2 \cdot 10^{-3} / 66 \cdot 10^{-3}) \\ \text{pH} &= 5,58 \end{aligned}$$

Dessa forma o pH teórico da solução tampão Tris- CaCl_2 (Tris-HCl 50mM) após a solubilização de 8 mM de captopril é de 5,58. Todavia o valor observado experimentalmente foi de $\text{pH} = 3,87 \pm 0,22$, de modo que esta diferença pode ser explicada devido as condições experimentais em questão: as constantes pK_a utilizadas nos cálculos se referem à condições controladas de temperatura e pressão, ao passo que os experimentos aqui relatados foram realizados sob condições ambientais variáveis. Além disso, a concentração de 0,2 mM restante da forma neutra do Tris é bastante pequena e pode ter sido facilmente consumida perante a adição de pequenos excessos de captopril em função de artefatos metodológicos, como por exemplo, a calibração dos equipamentos utilizados.

Por outro lado, considerando o Tris- CaCl_2 (Tris-HCl 200mM), temos:

onde “z” é o fator de equilíbrio. Novamente, considerando que o K_a do Tris = $7,94 \cdot 10^{-9}$ e lembrando a fórmula de K_a já descrita pela equação IV, temos que:

$$\begin{aligned} K_a &= [\text{H}^+][\text{A}^-] / [\text{HA}] \\ 7,94 \cdot 10^{-9} &= z \cdot z / 200 \cdot 10^{-3} - z \\ z &= \pm 3,98 \cdot 10^{-5} \end{aligned}$$

Assim, substituindo “z” no equilíbrio, encontramos que:

- $[\text{H}(\text{HOCH}_2)_3\text{CNH}_2^+] \approx 200 \cdot 10^{-3} \text{ M}$;
- $[(\text{HOCH}_2)_3\text{CNH}_2] = 3,98 \cdot 10^{-5} \text{ M}$.

Considerando ainda somente o Tris- CaCl_2 (Tris-HCl 200 mM) em solução, temos novamente o equilíbrio descrito em VII, com $[\text{OH}^-] = 2,51 \cdot 10^{-7}$ M (de acordo com as equações V e VI). Nesta situação então, podemos descrever:

onde “w” é o fator de equilíbrio desta equação. Utilizando então a equação IX de K_b , encontramos que:

$$\begin{aligned} K_b &= [\text{BH}^+][\text{OH}^-] / [\text{B}] \\ 1,26 \cdot 10^{-6} &= (200 \cdot 10^{-3} + w) \cdot (2,51 \cdot 10^{-7}) / 3,98 \cdot 10^{-5} - w \\ 4,58 \cdot 10^{-11} - 1,26 \cdot 10^{-6}w &= 5,02 \cdot 10^{-8} + 2,51 \cdot 10^{-7}w \\ -1,14 \cdot 10^{-7}w &= 5,01 \cdot 10^{-8} \\ w &= -3,57 \cdot 10^{-2} \end{aligned}$$

Substituindo “w” no equilíbrio encontramos que:

- $[(\text{HOCH}_2)_3\text{CNH}_2] = 35$ mM;
- $[\text{H}(\text{HOCH}_2)_3\text{CNH}_2^+] = 164$ mM.

que são portanto as concentrações das espécies em pH=7,4.

No entanto ao solubilizar 8 mM de captopril o pH da solução tampão Tris- CaCl_2 (Tris-HCl 200mM) é preciso levar em conta a ionização do grupo carboxílico da droga, como já descrito pelo equilíbrio XI. Logo, passamos a considerar a protonação do Tris da solução tampão em função do próton cedido pela ionização do captopril, de modo que:

Portanto, $[(\text{HOCH}_2)_3\text{CNH}_2] = 27$ mM e $[\text{H}(\text{HOCH}_2)_3\text{CNH}_2^+] = 172$ mM. Deste modo a concentração de Tris ao final do equilíbrio permanece alta o suficiente para manter estável o pH do tampão. Utilizando a equação de Henderson-Hasselbalch (XIII) neste caso, temos:

$$\begin{aligned} \text{pH} &= \text{pK}_a + \log ([\text{A}^-] / [\text{AH}]) \\ \text{pH} &= 8,1 + \log ([(\text{HOCH}_2)_3\text{CNH}_2] / [\text{H}(\text{HOCH}_2)_3\text{CNH}_2^+]) \\ \text{pH} &= 8,1 + \log (27 \cdot 10^{-3} / 172 \cdot 10^{-3}) \\ \text{pH} &= 7,29 \end{aligned}$$

Assim o pH teórico da solução tampão Tris- CaCl_2 (Tris-HCl 200mM) após a solubilização de 8 mM de captopril calculado como 7,29 concorda com o valor do pH observado experimentalmente, que foi de $7,18 \pm 0,12$.

APÊNDICE B

CÁLCULO DE K_i PARA O COMPLEXO MMP-2-CAPTOPRIL

Descreve-se a baixo o cálculo do parâmetro K_i para o complexo MMP-2-captopril através da equação de Cheng-Pursoff:

$$K_i = IC_{50} / (1 + [S]/K_M)$$

$$K_i = 3,46.10^{-3} / 1 + (100.10^{-6} / 89,3.10^{-9})$$

$$K_i = 3,46.10^{-3} / 1120,82$$

$$K_i = 3,08.10^{-6} \text{ M}$$

onde K_M teve seu valor médio considerado igual a 89,3 nM (YOUNG; PIZZO; STACK, 1995) e nossa concentração de substrato $[S] = 100.10^{-6} \text{ M}$.

Logo, o valor estimado de $K_i = 3,08 \text{ } \mu\text{M}$.