

INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA GOIANO
CAMPUS MORRINHOS
LICENCIATURA EM QUÍMICA

RAYLANDER RODRIGUES DA SILVA

ESTUDO DA ESPECIFICIDADE DAS MMPS E SUAS INTERAÇÕES
COM POTENCIAIS INIBIDORES POR MEIO DE MODELAGEM
MOLECULAR

MORRINHOS-GO

2023

RAYLANDER RODRIGUES DA SILVA

**ESTUDO DA ESPECIFICIDADE DAS MMPS E SUAS INTERAÇÕES COM
POTENCIAIS INIBIDORES POR MEIO DE MODELAGEM MOLECULAR**

Relatório de curso submetido à disciplina: TC II –
Desenvolvimento de Projetos do Curso de
Licenciatura em Química do Instituto Federal
Goiano – Campus Morrinhos, como requisito para
aprovação na disciplina e requisito parcial para a
obtenção do título de licenciado.

Orientadora: Dra. Bruna Luana Marcial Oliveira

MORRINHOS-GO

2023

Sistema desenvolvido pelo ICMC/USP
Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema Integrado de Bibliotecas - Instituto Federal Goiano

RR266e Rodrigues , Raylander
Estudo da especificidade das Mmps e suas
interações com potenciais inibidores por meio de
modelagem molecular / Raylander Rodrigues ;
orientadora Bruna Luana Marcial . -- Morrinhos, 2023.
66 p.

TCC (Graduação em Licenciatura em Química) --
Instituto Federal Goiano, Campus Morrinhos, 2023.

1. Docking Molecular . 2. MMPs. 3. Inibidores de
MMPs. I. Marcial , Bruna Luana, orient. II. Título.



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SECRETARIA DE EDUCAÇÃO PROFISSIONAL E TECNOLÓGICA
INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA GOIANO

TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO PARA DISPONIBILIZAR PRODUÇÕES TÉCNICO-CIENTÍFICAS NO REPOSITÓRIO INSTITUCIONAL DO IF GOIANO

Com base no disposto na Lei Federal nº 9.610/98, AUTORIZO o Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano, a disponibilizar gratuitamente o documento no Repositório Institucional do IF Goiano (RIIF Goiano), sem ressarcimento de direitos autorais, conforme permissão assinada abaixo, em formato digital para fins de leitura, download e impressão, a título de divulgação da produção técnico-científica no IF Goiano.

Identificação da Produção Técnico-Científica (assinale com X)

- Tese
- Dissertação
- Monografia – Especialização
- Artigo - Especialização
- TCC - Graduação
- Artigo Científico
- Capítulo de Livro
- Livro
- Trabalho Apresentado em Evento
- Produção técnica. Qual: _____

Nome Completo do Autor: Raylander Rodrigues da Silva

Matrícula: 2018104221550200

Título do Trabalho: Estudo da especificidade das MMPS e suas interações com potenciais inibidores por meio de modelagem molecular

Restrições de Acesso ao Documento [Preenchimento obrigatório]

Documento confidencial: Não Sim, justifique:

Informe a data que poderá ser disponibilizado no RIIF Goiano: 28/04/2023.

O documento está sujeito a registro de patente? Sim Não

O documento pode vir a ser publicado como livro? Sim Não

DECLARAÇÃO DE DISTRIBUIÇÃO NÃO-EXCLUSIVA

O/A referido/a autor/a declara que:

1. O documento é seu trabalho original, detém os direitos autorais da produção técnico-científica e não infringe os direitos de qualquer outra pessoa ou entidade;
2. Obteve autorização de quaisquer materiais inclusos no documento do qual não detém os direitos de autor/a, para conceder ao Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano os direitos requeridos e que este material cujos direitos autorais são de terceiros, estão claramente identificados e reconhecidos no texto ou conteúdo do documento entregue;
3. Cumpriu quaisquer obrigações exigidas por contrato ou acordo, caso o documento entregue seja baseado em trabalho financiado ou apoiado por outra instituição que não o Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano.

Morrinhos, 05 de abril de 2023.

Raylander Rodrigues da Silva

Assinado eletronicamente pelo o Autor e/ou Detentor dos Direitos Autorais

Ciente e de acordo:

Bruna Luana Marcial Oliveira

Assinatura eletrônica do(a) orientador(a)

Documento assinado eletronicamente por:

- Raylander Rodrigues da Silva, 2018104221550200 - Discente, em 05/04/2023 18:07:06.
- Bruna Luana Marcial Oliveira, PROFESSOR ENS BASICO TECN TECNOLOGICO, em 05/04/2023 10:40:52.

Este documento foi emitido pelo SUAP em 05/04/2023. Para comprovar sua autenticidade, faça a leitura do QRCode ao lado ou acesse <https://suap.ifgoiano.edu.br/autenticar-documento/> e forneça os dados abaixo:

Código Verificador: 484386
Código de Autenticação: 555ed1f436



INSTITUTO FEDERAL GOIANO
Campus Morrinhos
Rodovia BR-153, Km 633, Zona Rural, None, None, MORRINHOS / GO, CEP 75650-000
(64) 3413-7900



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SECRETARIA DE EDUCAÇÃO PROFISSIONAL E TECNOLÓGICA
INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA GOIANO

Ata nº 13/2023 - CCEG-MO/CEG-MO/DE-MO/CMPMHOS/IFGOIANO

ATA DE DEFESA DE TRABALHO DE CURSO

Aos vinte e dois dias do mês de março de 2023, às 16 horas, reuniu-se a banca examinadora composta pelos docentes: Bruna Luana Marcial Oliveira (orientadora), Gilmara Aparecida Correa Fortes (membra) e Vytor Pinheiro Oliveira (membro), para examinar o Trabalho de Curso intitulado “Estudo da especificidade das MMPS e suas interações com potenciais inibidores por meio de modelagem molecular” do discente Raylander Rodrigues da Silva, Matrícula nº 2018104221550200, do Curso de Licenciatura em Química do IF Goiano – Campus Morrinhos. A palavra foi concedida ao discente para a apresentação oral do TC, houve arguição do candidato pelos membros da banca examinadora. Após tal etapa, a banca examinadora decidiu pela APROVAÇÃO do discente, com nota final igual a 9,4. Ao final da sessão pública de defesa foi lavrada a presente ata que segue assinada pelos membros da Banca Examinadora.

(Assinado Eletronicamente)

Profa. Dra. Bruna Luana Marcial Oliveira

Orientadora

(Assinado Eletronicamente)

Profa. Dra. Gilmara Aparecida Correa Fortes

Membra

(Assinado Eletronicamente)

Prof. Dr. Vytor Pinheiro Oliveira

Membro

Documento assinado eletronicamente por:

- **Vytor Pinheiro Oliveira, Vytor Pinheiro Oliveira - Professor Avaliador de Banca - Instituto Federal Goiano - Campus Morrinhos (10651417000330)**, em 06/04/2023 10:15:20.
- **Gilmara Aparecida Correa Fortes, PROFESSOR ENS BASICO TECN TECNOLOGICO**, em 24/03/2023 17:31:54.
- **Bruna Luana Marcial Oliveira, PROFESSOR ENS BASICO TECN TECNOLOGICO**, em 23/03/2023 20:59:07.

Este documento foi emitido pelo SUAP em 23/03/2023. Para comprovar sua autenticidade, faça a leitura do QRCode ao lado ou acesse <https://suap.ifgoiano.edu.br/autenticar-documento/> e forneça os dados abaixo:

Código Verificador: 480265

Código de Autenticação: 0cc44b3498



INSTITUTO FEDERAL GOIANO
Campus Morrinhos
Rodovia BR-153, Km 633, Zona Rural, None, None, MORRINHOS / GO, CEP 75650-000
(64) 3413-7900

AGRADECIMENTO

Primeiramente agradeço a Deus por me guiar nos momentos de dificuldades em que questioneei minha própria existência. Agradeço aos meus pais Marlene e José, por terem me acompanhado nas minhas intensas experiências e pelo amparo nos inúmeros momentos de angústia. Agradeço a minha orientadora Prof. Dra. Bruna Luana Marcial Oliveira por toda paciência, dedicação e sabedoria ao me acompanhar na execução deste trabalho e formação acadêmica. Meus mais sinceros agradecimentos, muito obrigado!

“Viver é arriscar tudo. Caso contrário você é apenas um pedaço inerte de moléculas montadas aleatoriamente à deriva onde o universo te sopra.”

Rick Sanchez

RESUMO

As Metaloproteinases da Matriz (MMPs) são uma família de enzimas, cuja principal função é degradar a matriz extracelular (MEC), desempenhando papel fundamental em diversos processos fisiológicos e patológicos. Nas últimas décadas, diferentes inibidores sintéticos e naturais das MMPs (IMMPs) vem sendo propostos e testados no controle de diversas doenças envolvendo processos inflamatórios e progressão celular. Neste contexto, o objetivo do presente trabalho foi investigar e descrever a estrutura e propriedade das diferentes classes de MMPs a partir de uma pesquisa na literatura, seguida de um estudo da interação das MMPs com inibidores derivados da tetraciclina aplicando metodologia de docking molecular. A pesquisa na literatura foi qualitativa e exploratória utilizando como fonte as bases de publicações como Web of Science, Scopus, Periódicos CAPES, Scielo e livros publicados na área, buscando pelas palavras chaves: “Matrix Metalloproteinase” e “inhibitors MMPs”. As MMPs constituem uma família de enzima dependentes de zinco e cálcio, sendo que são conhecidas atualmente 26 MMPs classificadas de acordo com o tipo de substrato natural e propriedades estruturais. Todas as classes de MMPs possuem domínios estruturais comuns, estando presente em todas elas um domínio catalítico contendo um íon de Zn(II) e um canal de especificidade conhecido com S1' pocket. Para explorar a especificidade das MMPs os ligantes CMT-3, CMT-7, CMT-8 e a Doxiciclina (Dox) foram docados no sítio ativo das MMPs representantes de cada família: colagenases (MMP-1, MMP-13), gelatinases (MMP-2 e MMP-9), estromelisina (MMP-10), matrilisina (MMP-7) e MMP diversas (MMP-13 e MMP-20, obtidas do PDB, usando o programa Autodock. As melhores conformações obtidas baseadas na energia livre de ligação do Autodock (ΔG^{LDBE}) possibilitaram o ranqueamento dos ligantes quanto a afinidade pelo sítio ativo. Cada família de metaloenzimas, devido as suas características estruturais, apresentou diferente afinidade pelos ligantes, as colagenases MMP-1 e MMP-13 apresentaram maior afinidade pela CMT-7 com ΔG^{LDBE} igual a $-8,73 \text{ kcal.mol}^{-1}$ para MMP-1 e $-9,58 \text{ kcal.mol}^{-1}$ para MMP-13, a gelatinase MMP-2 apresentou maior afinidade pela CMT -8 ($-10,47 \text{ kcal.mol}^{-1}$) e a MMP-9 pela CMT-3 ($-11,83 \text{ kcal.mol}^{-1}$), a estromelisina MMP-10 apresentou a maior afinidade pela CMT -7 ($-7,86 \text{ kcal.mol}^{-1}$), a matrilisina MMP-7 apresentou maior afinidade pela CMT-8 ($-8,74 \text{ kcal.mol}^{-1}$), enquanto as MMPs sem classificação específica da família MMP-12 e MMP-20 apresentaram maior afinidade pela CMT-3 com ΔG^{LDBE} igual a $-10,58 \text{ kcal.mol}^{-1}$ e $-7,79 \text{ kcal.mol}^{-1}$, respectivamente. No geral, os ligantes buscam interagir com o íon de Zn(II) catalítico e realizam ligações de H e contatos hidrofóbicos com as cadeias laterais dos aminoácidos da enzima. Os complexos com maior estabilidade são aqueles que conseguem acessar o canal de especificidade S1' da enzima. A afinidade relativa dos ligantes testados, sugere que há uma preferência pela MMP-9 por todos os ligantes. Sendo que o complexo mais estável obtido neste estudo foi o MMP-9:CMT-3 ($-11,83 \text{ kcal.mol}^{-1}$) seguido MMP-12:CMT-3 ($-10,58 \text{ kcal.mol}^{-1}$), esse resultado está em acordo com a literatura, que afirma ser a CMT-3 a mais potente inibidora das MMPs, estando em fase II de testes clínicos. Os resultados discutidos neste trabalho representam uma pequena contribuição dentro de uma grande área de estudos, e que demandará ainda muitas pesquisas envolvendo diferentes áreas do conhecimento para melhor compreensão das MMPs e seu potencial terapêutico bem como no desenvolvimento de novos inibidores mais seletivos e potentes.

Palavras-chaves: Docking molecular. MMPs. Inibidores de MMPs.

ABSTRACT

Matrix Metalloproteinases (MMPs) are a family of enzymes, whose main function is to degrade the extracellular matrix (ECM), playing a fundamental role in several physiological and pathological processes. In recent decades, different synthetic and natural MMP inhibitors (IMMPs) have been proposed and tested in the control of several diseases involving inflammatory processes and cell progression. In this context, the main of the present work was to investigate and describe the structure and properties of the different MMPs classes from a literature research, followed by a study of the MMPs interaction with tetracycline-derivatives inhibitors applying molecular docking methodology. The literature research was qualitative and exploratory using as a source the bases the Web of Science, Scopus, Periódicos CAPES, Scielo and published books in the area, searching for the keywords: “Matrix Metalloproteinase” and “MMP inhibitors”. The MMPs constitute a family of enzymes dependent on zinc and calcium, and 26 MMPs are currently known, classified according to the type of natural substrate and structural properties. All MMPs classes have common structural domains, being present in all of them a catalytic domain containing a Zn(II) ion and a specificity channel known as S1' pocket. To explore the specificity of MMPs, the ligands CMT-3, CMT-7, CMT-8 and Doxycycline (Dox) were docked into the active site of MMPs representing each family: collagenases (MMP-1, MMP-13), gelatinases (MMP-2 and MMP-9), stromelysin (MMP-10), matrilysin (MMP-7) and miscellaneous MMP (MMP-13 and MMP-20), obtained from PDB, using the Autodock program. The best conformations obtained based on the Autodock binding free energy (ΔG^{LDBE}) enabled the ranking of ligands in terms of their active site affinity. Each family of metalloenzymes, due to their structural characteristics, has different affinity for ligands. MMP-1 and MMP-13 collagenases showed greater affinity for CMT-7 with ΔG^{LDBE} equal to $-8.73 \text{ kcal.mol}^{-1}$ for MMP-1 and $-9.58 \text{ kcal.mol}^{-1}$ for MMP-13, the gelatinase MMP-2 showed the highest affinity for CMT-8 ($-10.47 \text{ kcal.mol}^{-1}$) and MMP-9 for CMT-3 ($-11.83 \text{ kcal.mol}^{-1}$), stromelysin MMP-10 showed the highest affinity for CMT-7 ($-7.86 \text{ kcal.mol}^{-1}$), matrilysin MMP-7 showed greater affinity for CMT-8 ($-8.74 \text{ kcal.mol}^{-1}$), while MMPs without specific classification the MMP-12 and MMP-20 showed greater affinity for CMT-3 with ΔG^{LDBE} equal to $-10.58 \text{ kcal.mol}^{-1}$ and $-7.79 \text{ kcal.mol}^{-1}$, respectively. In general, the ligands tried to interact with the catalytic Zn(II) ion and perform H bonds and hydrophobic contacts with the side chains of the enzyme's amino acids. Complexes with greater stability are those that manage to access the enzyme's S1' specificity channel. The relative affinity of the tested ligands suggests that there is a preference for MMP-9 overall ligands. Since the most stable complex obtained in this study was MMP-9:CMT-3 ($-11.83 \text{ kcal.mol}^{-1}$) followed by MMP-12:CMT-3 ($-10.58 \text{ kcal.mol}^{-1}$), this result is in line with the literature, which states that CMT-3 is the most potent inhibitor of MMPs, being in phase II of clinical trials. The results discussed in this work represent a small contribution within a large area of study, that require much research involving different areas of knowledge for a better understanding of MMPs and their therapeutic potential, as well as in the development of the new MMPs inhibitors more selective and potent.

Key words: Molecular docking. MMPs. MMP inhibitors.

Sumário

1.	INTRODUÇÃO.....	14
2.	OBJETIVOS.....	16
2.1	Geral.....	16
2.2	Específicos.....	16
3.	REFERENCIAL TEÓRICO.....	17
3.1	Matrix Metaloproteinase (MMP).....	18
3.2	Inibidores de MMPs.....	20
3.2.1	Primeira geração de inibidores de MMPs.....	21
3.2.2	Segunda geração de inibidores de MMPs.....	23
3.2.3	Terceira geração de inibidores de MMPs.....	24
3.3	Tetraciclinas como inibidores de MMPs.....	25
4.	METODOLOGIA.....	29
4.1	Pesquisa na literatura.....	29
4.2	Perspectiva computacional.....	29
4.2.1	Seleção e preparação das estruturas dos alvos moleculares e ligantes.....	30
4.2.2	Simulação de docking Molecular para análise dos sistemas proteína-ligante.....	31
5.	RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	36
5.1	Pesquisa na literatura.....	36
5.2	Simulação de docking molecular dos complexos MMP-c:CMTn.....	46
5.2.1	Interação das CMTn e Dox com as collagenases MMP-1 e MMP-13 ..	47
5.2.2	Interação das CMT-n e Dox com as Gelatinases MMP-2 e MMP-9....	50
5.2.3	Interação das CMT-n e Dox com a estromelina MMP-10.....	53
5.2.4	Interação das CMT-n e Dox com a matrilisina MMP-7.....	55
5.2.5	Interação das CMT-n e Dox com as MMPs diversas MMP-12 e MMP-20.....	57
5.2.6	Comparação da afinidade dos ligantes pelas MMPs.....	59
6.	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	61
	REFERÊNCIAS.....	63
	ANEXOS.....	68

1. INTRODUÇÃO

As Metaloproteinases da Matriz (MMPs) são uma família de enzimas, cuja principal função é degradar a matriz extracelular (MEC). Segundo Clendeninn e Appelt (2001) tais enzimas possuem sua atividade biológica reconhecida e vem sendo caracterizadas por suas funções essenciais frente a diferentes processos fisiológicos como o de regeneração celular, entretanto, estão diretamente relacionadas a severas condições patológicas tais como artrite, periodontite e metástase tumoral. Tendo em vista seu importante papel na ocorrência e progressão de muitas doenças, as MMPs tornaram-se alvo atraente para diagnóstico e terapêutica de diversas doenças, entre elas destaca-se o câncer, devido ao papel fundamental das MMPs no mecanismo de progressão celular, e portanto, na efetivação da chamada metástase tumoral (SANYAL *et al.*, 2022; DAS, AMIN E JHA, 2021).

Diversos inibidores naturais e sintéticos das MMPs foram e ainda continuam sendo desenvolvidos e pesquisados de forma gradual e proporcional a medida que as estruturas dessas enzimas vão sendo conhecidas e catalogadas. Atualmente, mais de 26 MMPs são conhecidas, classificadas e catalogadas de acordo com as suas características estruturais e função biológica. Já quanto aos inibidores, segundo Shi *et al.* (2021), há cerca de três gerações reconhecidas de candidatos a inibidores das metaloproteinases (MMPIs). Entretanto, a maioria dos compostos acabam por serem abandonados nas etapas de ensaio clínico por fatores como a dificuldade de se alcançar a especificidade entre as diferentes MMPs trazendo assim limitações frente sua aplicação clínica e riscos de biossegurança. De modo que, esse ponto continua sendo um desafio importante no desenvolvimento de MMPIs, sugerindo a necessidade de um maior conhecimento das estruturas e propriedades dessas enzimas, bem como suas interações com seus potenciais inibidores.

A estrutura das MMPs resolvidas por métodos como difração de Raios-X e RMN estão depositadas nos bancos de estruturas, como o PDB (*Protein Data Bank*) (PDB, 2022). Isto possibilita a aplicação dos métodos de modelagem computacional no estudo das MMPs, fazendo com que possam ser importantes ferramentas na busca por novos inibidores das MMPs e na elucidação de aspectos químicos e bioquímicos relevantes para obtenção da especificidade dos inibidores. Dentre os muitos candidatos a MMPIs destaca-se a tetraciclina quimicamente modificada (CMT do inglês *Chemically Modified*

Tetracycline) CMT-3 ou COL-3, que se encontra em fase II de testes clínicos como um antimetastático (LIU *et al.*, 2001; SHI *et al.*, 2021). Recentemente, vários estudos foram publicados com o intuito de elucidar o mecanismo de diferentes derivados de CMTs, candidatos a potenciais inibidores das MMPs. Marcial e colaboradores (2011, 2012, 2013, 2014) apontaram como resultados de suas pesquisas através de simulações computacionais, que a CMT-3 interagia com o zinco catalítico através da intercalação com o canal S1'da enzima e que o modo de interação distinto da CMT-3 se devia a simplicidade da sua estrutura, onde, essas características levavam a molécula a apresentar maior energia de interação com o receptor. Esses resultados sugerem que o sucesso do uso das metodologias de modelagem computacional no estudo de inibidores de MMPs, deve estar na associação de um conhecimento profundo das estruturas e propriedades específicas de cada MMP com a aplicação de Métodos como Docking Molecular para auxiliar no desenho de novos inibidores com maior potencial de interação com a enzima receptora.

Nesse contexto, a proposta do presente trabalho envolve uma pesquisa na literatura acerca da especificidade das MMPs, por meio do conhecimento da estrutura, propriedades e os principais mecanismos de inibição conhecidos, seguido de uma avaliação da interação das CMTs com as diferentes representantes das classes das MMPs por meio de metodologias de Docking Molecular com o intuito de elucidar aspectos importantes ainda pouco conhecidos sobre a interação das CMTs com os sítios ativos das MMPs.

2. OBJETIVOS

2.1 Geral

Descrever a estrutura e propriedade das diferentes classes de MMPs e aplicar métodos de modelagem molecular na investigação de modos de inibição das CMTs com maior seletividade sobre as MMPs.

2.2 Específicos

- ✓ Descrever a estrutura e propriedade das diferentes classes de MMPs a partir de uma pesquisa na literatura;
- ✓ Descrever os principais inibidores e seus mecanismos de inibição conhecidos das MMPs;
- ✓ Avaliar a interação das CMTs com MMPs representativas de cada classe aplicando metodologias de Docking Molecular.

3. REFERENCIAL TEÓRICO

O extraordinário avanço na ciência proporcionou crescente desenvolvimento tecnológico. Desenvolvimento esse que não para de se atualizar e propor ferramentas para a melhor compreensão de conhecimentos que já foram descritos na literatura e aqueles que ainda pouco se conhece. Desta maneira, os avanços tecnológicos trouxeram contribuições em diversas áreas do conhecimento como, química, física, biologia e medicina. Os avanços científicos e tecnológicos nas interfaces entre a química e biologia têm proporcionado oportunidades e desafios notáveis na área de P&D (Pesquisa e Desenvolvimento) de fármacos, com amplo destaque para dois componentes fundamentais: inovação e integração, que traduzem muito bem o papel central da química medicinal moderna (GUIDO, ANDRICOPULO E OLIVA, 2010). Inovação e integração que a química medicinal moderna carrega consigo para melhor explicar os processos químicos e biológicos trazendo assim importantes ferramentas e contribuições que auxiliam no prognóstico de diversas doenças, como o câncer.

Entre os potenciais alvos de novas terapias anticancerígenas estão as Metaloproteinases da Matriz (MMPs), um grupo de enzimas que desempenham papel biológico importante na degradação e remodelagem da matriz extracelular (CLENDENINN E APPELT, 2001). A expressão das MMPs na maioria dos tecidos normais é muito baixa ou até mesmo indetectável, no entanto, há um aumento substancial na maioria dos tumores malignos. Um grande número de estudos em diferentes tipos de tumores, incluindo pulmão, cólon, mama e carcinoma de pâncreas, demonstra uma superexpressão das enzimas na região do tumor em comparação com os tecidos normais adjacentes (SANYAL *et al.*, 2022; SHI *et al.*, 2021). São justamente esses processos, na maioria das vezes anormais, os alvos das pesquisas por novas terapias de combate ao câncer.

Considerando seus importantes papéis na ocorrência e progressão de muitas doenças, as MMPs tornaram-se um alvo atraente para diagnóstico e terapêutica. Vários extratos naturais e inibidores de metaloproteinases de matriz (MMPIs) projetados artificialmente estão sendo desenvolvidos gradualmente (SHI *et al.*, 2021). Uma das categorias farmacológicas de candidatos a inibidor de MMPs são os derivados de tetraciclina (TC), sobretudo as tetraciclina quimicamente modificadas (CMTs) (NELSON, HILLEN E GREENWALD, 2001; MARCIAL; 2013; SANYAL *et al.*, 2022).

No texto que se segue fazemos uma breve descrição das MMPs, dos inibidores de MMPs e das tetraciclinas quimicamente modificadas.

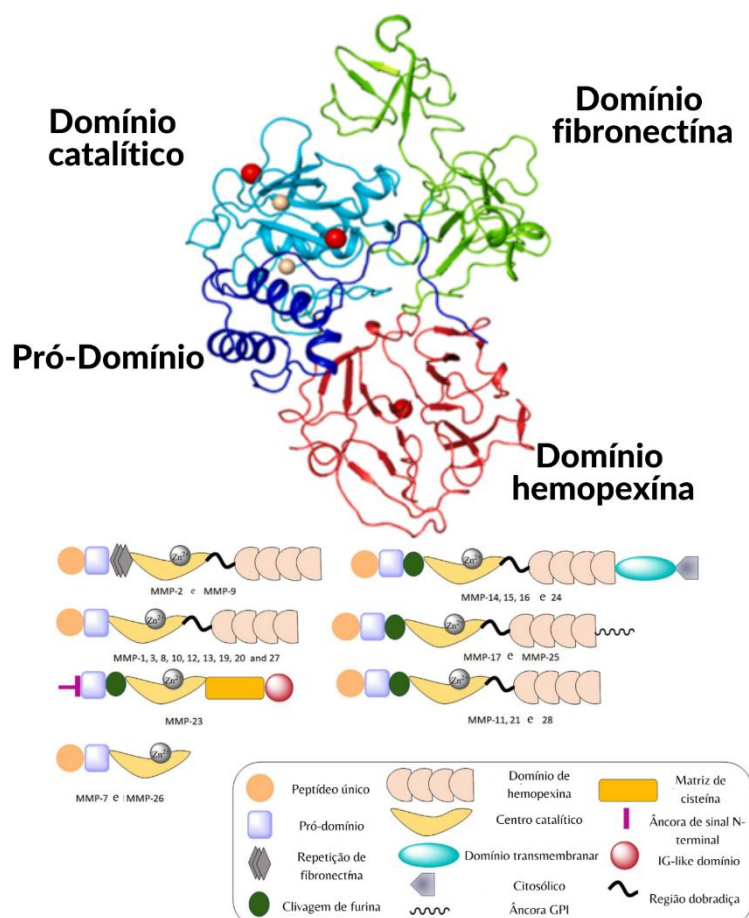
3.1 Matrix Metaloproteinase (MMP)

O organismo é como uma grande fábrica de atividade enzimática, onde cumprem suas funções e mantêm o progresso ordenado de atividades complexas da vida (SHI, *et al.*, 2021). Existem milhares de enzimas estruturalmente diferentes onde boa parte das mesmas apresentam cofatores metálicos em suas estruturas, íons, que se caracterizam como um elemento principal ao se tratar de atividade catalítica. Hausinger (2019) corrobora com a afirmativa trazendo que uma grande quantidade de cofatores metálicos está diretamente interligado aos sítios ativos das enzimas e trata-se de um dos requisitos principais para atividade catalítica enzimática, sugerindo assim que cerca de 30 % das enzimas possuem metalocentros em suas estruturas.

As MMPs correspondem a uma família de enzimas cuja principal função é degradar a matriz extracelular (MEC). Para Clendeninn e Appelt (2001) as metaloproteinases da matrix são endopeptidases onde suas estruturas são dependentes de Zinco e Cálcio e estão associadas a remodelação da matrix extracelular. Essas podem agir em um ou mais componentes e juntas têm a capacidade de degradar todos os elementos proteicos conhecidos da MEC (MURPHY E NAGASE, 2008; MARCIAL, 2013). Segundo Liotta (1982) afirma que a MEC é constituída por diferentes combinações de colágenos, proteoglicanos, ácido hialurônico e várias glicoproteínas como a fibronectina e a laminina, que preenchem a maioria dos espaços intercelulares.

Todas as MMPs apresentam características comuns entre si (Figura 1), possuem um domínio catalítico, que contém um íon de Zn(II) no sítio ativo, um domínio propeptídico que se configura como essencial para a latência enzimática e é removido quando a enzima é ativada. A maioria das MMPs também possui um domínio C-terminal com uma sequência de homologia a hemopexina, que constitui um sítio de ligação para os inibidores teciduais (CLENDENINN E APPELT, 2001; DAS, 2021).

Figura 1: Estruturas de domínio de membros da família MMP.



Fonte: Adaptado de Das, Amin e Jha, 2021 e Sanyal *et al.* 2022.

A família das MMPs é extensa e continua crescendo, atualmente já são mais de 26 enzimas com suas estruturas conhecidas. Cada enzima é classificada por um número e um nome descritivo, por exemplo MMP-1, MMP-2, MMP-9, etc. (ACHARYA, *et al.*, 2004; SANYAL *et al.*, 2022). Segundo Clendenin e Appelt (2001) os principais grupos conhecidos são as Colagenases, Gelatinases, Estromelisinases 1 e 2, Matrilisinas, MMPs ligadas a membrana e outras MMPs. As MMPs são secretadas pelas células na forma de pró-enzima e são ativadas no meio extracelular pela ação de várias proteases (NUTI, TUCCINARDI E ROSSELLO, 2007; MURPHY E NAGASE, 2008). As MMPs apresentam o Zinco catalítico estabelecendo o sítio ativo da enzima, um segundo íon Zn(II) com função estrutural e na sua maioria três íons Ca(II) também com funções estruturais.

Como todas as proteinases extracelulares, as MMPs são secretadas como proenzimas, ou zimogênios, inativadas pela interação entre o íon zinco no domínio

catalítico e um grupo cisteína-sulfidril no domínio N-terminal (pro) (WINER, ADAMS E MIGNATTI, 2018). Segundo Shi *et al.* (2021) existem diversos mecanismos que regulam por sua natureza as MMPs através dos inibidores naturais, no entanto enquanto alvos de prevenção e tratamento de processos patológicos as MMPs podem ser controladas pelos inibidores sintéticos, que serão discutidos no texto a seguir.

3.2 Inibidores de MMPs

Os inibidores das MMPs (IMMPs) podem ser classificados como sendo naturais (endógenos) ou sintéticos (peptídicos, não peptídicos, bifosfanatos ou derivados de tetraciclina) (CLENDEININ E APPELT, 2001). Em condições fisiológicas normais, as MMPs são reguladas seletivamente por inibidores teciduais endógenos específicos de metaloproteinases (TIMPs), que inibem tanto a ativação das pró-enzimas quanto a atividade das enzimas por meio de interações diretas (VISSE E NAGASE, 2003; SHI *et al.*, 2021). O desbalanço entre as MMPs e seus inibidores teciduais endógenos (TIMPs) pode resultar em atividade enzimática exacerbada ocorrendo assim degradação anormal da matrix extracelular (MEC) o que pode desencadear diversas patologias. Segundo Tallant e Marrero (2010) as MMPs clivam diversos substratos, desta forma, sua atividade impacta diretamente o ambiente extracelular de maneira agressiva e se sua atividade não for controlada sua ação pode ser danosa e conseqüentemente acarretará em degradação desregulada da matrix extracelular.

Os inibidores teciduais de metaloproteinases (TIMPs), compreende-se em uma família de quatro proteínas (TIMP-1 a 4) que se ligam reversivelmente ao sítio catalítico de MMP de maneira estequiométrica (KAPOOR, *et al.*, 2016; WINER, ADAMS E MIGNATTI, 2018). Dentre as patologias associadas ao desbalanço entre as MMPs e seus TIMPs está o processo de metástase tumoral, para que o mesmo seja efetivado é necessário que a enzima degrade a MEC permitindo a migração de células tumorais, que se depositam em novos tecidos (CLENDEININ E APPELT, 2001; DAS, AMIN E JHA, 2021). E são justamente esse desbalanço entre MMPs e TIMPs o principal alvo dos inibidores sintéticos que vem sendo desenvolvidos.

Durante as últimas décadas houve um aumento frequente em buscas por inibidores de MMPs seletivos, estáveis e potentes. Neste contexto, além de inibidores naturais, existem os inibidores sintéticos das MMPs que, em geral foram pensados para se ligarem ao íon de Zinco(II) presente no domínio catalítico da MMP (GUPTA, 2007; AGRAWAL

et al., 2008). Estes inibidores são chamados de ZBGs (*Zinc Binding Groups*), a maior parte dos estudos se concentram nos compostos derivados do hidroxamato e ácido hidroxâmico (ver Figura 2). Outros MMPIs são projetados com base em princípios diferentes, como os derivados de tetraciclina (discutidos no item 3.3) e bisfosfonatos (ACHARYA *et al.*, 2004; GIRAUDO *et al.*, 2004). Czarny *et al.* (2013) afirmam que mais recentemente uma nova classe de candidatos a inibidor de MMPs, sendo considerados a terceira geração de inibidores das MMPs, estão sendo pesquisados, desta maneira, Jacobsen *et al.* (2013) corrobora com a afirmativa mostrando que esses inibidores apresentam uma fraca ou nenhuma afinidade por zinco, mas especificamente o zinco catalítico, e se denominam não-ZBGs. E por fim, Giraudo *et al.* (2004) afirmam que o desbalanceamento entre MMPs e TIMPs é diretamente dependente da MMP individual alvo, e, portanto, o mecanismo de ação dos novos MMPIs deve ser pautado em maior especificidade quando comparado as gerações anteriores. Os inibidores podem ser classificados em três gerações, que serão discutidas abaixo.

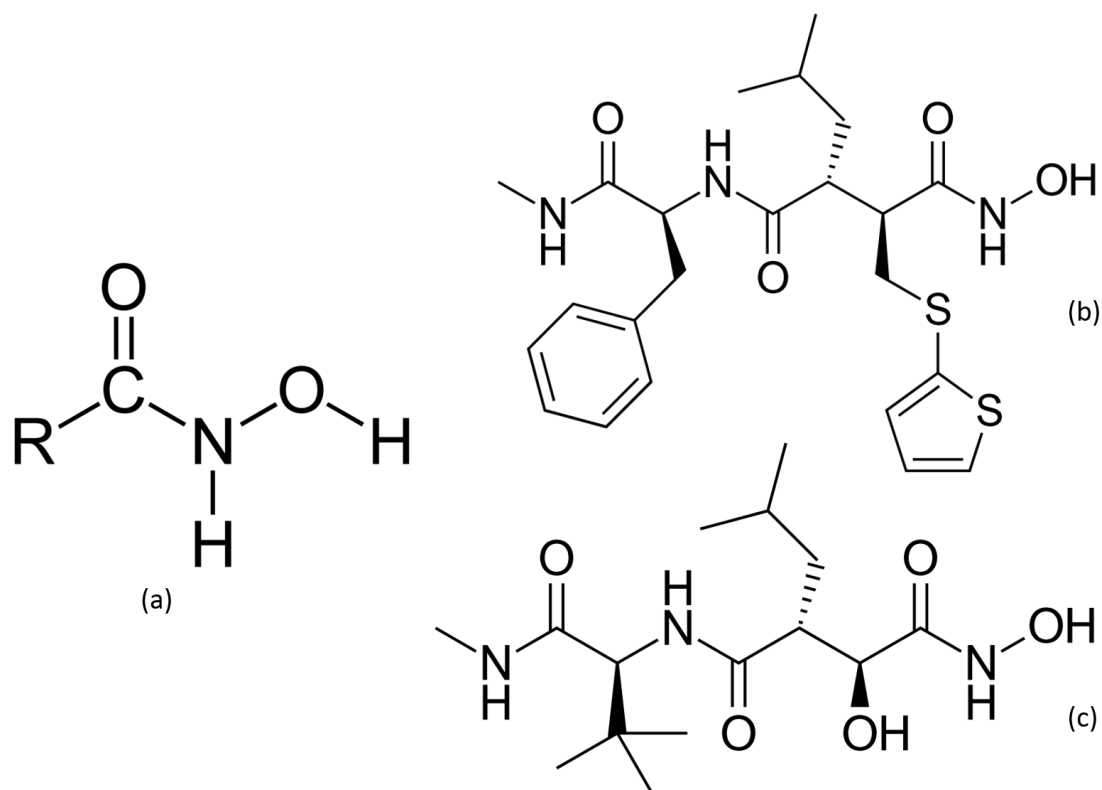
3.2.1 Primeira geração de inibidores de MMPs

O estudo das MMPs começou no início da década de 1980, entretanto, já se tinha conhecimento de sua existência em 1962. A primeira geração de MMPIs foi baseada em peptídeos (ou pequenas proteínas), tomando substratos de MMPs como modelos para o projeto de inibidores (SHI *et al.*, 2021). Esses substratos de MMPs em questão trata-se de diferentes tipos de colágenos, proteoglicanos e também glicoproteínas encontrados em tecidos como a matrix extracelular onde, a partir de observações perceberam que as MMPs se clivam nesses diferentes substratos sendo o comportamento tomado como exemplo para o desenvolvimento da primeira geração de inibidores.

No entanto, Shi *et al.* (2021) afirmam que a flexibilidade molecular inerente e a baixa biodisponibilidade de peptídeos curtos restringiram significativamente sua potência como drogas necessitando de maiores aprimoramentos. Um substituto de peptídeo ideal projetado para as enzimas ou receptores alvo através da modificação ou reforma de peptídeos naturais é denominado “peptídeos miméticos” (LI E XU, 2009; SHI *et al.*, 2021). Os peptídeos miméticos tentam imitar a estrutura de peptídeos naturais, Shi *et al.* (2021) exemplificam os inibidores à base de hidroxamato, afirmando que os peptídeos miméticos à base de hidroxamato atuam como inibidores se coordenando com o Zn(II) catalítico presente no sítio ativo das MMPs. Batimastat e Marimastat (Figura 2)

representam MMPIs à base do pioneiro hidroxamato, exibindo excelente atividade anticancerígena em células tumorais e modelos animais como um inibidor de amplo espectro de MMPs (COUSSENS *et al.*, 2002; SHI *et al.*, 2021). O Marimastat foi desenvolvido com mecanismo de ação análogo e com maior biodisponibilidade em via oral como um tipo adaptado do Batimastat, atingindo assim os ensaios clínicos de fase II e III (SHI *et al.*, 2021). No entanto, as pesquisas do marimastat foram forçadas a serem abandonadas devido a seus efeitos colaterais como “síndrome musculoesquelética” onde os pacientes em tratamento com o mesmo se queixaram do resultado associado ao fármaco e em seguida o descontinuaram. Desta forma, apenas dois medicamentos como MMPI, denominados abametapir e doxiciclina, foram aprovados pela FDA (Federal Drug Administration) para o tratamento de infestação por piolhos e periodontite (KIVELARAJAMAKI *et al.*, 2003; FISHER E MOBASHERY, 2006; BOWLES *et al.*, 2015; MATYSIAK-KUCHAREK *et al.*, 2018; WAN *et al.*, 2008; SHI *et al.*, 2021). Sendo que a doxiciclina é um derivado da tetraciclina, cujo mecanismo de ação ainda não é totalmente elucidado.

Figura 2: Estrutura dos inibidores ZBGs: (a) Ácido hidroxâmico, R=substituinte orgânico (b) Batimastat e (c) Marimastat.

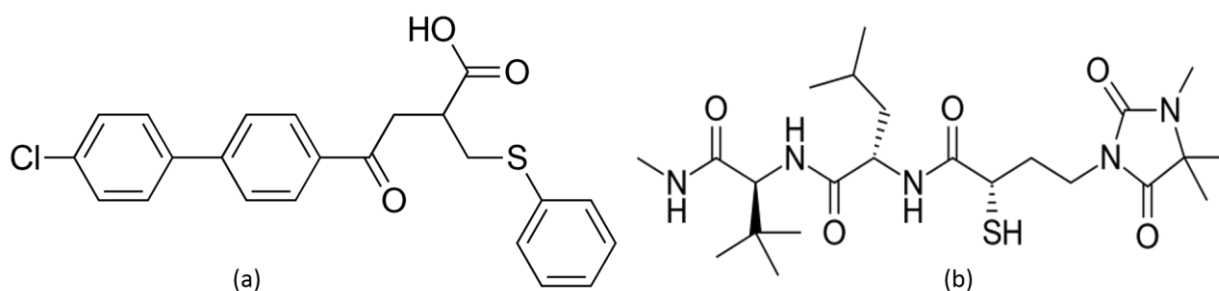


Fonte: O autor (2023).

3.2.2 Segunda geração de inibidores de MMPs

A segunda geração de inibidores de MMPs utiliza em suas estruturas diferentes ZBGs, mecanismos com afinidade ao Zinco catalítico, baseados em peptídeos miméticos e peptídeos não miméticos, sendo constituídos por inibidores de MMP à base de tiol, ácido carboxílico entre outros. O Rebimastat (Figura 3) (BMS-275291) é um MMPI à base de tiol (IC₅₀: MMP-1 = 9 nM, MMP-2 = 39 nM, MMP-3 = 157 nM, MMP-7 = 23 nM, MMP-9 = 27 nM e MMP-14 = 40 nM), disponível oralmente e de amplo espectro (DAS, AMIN E JHA, 2021; NAGLICH *et al.*, 2001). O suporte estrutural para seu ZBG à base de tiol é um mimético não peptídico do colágeno. Outro exemplo de ZBG à base de tiol é derivado YHJ-132, que apresenta melhorias significativas nas propriedades físico-químicas, como maior solubilidade em água e maior estabilidade no ar, sendo considerado um inibidor de amplo espectro, apresentando eficácia na inibição das MT1-MMP, MMP-1, MMP 2, MMP-3, MMP-7 e MMP- 9 (SHI *et al.*, 2021).

Figura 3: Estrutura dos inibidores de segunda geração (a) Tanomastat. e (b) Rebimastat



Fonte: O autor (2023).

Um inibidor típico à base de ácido carboxílico é o Tanomastat (BAY12-9566) (Figura 3). O Tanomastat é um MMPI sintético não peptídeo mimético, que possui um grupo ácido carboxílico livre como um farmacóforo. Descobriu-se que é eficaz em estudos *in vitro* e *in vivo*, entretanto, seu desenvolvimento como medicamento antitumoral foi advertido em ensaios clínicos devido à rápida eliminação e toxicidade (GATTO *et al.*, 1999).

Outros MMPIs são projetados com base em princípios diferentes, é o caso dos derivados de tetraciclina, que serão discutidos no item 3.3, e os bisfosfonatos (ACHARYA *et al.*, 2004; GIRAUDO *et al.*, 2004; SHI *et al.*, 2021).

3.2.3 Terceira geração de inibidores de MMPs

A terceira geração de inibidores compreende-se na utilização de nanomateriais associados ao tratamento de patologias como aquelas relacionadas ao desbalanço das MMPs. Os nanomateriais podem ser usados não apenas como carreadores de drogas, mas também como agentes terapêuticos de doenças por meio da interação direta com biomoléculas funcionais (SHI *et al.*, 2021). Portanto, com base na interação de nanomateriais com proteínas, alguns nanomateriais têm sido desenvolvidos como potenciais agentes estimulatórios e inibitórios da proteína alvo como as MMPs. Por outro lado, Shi *et al.* (2021) afirmam que pesquisas apontam que os nanomateriais induzem distúrbios funcionais na estrutura ou inibem a atividade fisiológica da proteína. Nas últimas décadas reuniram-se evidências significativas a respeito dos nanomateriais, sugerindo que podem estar envolvidos na regulação de MMPs através desses mecanismos inibitórios ou estimulatórios.

Mais recentemente descobriram que os nanocluster de ouro, as chamadas AuNPs, mostraram um efeito inibitório na atividade das MMPs, dependendo do tamanho e da carga superficial das AuNPs (HASHIMOTO *et al.*, 2017; SHI *et al.*, 2021). Resultados apontaram que os AuNPs de tamanhos menores e carregados negativamente foram capazes de inibir a atividade enzimática das MMP-2 e MMP-9 através de coordenação ao íon Zn(II) presente no sítio catalítico das MMPs.

Ao analisar a literatura, o que se pode afirmar é que, a regulação da atividade enzimática das MMPs por nanomateriais utiliza como estratégia alternativa a interação direta dos nanoinibidores com as MMPs. Shi *et al.* (2021) corroboram dizendo que após ajuste de parâmetros físico-químicos dos inibidores de MMPs baseados em nanomateriais poderão ser otimizados, segundo o mesmo ao se ajustar os parâmetros de forma fina permite-se que os nanoinibidores obtenham acesso seguro de aplicação em sistemas biológicos fornecendo maiores oportunidades de otimizações adicionais com base nas suas funções biológicas.

No entanto, o conhecimento dos mecanismos inibitórios utilizados na regulação da atividade enzimática das MMPs por inibidores desenvolvidos através de nanotecnologia é preliminar, e se faz necessário pesquisas que busquem esclarecer os principais aspectos relacionados aos nanomateriais, sendo que na maioria das pesquisas existentes observa-se inicialmente apenas a relação entre a flutuação da atividade

enzimática das MMPs causada pela interação com os nanomateriais, mas os resultados dessas flutuações e os mecanismos de inibição raramente são descritos na literatura, sugerindo-se etapas iniciais de pesquisas.

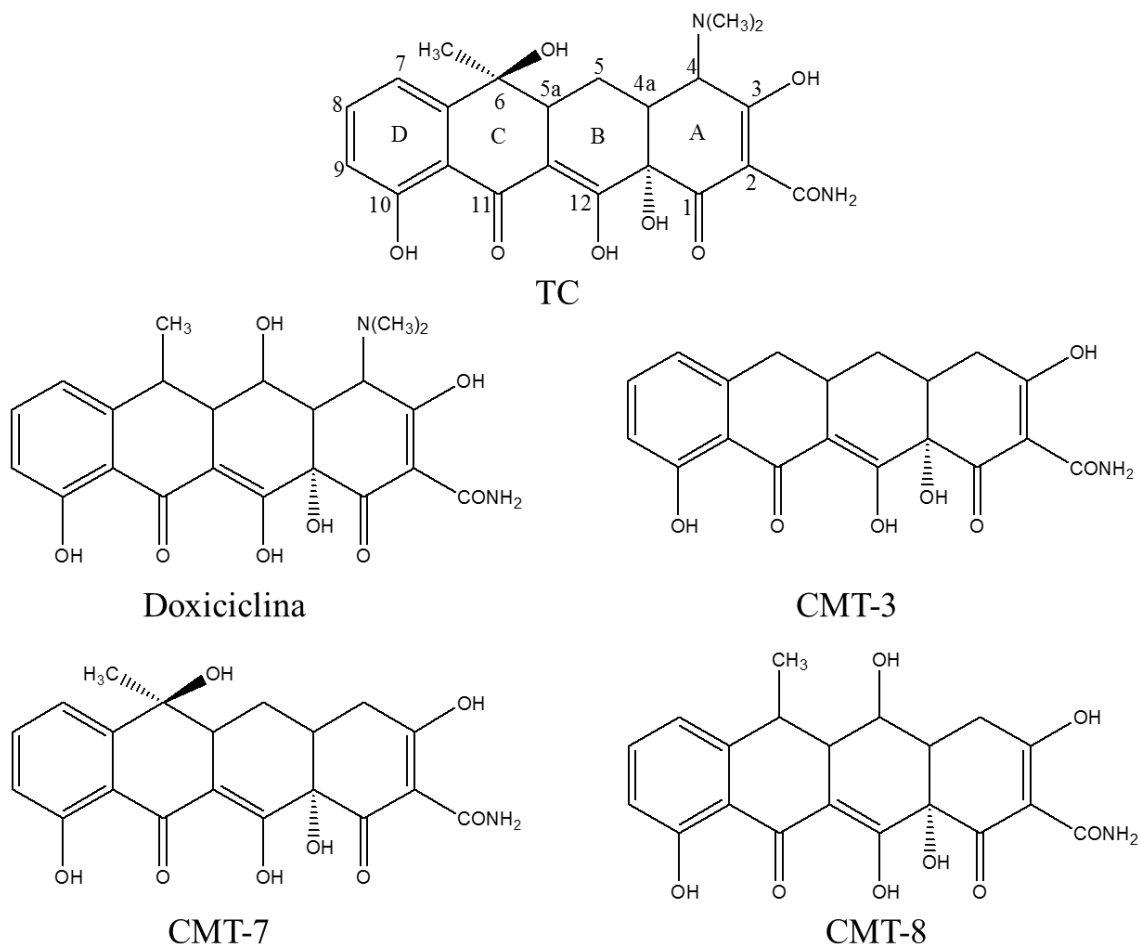
3.3 Tetraciclina como inibidores de MMPs

As tetraciclina (TCs) são uma família de moléculas estudadas desde a década de 1940, e já foram utilizadas no tratamento de inúmeras doenças infecciosas causadas por bactérias gram-positivas e gram-negativas (BORGHI E PALMA, 2014). As TCs constituem uma família de antibióticos de amplo espectro de atividade antibacteriana, atuando principalmente na inibição da síntese proteica (NELSON, HILLEN E GREENWALD, 2001; MARCIAL, 2013). O termo tetraciclina é utilizado para descrever toda uma classe de moléculas caracterizada pela junção de quatro anéis aromáticos de seis membros que são deveras equivalentes entre as TCs. A síntese da molécula de tetraciclina e seus derivados aguçaram o interesse de estudiosos durante décadas devido seu potencial de emprego em diversas patologias.

Ao se retirar o grupo funcional dimetilamino (DMA) na posição C4 da TC foi observado que a mesma perdia a atividade antimicrobiana, porém mantinha a atividade inibidora de certas metaloproteinases, assim, surge uma nova classe de moléculas conhecidas como Tetraciclina Quimicamente Modificadas, as chamadas CMTs (ACHARYA, *et al.*, 2004). Desta maneira, destaca-se que as CMTs são um grupo de tetraciclina com maior potencial de inibição da atividade das MMPs e possuem como vantagem em relação as TCs convencionais o fator toxicidade, onde, as CMTs apresentam menor toxicidade no organismo. As TCs estudadas como IMMPs incluem as antibióticas como: doxiciclina, minociclina, além da própria tetraciclina.; mas também inclui as tetraciclina quimicamente modificadas (Figura 4) que inibem as metaloenzimas por mecanismos não antimicrobianos (CHOPRA E ROBERTS, 2001).

A classe das CMTs é constituída por uma família de pelo menos 10 moléculas (CMT-1- 10) sem a presença, em geral, do grupo dimetilamônio (DMA) na posição C4 (alguns exemplos na Figura 4). O mecanismo de inibição das MMPs pelas CMTs ainda não é completamente elucidado, entretanto sabe-se que há a interação com os íons de Zinco(II) e Cálcio(II) associados com as metaloproteinases, bloqueando o sítio ativo, inibindo a ação da enzima (ALYOUSEF, DIVAKAR E MUZAHEED, 2017).

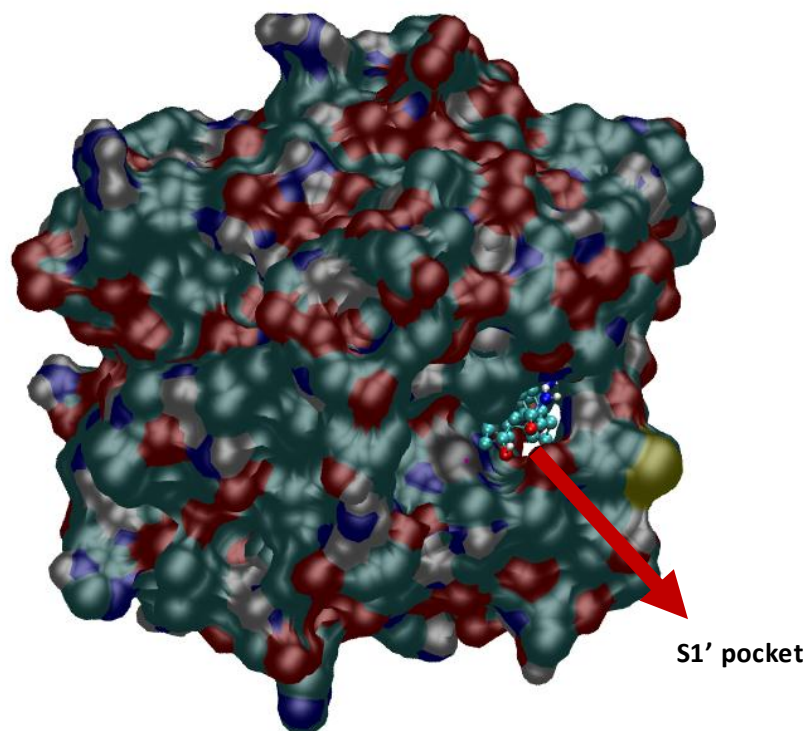
Figura 4: Estruturas da TC e dos derivados doxiciclina e das CMTs estudadas neste trabalho.



Fonte: O autor (2023).

Estudos experimentais mostraram que o análogo CMT-3, também conhecida como COL-3, (Figura 4) é o mais eficiente das CMTs como inibidor de metaloenzimas, sendo a única que chegou a fase II de testes clínicos (ALYOUSEF, DIVAKAR E MUZAHEED, 2017). Marcial *et al.* (2014) buscaram elucidar o mecanismo de ação de diferentes derivados das CMTs como candidatos a antitumorais, a partir de estudos empregando metodologias teóricas como, simulações de cálculos *ab initio* e simulações de docking molecular. Seus estudos demonstraram que a CMT-3 interagia com o zinco catalítico através da intercalação com o canal S1' da enzima. O canal S1' é um canal ao redor do sítio catalítico que constitui a região de maior especificidade da enzima (Figura 5). Sendo um dos pontos chaves a se explorar no estudo dos mecanismos de inibição das MMPs.

Figura 5: Estrutura da MMP-2 em isosurface. Em destaque o canal hidrofóbico S1' da enzima, que estabelece a especificidade das MMPs, aqui complexado com diferentes CMTs.



Fonte: O autor (2023).

Foi sugerido que, o modo de interação distinto da CMT-3, se devia a simplicidade da sua estrutura, que permitia a intercalação com canal S1' da enzima, levando a mesma a apresentar maior energia de interação com o receptor em comparação com as demais CMTs testadas (MARCIAL *et al.*, 2012). Diversas conclusões foram obtidas a partir desses estudos com modelagem molecular, dentre elas, sugeriram que modificações específicas no anel D da CMT-3 poderia aumentar a afinidade pela enzima e consequentemente a levar a uma maior atividade do inibidor. Wiesner (2019) apresentou o interesse de modificar a estrutura da CMT-3 para aumentar a interação, especificidade, e, consequentemente, a inibição da atividade enzimática das MMP-2 e MMP-9, esperando-se que essa mudança específica na estrutura pudesse aumentar a estabilidade do complexo proteína-ligante e induzir mudanças conformacionais na enzima, impedindo sua atividade catalítica. Os resultados das simulações de docking molecular demonstraram que a modificação da estrutura na posição C9 aumenta a reatividade da molécula, por essa razão, foram selecionados alguns dos substituintes para estudos, sendo derivados das aminometiltetraciclinas (AMCs) e das glicilclinas formando uma nova classe de análogos à CMT-3 (WIESNER, 2019). Tendo sido estudados 12 diferentes

análogos, que foram ancorados dentro do sítio ativo da MMP-9, utilizando o programa Autodock® para realizar simulações de docking molecular, dos quais 3 obtiveram energia de ligação maiores do que a CMT-3 sem modificação.

Apesar dos trabalhos descritos acima e de outros disponíveis na literatura, percebe-se que ainda há muito o que se investigar acerca do mecanismo de inibição das MMPs pelas moléculas derivadas da TCs, como as CMTs. De modo que, no presente trabalho será estudado as propriedades estruturais das MMPs, definindo as diferenças que geram a especificidade entre elas, e posteriormente serão realizadas simulações de docking molecular para avaliar a interação das CMTs com o sítio ativo de MMPs de cada uma das classes buscando explorar as diferenças estruturais entre essas MMPs que possa contribuir para maior especificidade do complexo proteína-ligante.

4. METODOLOGIA

4.1 Pesquisa na literatura

Na primeira parte do trabalho foi avaliado a estrutura, propriedades, inibidores, e os mecanismos de inibição das MMPs. Tal avaliação se realizou mediante uma pesquisa literária acerca das MMPs, através da pesquisa bibliográfica qualitativa e de caráter exploratório, ou seja, baseando-se na pesquisa bibliográfica, procurando as referências teóricas publicadas com o intuito de colher informações ou conhecimentos prévios sobre o tema em análise. Segundo Matos e Vieira (2001), a pesquisa bibliográfica trata-se de levantamento de referências teóricas já analisadas e publicadas por meios escritos e eletrônicos, como livros, artigos científicos e página de web sites.

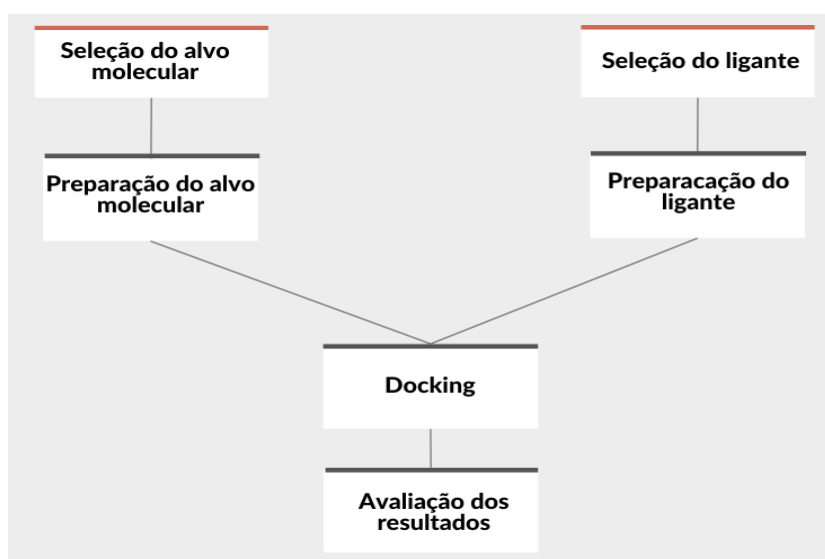
Se tratando da perspectiva qualitativa da pesquisa, Fonseca (2002), nos trás que essa modalidade de pesquisa se preocupa com aspectos da realidade que não podem ser quantificados, centrando-se na compreensão e explicação do objeto de estudo da pesquisa, ou seja, possui enfoque na interpretação do objeto de estudo e da importância do contexto do objeto pesquisado. Como fonte de pesquisa se utilizou bases de dados como Web of Science, Scopus, Periódicos CAPES, Scielo e livros publicados da área, utilizando as palavras chaves: (inhibitors MMPs) e (Matrix Metalloproteinase) bem como seus correspondentes da língua portuguesa. Não se aplicou limitação sobre datas de publicação, pois buscou-se analisar os surgimentos dos termos em artigos científicos bem como as métricas de publicação ao longo dos anos.

4.2 Perspectiva computacional

Na perspectiva computacional buscou avaliar a interação de uma grupo de derivados das TCs com o sítio ativo de um conjunto de MMPs representativas de cada classe estudadas na primeira parte do trabalho, aplicando metodologias de Docking Molecular (DM). Os métodos de DM possibilitam a triagem virtual de fármacos com base na estrutura do receptor e predição da sua afinidade com o receptor biológico, e são amplamente aplicados na pesquisa científica dentro do chamado Desenho Racional de Fármacos, sendo uma ferramenta importante, sobretudo, para a química medicinal, no desenvolvimento de novas drogas e na otimização dos candidatos a fármacos (DE AZEVEDO, 2019; DNYANDEV *et al.*, 2021). Atualmente temos disponíveis diversos

programas para simulação de DM (p.e. Autodock®, Gold®, Glide®, FlexX®, Dock®, X-cscore®, DrugScore®), em geral todos seguem estratégias baseadas na estrutura do receptor, porém varia o algoritmo aplicado na busca e avaliação dos complexos formados entre receptor-ligante (PAGADALA *et al.*, 2016; DNYANDEV *et al.* 2021; MENG *et al.* 2011). Os passos fundamentais dos protocolos de docking molecular mais comuns estão descritos na Figura 6.

Figura 6: Fluxograma das etapas comuns aos diferentes modelos de Docking Molecular.



Fonte: O autor (2023).

Tendo em vista o protocolo comum de docking molecular tido como padrão, nos subtópicos a seguir descreveremos as etapas do fluxograma aplicadas no presente trabalho, sendo que o programa utilizado foi o Autodock (MORRIS *et al.* 1998), que possui licença livre para uso acadêmico e é o programa de docking mais citado na literatura dos últimos anos (MENG *et al.*, 2011; PAGADALA *et al.*, 2017).

4.2.1 Seleção e preparação das estruturas dos alvos moleculares e ligantes

Para esses estudos as estruturas dos receptores, no caso as MMPs, foram obtidos do banco de estruturas PDB (*Protein Data Bank*), em geral as estruturas depositadas no PDB foram resolvidas por métodos como difração de Raios-X e RMN, após obter a estrutura cristalográfica das enzimas, os arquivos para a simulação foram preparados usando o programa AutoDockTools (Morris, 2009). Utilizou-se apenas as coordenadas X,

Y e Z da cadeia (A) que contém as sequências de aminoácidos e os íons (Zn(II) e Ca(II)), removendo assim todas as moléculas de água, resíduos, ligantes e em caso de estruturas quaternárias cadeias (B,C e D) que se encontravam na estrutura cristalográfica.

Os ligantes explorados são derivados da TC, especificamente tetraciclinas quimicamente modificadas com maior potencial anti-MMP (CMT- 3, -7, -8) e o análogo doxíciclina (Dox). Para realização da simulação do DM as geometrias dos ligantes foram otimizadas aplicando a Teoria do Funcional de Densidade (DFT) com o funcional híbrido B3LYP e o conjunto de funções de base 6-31G(d) para todos os átomos em fase gasosa. Realizou-se cálculos de frequências harmônicas no mesmo nível de teoria para verificar que se tratava de mínimos na Superfície de Energia Potencial (SEP). Esses cálculos foram executados usando o software Gaussian-09® disponibilizado pelo pesquisador colaborador Dr. Vytor Pinheiro Oliveira do grupo de química computacional do Instituto Tecnológico de Aeronáutica - ITA.

Vale ressaltar que o método usado nesta etapa faz parte do protocolo de docking descrito na literatura para estudos de interação das CMTs com metaloproteínas (MARCIAL *et al.*, 2012, 2013), no presente estudo foi aplicado tal protocolo para fins de comparação. De forma, que foge do escopo do presente texto a discussão detalhada dos métodos teóricos empregados, mas para revisão de métodos teóricos e modelagem computacional sugerimos os livros: *Métodos de Química Teórica e Modelagem Molecular* de Morgon e Coutinho (MORGON E COUTINHO, 2007), bem como artigos publicados em revistas nacionais e periódicos internacionais da área.

4.2.2 Simulação de docking Molecular para análise dos sistemas proteína-ligante

A modelagem dos complexos entre as MMPs e os ligantes derivados da TC ocorreu através de simulações de docking, nas quais os ligantes foram docados dentro do sítio ativo dos receptores MMPs. O docking molecular é desde a década de 80 uma das muitas ferramentas computacionais mais utilizadas para análise e reconhecimento de processos moleculares como interações proteína-ligante (MENG *et al.*, 2011). Através de metodologias de docking molecular é possível analisar as possíveis interações existentes entre um ligante e uma macromolécula alvo em nível molecular, desde que suas estruturas 3D sejam resolvidas, auxiliando na elucidação de processos bioquímicos fundamentais. Essa técnica computacional se baseia em duas etapas fundamentais: i- prevê a

conformação bem como a posição e orientação do ligante dentro de um sítio predefinido do receptor; e ii- permite prever a afinidade receptor-ligante mediante a aplicação de algoritmos de busca conformacional aliada a uma função de avaliação (função de scoring), que permite o cálculo da energia de interação do complexo proteína-ligante fornecendo assim uma estimativa de afinidade presente no complexo. O que diferencia os diferentes softwares de docking molecular previamente mencionados é a utilização de diferentes algoritmos de buscas conformacionais para analisar as melhores orientações e conformações que o ligante apresenta frente ao alvo molecular e diferentes funções de avaliação para prever a energia receptor-ligante.

Neste trabalho utilizou-se para realização de cálculos e simulações o programa Autodock® (MORRIS, 2009), e no texto abaixo apresento uma breve descrição dos métodos de docking empregado pelo Autodock®.

O software Autodock® emprega em sua programação um algoritmo genético de busca conformacional no espaço denominado Lamarckiano (LGA) para numa complexa hipersuperfície de energia prever conformação e orientação da molécula ligante no sítio do receptor (MORRIS *et al.*, 1998). Esse algoritmo genético utiliza operadores genéticos de recombinação (*crossover*) e mutação inspirados no princípio da seleção natural (*Teoria da evolução de Darwin*) para selecionar os indivíduos ou conformações que sobreviveram para próximas gerações. As principais etapas são:

Espaço de busca: onde estão todas as possíveis soluções do problema

Função avaliação (objetivo): Avaliar as soluções. No docking é a energia de interação proteína-ligante.

Crossover: Pares aleatórios de indivíduos são acoplados num processo de cruzamento, sendo que novos indivíduos herdam genes dos pais.

Mutação: Alguns descendentes sofrem mudança genética aleatória para garantir a diversidade.

Seleção: baseada na função avaliação.

As populações evoluem através de sucessivas gerações até encontrar a solução ótima.

No Autodock a função de avaliação é utilizada para prever a afinidade de ligação do complexo receptor-ligante aplicando um modelo de avaliação da energia de ligação $\Delta G^{\text{ligação}}$. Esta função é geralmente empírica baseada em campos de força clássicos, no caso do Autodock é aplicado o campo de força AMBER (*Assisted Model Building with Energy Refinement*) modificado. Esses campos de força são um conjunto de funções

clássicas individual previamente parametrizadas para um dado conjunto de tipos de átomos, por exemplo, o AMBER foi parametrizado para biomoléculas, especialmente proteínas (PONDER E CASE, 2003). A forma funcional do campo de força AMBER usado no Autodock se refere a soma de várias contribuições químicas e estruturais (Equação 1).

$$\Delta G^{ligação} = \Delta G_{vdw} + \Delta G_{ele} + \Delta G_{conform} + \Delta G_{tors} + \Delta G_{Hbond} + \Delta G_{sol} \quad (1)$$

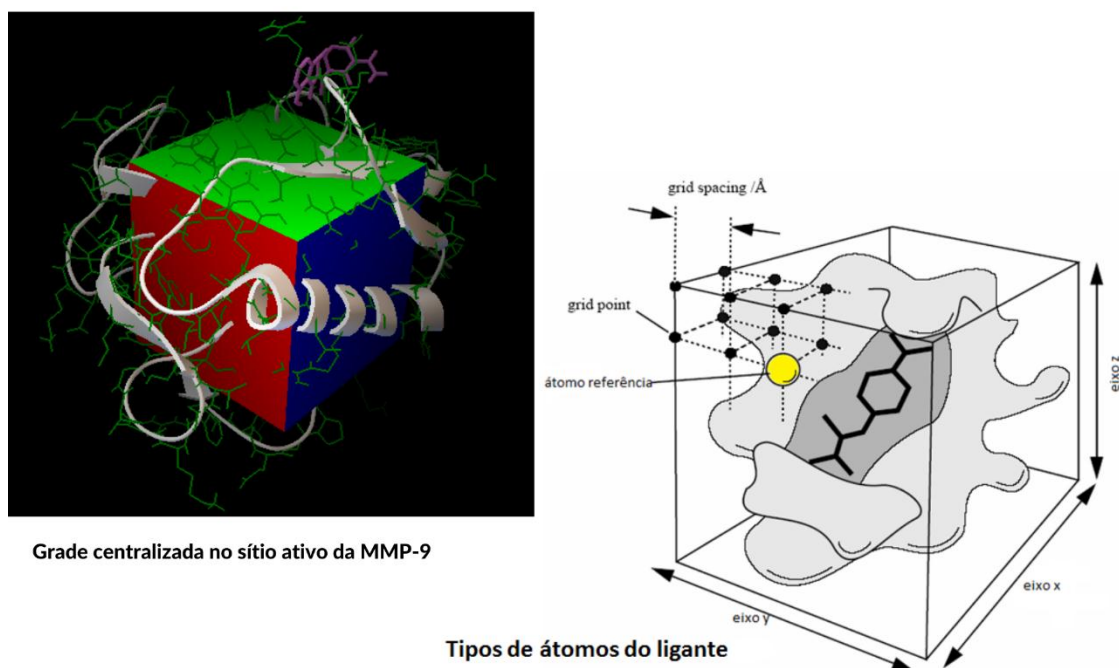
Onde ΔG_{vdw} relaciona-se com a dispersão e repulsão, ΔG_{ele} as interações eletrostáticas, $\Delta G_{conform}$ desvio da geometria covalente, ΔG_{tors} restrição de rotação interna, ΔG_{Hbond} ligações de hidrogênio e ΔG_{sol} efeitos de solvatação.

Como no Autodock a energia é calculada para a interação entre pares de átomos proteína-ligante e ligante-ligante, como vemos na Eq. 2, o custo computacional cresce a medida que se aumenta o número de átomos (N) do complexo (aumento com N^2). De modo que a maioria dos programas de docking realizam o chamado docking rígido, no qual apenas o ligante é flexível durante a simulação, no entanto há possibilidade executar o docking semi-rígido, no qual ligante e parte da cadeia lateral de aminoácidos da proteína são flexíveis, e há atualmente uma busca pela implantação do docking totalmente flexível, sendo esse o maior desafio nesta área de modelagem (MENG *et al.*, 2011; DNYANDEV *et al.*, 2021).

$$\Delta G = \sum_{proteína} \sum_{ligante} E_{intermolecular} + \sum_{ligante} \sum_{ligante} E_{intramolecular} \quad (2)$$

Para contornar o custo computacional descrito acima, o Autodock usa uma metodologia baseada em grade, isso requer um diagrama tridimensional X,Y e Z, denominado pelo software de *Grid Box*, que contém os átomos do ligante e apenas os átomos do receptor vizinhos ao sítio de ancoragem, que é englobado por uma grade/rede tridimensional, essa grid box é gerada pelo módulo *autogrid* do Autodock. Um átomo referência é colocado em cada ponto da rede tridimensional gerada e são pré-calculados potenciais de interação atômica para cada tipo de átomo do ligante (Figura 7).

Figura 7: Representação de uma grade de energia cúbica centrada no sítio de ligação da MMP-9.



Fonte: Adaptada de Magalhães, 2006.

Ao fim da simulação do docking o programa retorna as melhores conformações ou poses dos ligantes dentro do sítio da enzima explorada sendo ranqueados de acordo com o valor da energia livre de ligação (ΔG^{LDBE}) ou da chamada Lowest Docked binding Energy, LDBE, calculada conforme a equação 3 (MORRIS *et al.*, 1998).

$$\Delta G^{LDBE} = RT \ln K_i \quad (3)$$

Na qual, ΔG^{LDBE} é a energia livre de ligação; R é a constante dos gases; T é temperatura (298,15 K) e K_i é a constante de inibição. Sendo que K_i é a quantidade do ligante para inibir, determinado processo ou componente biológico em 50% da quantidade inicial: assim, quanto menor o valor de K_i , mais ativo é um composto.

Nas simulações de docking molecular realizadas neste trabalho se aplicou um protocolo de docking descrito previamente na literatura para esses sistemas (MARCIAL *et al.*, 2012). No qual empregou-se como parametros da grade tridimensional os valores de 80x80x80 e pontos com espaçamento de rede de 0,275 Å centralizado no íon de zinco catalítico das diferentes MMPs, como parâmetros de busca conformacional na simulação

de docking utilizou o algoritmo genético Lamarckiano (LGA) empregado pelo software Autodock® (Morris, 2009) e configurado em 100 buscas conformacionais para cada ligante ancorado nas diferentes MMPs com tamanho da população de 150, foram aplicadas no máximo 250000 avaliações de função e número máximo de gerações 27000. Foi adicionado aos receptores hidrogênios polares e calculadas as cargas Gasteiger para toda proteína. Foi adicionado carga formal +2 aos íons de Zinco e Cálcio, que se fazem necessários para os cálculos de potenciais de interação. As estruturas dos complexos MMP-c:CMT-n e MMP-c:Dox obtidos das 100 buscas conformacionais foram analisadas e salvas como as duas conformações de menor energia de ligação baseado na função de avaliação usando o módulo AutoDockTools do programa Autodock® (MORRIS, 2009) e o programa de visualização molecular, Visual Molecular Dynamics (VMD®). Para identificação das regiões “chaves” de interação das metaloproteínas com os ligantes testados usou-se o programa LIGPLOT + a partir da estrutura 3D dos complexos (WALLACE, LASKOWSKI E THORNTON,1995).

Para todas as conformações que apresentaram menor energia livre de ligação (ΔG^{LDBE}), conformação 1, entre os diferentes ligantes e MMPs obteve-se as representações 2D dos complexos formados. O LIGPLOT + traz uma representação 2D com informações importantes como principais interações do ligante com a proteína, ligações covalentes, ligações de hidrogênio, resíduos de proteínas e átomos correspondentes envolvidos em contatos hidrofóbicos. Conforme indicado por Wallace, Laskowski e Thornton (1995) manteve-se os parâmetros *default* do programa LIGPLOT+ (Tabela 1).

Tabela 1: Parâmetros LIGPLOT+ aplicados nas análises dos complexos proteína-ligante.

Parametros LIGPLOT+ para cálculos de interação proteína/ligante	
Distância entre Hidrogênio e átomo acceptor	< 2,7 Å
Distância entre átomo doador e átomo acceptor	< 3,3 Å
Angulo entre os átomos	> 90°
Parametros para ligações usados no mapeamento das interações hidrofóbicas	
Distância entre dois átomos de carbono	< 3,9 Å

Fonte: LIGLOT +

5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 Pesquisa na literatura

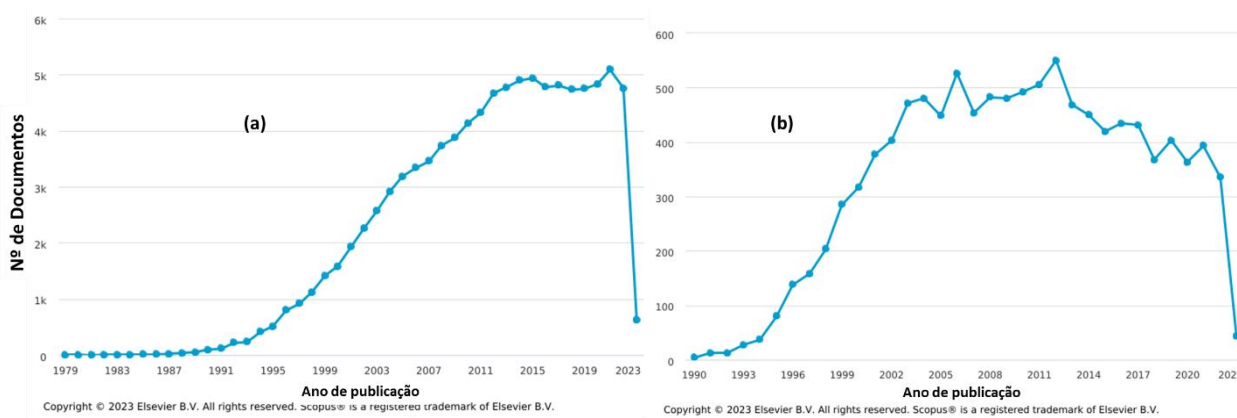
Na primeira parte do presente trabalho foi realizada uma revisão acerca das MMPs, suas propriedades, seus inibidores e principais processos associados, que foi descrita no item fundamentação teórica. Aqui neste item, nos propomos a discutir como este tema das MMPs vem sendo tratado ao longo dos anos na literatura publicada. Para tal pesquisa foi realizada uma busca pelos termos “Matrix Metalloproteinase” e “inhibitors MMPs” e seus respectivos equivalentes em português nas bases de dados como Web of Science, Scopus, Periódicos CAPES.

A busca pelo termo em português “Metaloproteinase da matriz” no portal periódico CAPES apresentou como resultado um total de 107 textos (incluindo artigos, capítulos de livro, resenhas etc.) publicados e revisados por pares entre os anos de 1999 a 2022. Esse comportamento já era esperado, pois embora o portal periódico CAPES constitua uma lista de bases interligadas e apresente um quantitativo total dos descritores que estão vinculados em diferentes bases, a pesquisa disponível na literatura em sua maioria é de língua inglesa. Logo iniciamos as buscas pelo termo em inglês “Matrix Metalloproteinase” nas bases Web of Science e Scopus, que são as maiores bases de busca por artigos de revistas científicas e capítulos de livros.

A base web of Science apresenta os resultados em língua inglesa, e foram obtidas 59,932 publicações selecionadas da coleção principal da base de dados, sendo todos revisados por pares, entre os anos de 1979 a 2023. Já a base Scopus apresenta resultados em todas as línguas e na qual foi obtido um total de 96,239 publicações entre os anos de 1979 a 2023. A Figura 8a ilustra as métricas de publicações de documentos por ano, nota-se que o descritor surge nas bases de dados em 1979 com poucas publicações e tendo como a primeira publicação encontrada o estudo de Dingle, J.T. (1979) trazendo recentes informações sobre o controle de danos articulares que se desenvolvia por atividade enzimática exacerbada causando a degradação da Matrix extracelular, relacionando assim a patologia inflamatórias com as Metaloproteinase da Matriz, entretanto, Jerome Gross e Charles Lapière já relatavam informações de estudos sobre uma enzima ativa degradadora do colágeno tipo I em 1962 onde a atividade colagenolítica foi observada em tecidos de anfíbios (GROSS E LAPIERE, 1962). Apenas 3 artigos foram publicados de 1979 até 1987, sendo que, a partir de 1991 nota-se o interesse crescente por pesquisas na área

constituindo seu ápice de intensidade em quantidade de publicações os anos de 2015 (4937 publicações) e 2021 (5090 publicações). Esses números não só mostram a importância do tema ao longo dos anos dado o número expressivo de trabalhos, mas que essas pesquisas acompanham o desenvolvimento das técnicas experimentais e métodos teóricos de análise de sistemas e processos químicos e biológicos.

Figura 8: Métricas de publicações de documentos por ano para os termos (a) “Matrix Metalloproteinase” e (b) “inhibitors MMPs” na base de dados Scopus.



Fonte: Adaptada de Scopus®

Analogamente, foi realizada a busca nas mesmas bases de dados utilizando o descritor “inhibitors MMPs” e correspondente da língua portuguesa, ilustrados na Figura 9b. Na base Web Of Science obteve-se como resultado 10,832 publicações selecionadas da coleção principal da base de dados, sendo todas revisadas por pares, entre os anos de 1990 a 2023, e, por fim, utilizando a base Scopus obteve-se como resultado 11,046 publicações entre os anos de 1990 a 2023. A Figura 8b demonstra que o descritor surge nas bases de dados em 1990 tendo como primeira publicação encontrada a pesquisa de Wahl, R.C, Dunlap, R.P. e Morgan, B.A. (1990), este trabalho traz os conceitos bioquímicos das enzimas e os modos de inibição da colagenase e estromelina, sendo que na época se conheciam aproximadamente 11 das 26 MMPs. Interessante que no mesmo ano houve o começo da ascensão por pesquisas voltadas ao descritor “Matrix metalloproteinase”, sugerindo que tendo o conhecimento sobre o processo fisiológico das enzimas, e, que já se suspeitavam da associação das mesmas com patologias, começou-se a corrida por pesquisas voltadas a inibição da atividade enzimática exacerbada das MMPs.

A seguir uma breve discussão e análise qualitativa das referências mais importantes (Tabela 2) que foram usadas no referencial teórico do presente trabalho acerca das MMPs, bem como dos seus inibidores. Vale ressaltar que uma revisão mais aprofundada foi publicada em 2020 por Li, Tay e Yiu, com aproximadamente 200 referências, discutindo as perspectivas passadas, presentes e futuras das MMPs (LI, TAY E YIU, 2020).

Tabela 2: Principais referências que constitui o referencial teórico deste trabalho acerca das MMPs.

Autores(as)	Título	Ano
LIOTTA, L. A.; THORGERSSON, U. P.; GARBISA, S. <i>et al.</i>	Role of collagenases in tumor cell invasion.	1982
GOLDBERG G. I.; EISEN A. Z.	Extracellular matrix metalloproteinases in tumor invasion and metastasis.	1991
CLENDENINN, N. J.; APPELT, K.	Matrix Metalloproteinase Inhibitors In Cancer Therapy.	2001
VISSE, R.; NAGASE, H.	Matrix Metalloproteinases and Tissue Inhibitors of Metalloproteinases.	2003
TALLANT, C.; MARRERO, A.; GOMIS-RÜTH, F. X.	Matrix metalloproteinases: Fold and function of their catalytic domains.	2010
CABRAL-PACHECO, G. A. <i>et al.</i>	The Roles of Matrix Metalloproteinases and Their Inhibitors in Human Diseases.	2020

Em 1982, Liotta e colaboradores (LIOTTA *et al.*, 1982) publicaram um artigo atribuindo discussões sobre o papel das collagenases na invasão de células tumorais, no qual afirmam que as collagenases são uma família de metaloproteínas que desempenham um papel na facilitação do processo de invasão de células tumorais em dois tipos de matriz extracelular, que são elas, membranas basais e estroma intersticial em diferentes estágios do processo de metástase. Segundo Liotta *et al.* (1982) a matriz extracelular é constituída por colágeno, proteoglicanos, elastina e glicoproteínas em formato de malha e impede ou não abre espaço para movimento celular. Baseando-se em outros pesquisadores, eles sugeriram que as proteases collagenolíticas secretadas por células tumorais degradam a matriz extracelular e promovem a migração das células, sendo observado em grande número de tumores animais e humanos, que houve um aumento da quantidade de metaloproteases collagenolíticas em tecidos malignos.

Em 1991, Goldberg, G. I. e Eisen, A. Z. (GOLDBERG E EISEN, 1991) publicaram um livro intitulado “Metaloproteinases da matriz extracelular na invasão tumoral e metástase”, que compõe parte da série de livros *Câncer Treatment and Research*, onde, a publicação reúne e evidencia os progressos científicos de diferentes pesquisas voltadas para a exploração de aspectos principais das MMPs até aquele determinado momento como estrutura, funções associadas aos processos fisiológicos e expressão gênica, que demonstravam participar da degradação da matriz extracelular. As pesquisas evidenciadas pelos autores apontavam a implicação das MMPs no processo de invasão e metástase tumoral onde sugeriam que a ocorrência se dava por meio da degradação da matriz extracelular.

Em 2001, Clendeninn e Appelt (CLENDENINN E APPELT, 2001) também publicaram um livro intitulado “Inibidores da metaloproteinase da matriz na terapia do câncer”, trazendo diversos capítulos argumentativos sobre estrutura, propriedades, biologia, bioquímica e inibidores teciduais endógenos e exógenos e discutindo a correlação das enzimas associadas à patologia, câncer. De forma geral, os autores expõem os principais grupos de metaloproteinase conhecidos, que são as Colagenases, Gelatinases, Estromelinas 1 e 2, Matrilisinas e MMPs ligadas à membrana, especificamente conhecidas como MMP-c (c=1,2,3,4,5,6,7,8,9, e etc.). Eles também discutem que através de pesquisas em diferentes tumores, como exemplo, pâncreas, mama, cólon, pulmão e outros foi possível verificar que esses tecidos apresentam alta expressão das metaloproteinases da matriz na região afetada pelo tumor e em contrapartida tecidos normais adjacentes não apresentam essa alta expressão, sugerindo que esse comportamento se devia ao desbalanço entre os inibidores teciduais de MMPs denominado TIMPs e as próprias MMPs causando o aumento da atividade enzimática, e conseqüentemente a degradação da matriz extracelular possibilitando o processo de metástase tumoral.

Em 2003, Visse e Nagasse (VISSE E NAGASSE, 2003) publicaram um artigo trazendo as características da Metaloproteinases da matriz e Inibidores Teciduais de Metaloproteinases discutindo estrutura, função e aspectos bioquímicos. Entre suas argumentações Visse e Nagasse (2003) trazem que as enzimas hidrolisam componentes da matriz extracelular e desempenham um papel central em muitos processos biológicos, tais como embriogênese, remodelação de tecidos, cicatrização de feridas e angiogênese, e quando se encontram em desbalanço estão relacionadas a patologias como aterosclerose, artrite, câncer e ulceração tecidual.

Em 2010, Tallant e Marrero (TALLANT E MARRERO, 2010) publicaram um artigo intitulado “Metaloproteinases de matriz: Dobra e função de seus domínios catalíticos”, no qual trazem que as MMPs são proteínas e peptídeos hidrolases dependentes de zinco e estão amplamente envolvidas na regulação do metabolismo por meio de extensa degradação de proteínas e hidrólise seletiva de ligações peptídicas. Segundo os autores se as MMPs apresentarem processos fisiológicos anormais, como o desequilíbrio entre MMPs e TIMPs, e se não forem submetidas a um processo de regulação elas se tornam destrutivas desencadeando assim patologias como artrite, inflamação e câncer.

Em 2020, Cabral-Pacheco e colaboradores (CABRAL-PACHECO *et al.*, 2020) publicaram um artigo intitulado “Os papéis das metaloproteinases de matriz e seus inibidores em doenças humanas”, no qual apresentam uma revisão geral afirmando o que muitos pesquisadores vem publicando a anos, mas com certa atualização dos estudos voltados para as metaloproteinases e patologias associadas. Eles afirmam que as MMPs são uma família de endopeptidases remodeladoras da matriz extracelular (MEC) dependentes de zinco e que têm a capacidade de degradar quase todos os componentes da MEC, tendo em vista que a degradação da mesma é de suma importância pois está diretamente ligada aos processos fisiológicos embrionário, angiogênese, remodelação de tecidos e reparação celular. Entretanto, quando em atividade anormal, ou seja, demonstrando atividades exacerbadas levando a uma maior degradação da matriz extracelular, pode vir a ocorrer o desenvolvimento de doenças crônicas com aspectos degenerativos, sendo associadas aos processos de neurodegeneração e progressão do câncer, afirmam que o desbalanço entre os inibidores teciduais de MMPs (TIMPs) e as MMPs implica em fisiopatologia e progressão de várias doenças.

A Tabela 3 apresenta os principais trabalhos pesquisados acerca dos inibidores das MMPs, que serão discutidos a seguir. Em 1993, McDonnell, S. e Fingleton, B. (MCDONNELL E FINGLETON, 1993) publicaram um artigo intitulado “Papel das metaloproteinases de matriz na invasão e metástase: biologia, diagnóstico e inibidores. Segundo os autores a expressão dessas enzimas é regulada no nível transcricional por diversos fatores de crescimento, entretanto, também são regulados por uma família de proteínas específicas que atuam como inibidores naturais, sendo denominados de inibidores teciduais das metaloproteinases (TIMPs). Os autores McDonnell e Fingleton (1993) discutem uma correlação entre a expressão das metaloenzimas e o potencial metastático, onde sugeriram que através da compreensão da expressão da

metaloproteínas e da atividade proteolítica pode-se obter o desenvolvimento de agentes terapêuticos com potencial de reduzir a incidência de metástase tumoral, e que a partir da compreensão desses modos de inibição dos (TIMPs) frente as MMPs propuseram agentes terapêuticos sintéticos que desempenhariam esse papel quando as MMPs se encontrarem em desequilíbrio com seus respectivos (TIMPs).

Tabela 3: Principais referências que constitui a base teórica descritor (Inhibitors MMPs).

Autores(as)	Título	Ano
MCDONNELL, S. E FINGLETON, B.	Role of matrix metalloproteinases in invasion and metastasis: biology, diagnosis and inhibitors	1983
ACHARYA, M. R. <i>et al.</i>	Chemically Modified Tetracyclines as Inhibitors of Matrix Metalloproteinases.	2004
SHI, Y.; MA, X.; FANG, G.; <i>et al.</i>	Matrix metalloproteinase inhibitors (MMPIs) as attractive therapeutic targets: Recent progress and current challenges	2021
SANYAL, S.; AMIN, Sk. A.; BANERJEE, P.; <i>et al.</i>	A review of MMP-2 structures and binding mode analysis of its inhibitors to strategize structure-based drug design.	2022

Em 2004, Acharya, M. R. e colaboradores (ACHARYA *et al.*, 2004) publicaram um artigo de revisão intitulado “Tetraciclina quimicamente modificada como inibidores de metaloproteínas da matriz”, que fez parte da coletânea de artigos do livro *Drug Resistance Updates*. Acharya *et al.* (2004) trazem no artigo que o estudo das tetraciclina teve início na década de 1940, tendo em vista sua ação antibiótica contra bactérias gram-positivas e gram-negativas, e que por volta 1960 retiraram de sua estrutura o grupo funcional dimetilamino da posição C4 do anel aromático “A” observando assim que o mesmo perdia seu potencial antibiótico (ver Figura 4) e em estudos futuros, as chamadas CMTs, viriam a ser estudadas como anti-metastáticos, pois foram racionalmente projetadas para inibir a atividade das MMPs diminuindo assim o risco de disseminação de células tumorais para locais distantes pelo mecanismo de metástase. Em 2004 Acharya *et al.* (2004) traz no review sobre o análogo CMT3 ou COL-3 indicando um potencial estável como anticancerígeno e que nos anos atuais (2023) se encontra em fase II de estudos pré-clínicos (SANYAL *et al.*, 2022).

Em 2021, Shi e colaboradores (SHI *et al.*, 2021) publicaram um review intitulado “Inibidores de metaloproteinases da matriz (MMPs) como alvos terapêuticos atraentes: progressos recentes e desafios atuais”, no qual apresentam em suas discussões características estruturais das MMPs e bioquímicas, bem como os inibidores sintéticos classificados em três diferentes gerações conforme discutido no referencial teórico. Eles destacam que entre os desafios encontrados no desenvolvimento de tais inibidores compreende-se o fator toxicidade, estabilidade e especificidade do composto, e ainda afirmam que muitos não ultrapassam a fase II de estudos pré-clínicos mesmo com diferentes gerações de inibidores o que os forçam a parada das pesquisas, como exemplo marimastat e rebimastat. Sendo os únicos inibidores de MMPs que foram aprovados pela FDA são o abametapir e doxiciclina para o tratamento de infestação por piolhos e periodontite. Ressalta-se que a doxiciclina, considerado inibidor de primeira geração, é um derivado da tetraciclina para o qual o mecanismo de inibição ainda não é totalmente elucidado, mas acredita-se que ela se ligaria aos metais presentes na estrutura das MMPs.

Em 2022, Saptarshi Sanyal e colaboradores (SANYAL *et al.*, 2022) publicaram um artigo de revisão intitulado “Uma revisão das estruturas da MMP-2 e análise do modo de ligação de seus inibidores para criar estratégias para o desenho de medicamentos baseado em sua estrutura”, no artigo trazem diversos estudos de docking molecular com diferentes candidatos a inibidores das MMPs, especificamente MMP-2, demonstrando as várias estratégias computacionais que são empregadas no desenho racional desses fármacos durante o projeto de descoberta e adaptação dos mesmos. Eles discutem que durante a aplicação de estratégias computacionais as estruturas proteicas das MMPs são caracterizadas como parte principal no desenho racional de medicamentos baseados na estrutura (*Structure Based Drug Design - SBDD*) de inibidores seletivos de MMPs, aqui trata-se da MMP-2. Eles mostram diversas estruturas cristalinas resolvidas da MMP-2, bem como seus códigos PDBs e informações gerais da estrutura que foram publicadas e analisadas por diferentes parâmetros estatísticos. Sanyal *et al.* (2022) discutem em sua revisão o artigo usado como referencial no presente trabalho para o protocolo de docking molecular. Por fim, a revisão traz os modos de ligação de diversos inibidores das MMPs que são discutidos com o intuito de maximizar a interação dos mesmos com o sítio ativo da enzima MMP-2, as discussões fornecem uma visão importante frente as inúmeras classes de inibidores da MMP-2 acelerando o processo de pesquisas até a descoberta de novos anti- metastáticos.

A leitura de todos estes textos permitiu uma maior compreensão histórica e prática da estrutura e propriedades das MMPs, que nos últimos 60 anos vêm sendo alvo de intensos estudos nas mais diversas áreas da ciência. Na Tabela 4 compilamos as principais classes ou famílias das MMPs, sendo constituídas com base em sua especificidade de substrato. São apresentadas as MMPs representativas de cada classe, o substrato, as patologias associadas as MMPs de cada classe e a atividade biológica.

Tabela 4: Tabela MMPs.

Colagenases			
MMPs representativas da classe colagenases	Substrato	Patologias associadas as MMPs da classe colagenases	Atividade biológica
MMP-1 (colagenase 1)	Colágeno tipo I, II, III, VII, X, fibronectina, Proteoglicanos, gelatinase.	Câncer, Doença neurodegenerativa, Aterosclerose e Angiogênese.	Migração e reepitelização de queratinócitos, migração celular, Anti-inflamatório e pró-inflamatório
MMP-8 (colagenase de neutrófilos).	Colágeno tipo I, II, III, Proteoglicanos	Artrite reumatóide, Câncer, Doença inflamatória intestinal, Periodontite e Asma	Desconhecido
MMP-13 (colagenase 3)	Colágeno tipo I, II, III, gelatinase, Proteoglicanos, fibronectina	Artrite	Ativação de osteoclastos.
MMP-18 (colagenase 4)	Colágeno tipo I, gelatinase.	Desconhecido.	Desconhecido.
Gelatinases			
MMPs representativas da classe gelatinases	Substrato	Patologias associadas as MMPs da classe gelatinases	Atividade biológica
MMP-2 (gelatinase A).	Proteoglicanos, fibronectina, colágeno tipo IV, V, VII e X	Câncer, Angiogênese, Doenças cardiovasculares, Doenças neurodegenerativas, Aneurismas da aorta, Obesidade, Asma, Doença renal, Doença inflamatória intestinal, Artrite reumatoide, Infecções virais e Fibrose hepática	Expansão de Neurite, migração celular.
MMP-9 (gelatinase B).	Plasminogênio e colágeno tipo IV, V, XI, elastina.	Câncer, Angiogênese, Acidente vascular cerebral,	Geração de fragmento semelhante à angiostatina, Afinidade de colágeno aprimorada, Resistência de células tumorais, anti-inflamatório e pró-inflamatório, Neovascularização tímica, Apoptose

		Falência, Aneurisma da aorta, Retinopatia diabética, Distúrbios, Lesão cerebral traumática, Fibrose hepática, Doença inflamatória intestinal, Esclerose múltipla, Artrite reumatóide, Lesão medular, Úlcera do pé diabético, Doença crônica, pulmonar obstrutiva (D uPOC) e Asma.	de condrócitos hipertróficos e recrutamento de osteoclastos.
--	--	---	--

Matrilisina			
-------------	--	--	--

MMPs representativas da classe matrilisina	Substrato	Patologias associadas as MMPs da classe matrilisina	Atividade biológica
MMP-7 (Matrilisina 10)	Proteoglicanos, colágeno tipo IV, Fibronectina e plasminogênio.	Homeostase intestinal.	Diferenciação de adipócitos, Vasoconstrição e crescimento celular, Apoptose mediada pelo receptor Faz, Ativação de osteoclastos e Agregação celular interrompida e aumento da invasão celular
MMP-26. (Matrilisina 2)	Colágeno IV, fibronectina, fibrinogênio, gelatina I.	Carcinoma prostático.	Diferenciação de adipócitos, Vasoconstrição e crescimento celular, Apoptose mediada pelo receptor Faz, Ativação de osteoclastos e Agregação celular interrompida e aumento da invasão celular

Estromelisina			
---------------	--	--	--

MMPs representativas da classe estromelisina	Substrato	Patologias associadas as MMPs da classe estromelisina	Atividade biológica
MMP-3 (Estromelisina 1)	Proteoglicanos, colágeno tipo X, XI e pró-colágeno.	Remodelação vascular pulmonar, hipoxia de hipertensão pulmonar crônica.	Migração celular, Geração de fragmento semelhante à angiostatina.
MMP-10 (Estromelisina 2)	Proteoglicanos, colágeno tipo IV, V, XI, III, Fibronectina.	Homeostase intestinal.	Apoptose de células epiteliais mamárias.
MMP-11 (Estromelisina 3)	Fibronectina, Proteoglicanos.	Cancro e doenças vasculares.	Aumento da biodisponibilidade de IGF1 e proliferação celular.
MMP-12 (Elastase de macrófago)	Fibronectina, Proteoglicanos, Plasminogênio, elastina e colágeno IV.	Artrite.	Geração de fragmento semelhante à angiostatina.

MT-MMPs			
---------	--	--	--

MMPs representativas da classe MT-MMPs	Substrato	Patologias associadas as MMPs da classe MT-MMPs	Atividade biológica
MMP-14. (MT1-MMP)	Colágeno tipo I, II, III,	Câncer, Doença neurodegenerativa,	Redução da adesão e espalhamento celular e Fixação do embrião ao epitélio uterino.

	Fibronectina, Proteoglicanos	Aterosclerose, Angiogênese e artrite.	
MMP-15 (MT2-MMP)	Transglutaminase de superfície, PRO- MMP-2.	Lesões ateroscleróticas	Redução da adesão e espalhamento celular.
MMP-16 (MT3-MMP)	Transglutaminase de superfície, Fibronectina, Colágeno tipo III, PRO- MMP- 2.	Desconhecido.	Redução da adesão e espalhamento celular.
MMP-17 (MT4-MMP)	Fibrina, fibrinogênio, gelatinase.	Desconhecido.	Desconhecido.
MMP-24. (MT5-MMP)	Gelatinase.	Lesões ateroscleróticas	Desconhecido.
MMP-25. (MT6-MMP)	Colágeno IV, fibrina, fibronectina, gelatinase.	Desconhecido.	
MMPs diversas			
MMPs representativas da classe MMPs div.	Substrato	Patologias associadas as MMPs da classe MMPs diversas	Atividade biológica
MMP19	Caseína, colágeno IV, fibrina, fibronectina, gelatina, laminina. Amelogenina.	Envolvida no aumento da suscetibilidade e exacerbação da colite.	Migração de células epiteliais.
MMP-20	Amelogenina	Associada ao aumento da suscetibilidade à cárie dentária, espessura do esmalte e agenesia dentária.	Desconhecido.
MMP-21	Desconhecido	Câncer	Desconhecido.
MMP-22	Caseína, gelatinase	Câncer	Desconhecido.
MMP-23	Desconhecido.	Câncer	Desconhecido.
MMP-28	Caseína	Câncer	Desconhecido.
MMP-29	Desconhecido.	Câncer	Desconhecido.
Referências			
(BRAUER, R.; TURECKOVA, J.; KANCHEV, I. <i>et al.</i> , 2016), (CLENDENINN, N. J.; APPELT, K., 2001), (FERREIRA, H. H., 2012), (HOROZOLU, C.; ÖZDES, T.; ERGINEL, T.; <i>et al.</i> , 2014), (SILVA, L. R. <i>et al.</i> 2021), (NAGASE, H.; VISSÉ, R.; MURPHY, G., 2006), (RIVAS, E. C.; CAROLINA, M.; RAMOS, P., 2017.), (RYDLOVA, M.; JR, L. H.; JR, M. L.; <i>et al.</i> , 2008), (ARAÚJO, S. V. <i>et al.</i> , 2011), (VERMA, R. P.; HANSCH, C., 2007), (FREITAS, D. M., 2007).			

Fonte: Pesquisa do autor.

5.2 Simulação de docking molecular dos complexos MMP-c:CMTn

A partir da pesquisa da literatura acerca das MMPs foram selecionados um conjunto de MMPs representativas das principais famílias, sendo elas: as colagenases MMP-1 e MMP-13, as gelatinases MMP-2 e MMP-9, a estromelina MMP-10, a matrilisina MMP-7 e as MMPs diversas MMP-12 e MMP-20 (Tabela 5) para serem exploradas computacionalmente, tendo sido trabalhadas as estruturas disponíveis no banco de dados PDB conforme protocolo descrito na metodologia.

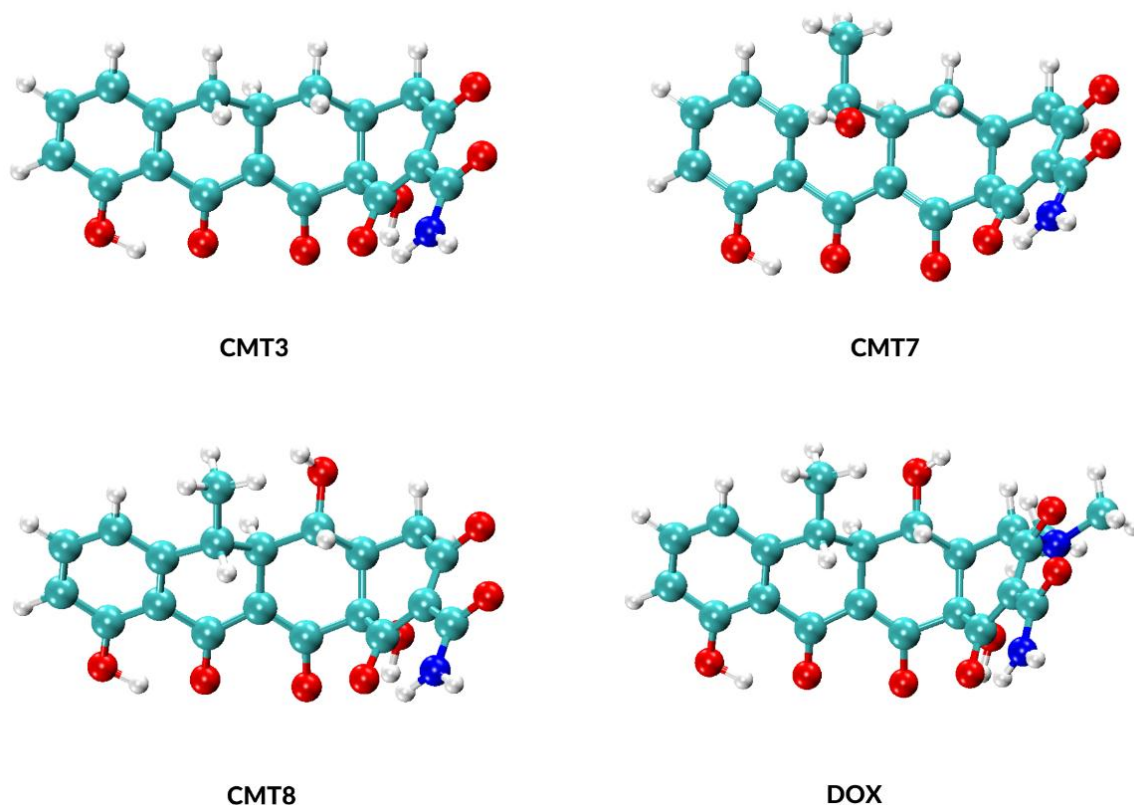
Tabela 5: Receptores obtidos do banco de estruturas PDB explorados neste trabalho.

MMP-c	Código PDB	Método caracterização	PDB DOI	Referência
Colagenases				
MMP-1	2ayk	RMN solução	10.2210/pdb2AYK/pdb	(1998) Biochemistry 37 : 1495-1504
MMP-13	1fls	RMN solução	10.2210/pdb1FLS/pdb	(2000) J Mol Biol 302 : 671-689
Gelatinases				
MMP-2	7xgj	Difração Raio-X	10.2210/pdb7XGJ/pdb	(2022) J Med Chem 65 : 8493-8510
MMP-9	5cuh	Difração Raio-X	10.2210/pdb5CUH/pdb	(2016) Eur J Med Chem 111 : 193-201
Estromelina				
MMP-10	1q3a	Difração Raio-X	10.2210/pdb1Q3A/pdb	(2004) J Mol Biol 336 : 707-716
Matrilisina				
MMP-7	7wxx	Difração Raio-X	10.2210/pdb7WXX/pdb	(2022) J Med Chem 65 : 13253-13263
MMPs diversas				
MMP-12	1jiz	Difração Raio-X	10.2210/pdb1JIZ/pdb	(2001) J Mol Biol 312 : 743-751
MMP-21	2jzd	RMN solução	10.2210/pdb2JSD/pdb	(2007) FEBS Lett 581 : 4723-4726

Fonte: PDB (*Protein Data Bank*).

Os ligantes selecionados para serem complexados com o sítio ativo das MMP-c foram os derivados das tetraciclina: doxicilina (Dox) e as tetraciclina quimicamente modificadas, CMTn (n=3,7 e 8), as quais são descritos na literatura como sendo possíveis potentes inibidores das MMPs (MARCIAL *et al.*, 2013). As estruturas desses ligantes otimizadas no nível de teoria B3LYP/6-31G(d) estão ilustradas na Figura 9. Para facilitar a análise das simulações discutiremos cada classe separadamente.

Figura 9: Representação estrutural (VMD®) dos ligantes otimizados no nível B3LYP/ 6-31G(d).



Fonte: O autor (2023).

5.2.1 Interação das CMTn e Dox com as collagenases MMP-1 e MMP-13

A Tabela 6 ilustra os valores de energia (ΔG^{LDBE}) para as melhores soluções obtidas com o docking molecular baseadas na energia livre de ligação do AutoDock para os complexos dos ligantes com as collagenases MMP-1 e MMP-13. O comportamento em termos de afinidade energética para ambas as collagenases é o mesmo, ou seja, a ordem de estabilidade dos complexos proteína-ligante é mantida CMT-7>CMT-3>Dox>CMT-8. Sendo que o complexo MMP-1:CMT-7 é apenas 0,19 kcal.mol⁻¹ mais estável que o complexo MMP-1:CMT-3, essa diferença aumenta para o complexo com a MMP-13, para o qual o MMP-13:CMT-7 é 1,27 kcal.mol⁻¹ mais estável. Embora esses valores sejam pequenos resultam numa grande diferença nos valores da constante de inibição (K_i) devido a dependência logarítmica com a energia de ligação (Equação 3) conforme ilustrado na Tabela 6.

Tabela 6: Energia livre de ligação do AutoDock e constante de inibição para os complexos MMP-1:CMTn, MMP-1:Dox, MMP-13:CMT-n e MMP-13:Dox. (Valores em kcal/mol⁻¹). Os valores de ΔG^{LDBE} (2) se referem a segunda conformação de menor energia obtida na simulação.

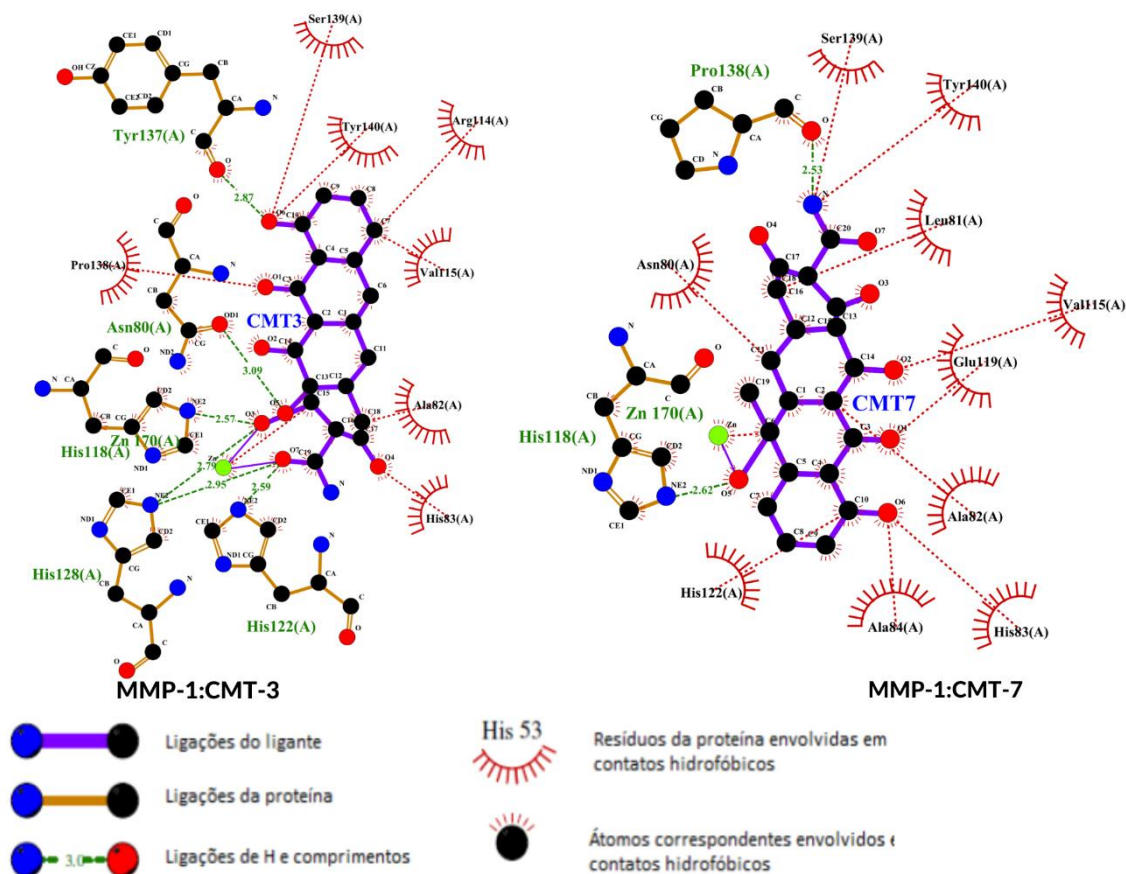
Complexos	ΔG^{LDBE} (1)	ΔG^{LDBE} (2)	Ki (1) (nM)	Ki (2) (nM)
MMP-1:CMT-3	-8,54	-8,20	545,19	8,450
MMP-1:CMT-7	-8,73	-8,31	401,67	812,59
MMP-1:CMT-8	-7,68	-7,63	2,350	2,560
MMP-1:Dox.	-8,27	-7,38	869,05	3,880
MMP-13:CMT-3	-8,31	-8,06	816,18	1,240
MMP-13:CMT-7	-9,58	-9,57	95,50	94,50
MMP-13:CMT-8	-7,74	-7,56	2,110	2,870
MMP-13:Dox.	-7,75	-7,10	2,070	6,260

Fonte: autor.

Para verificar as possíveis causas dessa ordem de estabilidade podemos analisar o mapa de interações 2D gerado pelo programa LIGPLOT+ e ilustrados na Figura 10 para os complexos com MMP-1. É interessante notar que a conformação adotada dentro do sítio ativo das collagenases é bastante semelhante para CMT-3 e CMT-7, em ambos os casos ocorre uma interação direta do Zn(II) catalítico com os oxigênios das CMTs, no entanto a CMT-7 está no sentido oposto ao da CMT-3 em relação ao centro metálico, de modo que a maior estabilidade do complexo MMP-1:CMT-7 pode ser explicada pelos muitos contatos hidrofóbicos com os aminoácidos do sítio catalítico realizados pelos átomos de oxigênio (O1, O11, O12, O11 e Oamd – ver Figura 4 para numeração) da CMT-7, os átomos de O1 e Oamd da CMT-3 estão diretamente envolvidos na interação com o íon de Zn(II).

Para os complexos com a MMP-13 a mesma conformação da CMT-7 é observada, ocorrendo, além das interações de hidrogênio com a HIS119 e PRO139, uma interação direta do íon de zinco de forma monodentada com o O6 do anel C da CMT-7; os ligantes CMT-8 e Dox também fazem uma interação com o íon de zinco através dos Oamd e O11, respectivamente. O interessante é o comportamento da CMT-3, ocorrendo a intercalação do ligante com o canal S1' das metaloenzima, como já descrito na literatura para interação da CMT-3 com a MMP-2 e MMP-9 (MARCIAL *et al.*, 2013) (Figura 11).

Figura 10: Principais interações proteína-ligante nas melhores soluções do docking para os complexos MMP-1:CMT-3 e MMP-1:CMT-7.

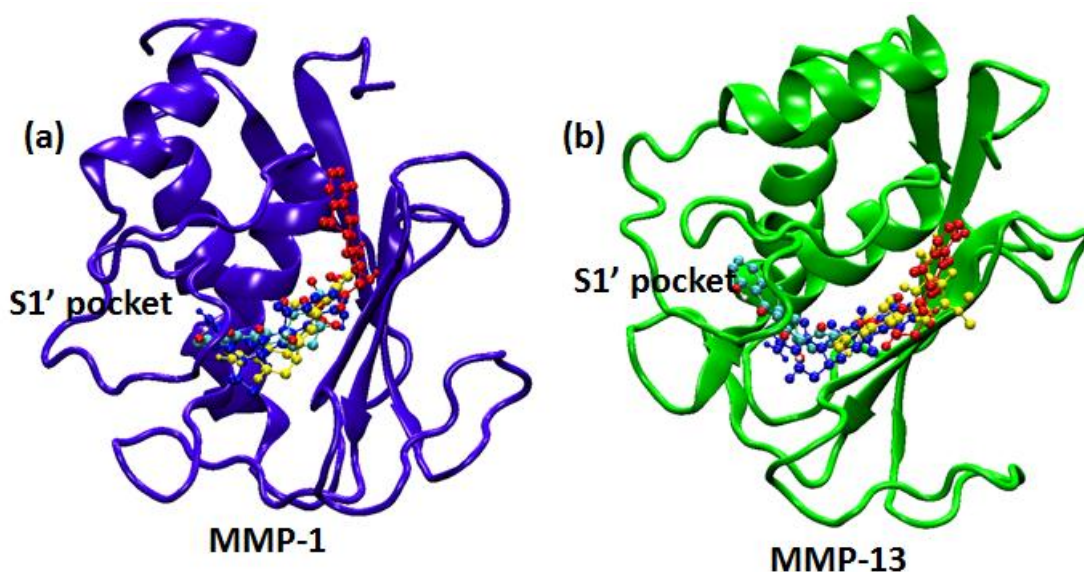


Fonte: O autor (2023).

O comportamento ilustrado na Figura 11, sugere que devido ao fato da MMP-1 e MMP-13 serem ambas da mesma família, colagenases, apresentam padrão estrutural semelhante entre elas, que pode ser observado pelo fator afinidade do ligante CMT-7 frente as mesmas, sendo que, estabeleceu mesmo comportamento de ligação covalente com o zinco catalítico e equivalência nas interações com os resíduos das enzimas. Ressalta-se também que o fato da CMT-7 apresentar maior afinidade frente a MMP-1 e MMP-13 do que a CMT-3 é devido a CMT-3 e sua estrutura simples buscar intercalação direta com o canal S1', se distanciando assim de interações com o zinco catalítico apresentando em sua maioria apenas contatos hidrofóbicos constituindo um encaixe perfeito no canal, visto no complexo MMP-13:CMT-3, e ao não conseguir adentrar por completo no canal parte da sua estrutura fica exposta a uma grande quantidade interações simultâneas, anel A, o que se faz coerente com a literatura pois segundo Das *et al.* (2021) o canal S1' da MMP-13 é maior que o da MMP-1 podendo assim acoplar facilmente o

inibidor, contrariamente, a CMT-7 e os demais ligantes apresentam impedimento estérico em suas estruturas devido aos grupos funcionais nos anéis C e D, grupos esses que apresentam grandes potenciais eletrostáticos e volume estrutural, impossibilitando assim adentrar por completo no canal S1' devido o mesmo para as collagenases ser pouco profundos (FISHER E MOBASHERY, 2006) o que leva o ligante a buscar outra conformação mais estável no sítio ativo da enzima.

Figura 11: Sobreposição das CMT-n dentro do sítio ativo das MMP-1 e MMP-13. (CMT-3 azul claro; CMT-7 azul escuro; CMT-8 vermelho e Dox. amarelo).



Fonte: O autor (2023).

5.2.2 Interação das CMT-n e Dox com as Gelatinases MMP-2 e MMP-9

As gelatinases MMP-2 e MMP-9 apresentam estruturas muito próximas entre elas constituindo padrões estruturais quase idênticos. Essas enzimas estão mais intimamente ligadas aos processos de metástase tumoral, devido ao fato de degradarem colágeno tipo IV, que é o principal componente da membrana basal, primeira barreira a ser vencida pelas células em processos de proliferação celular (CLENDENINN E APPELT, 2001). A Tabela 7 apresenta as energias livres de ligação obtidas no docking para os complexos das CMT-n e a Dox com as gelatinases, essas energias estão ilustradas na Figura 12 mostrando que, no geral, os ligantes tem maior afinidade pelo sítio ativo da MMP-9, podendo a diferença de energia chegar a $2,32 \text{ kcal.mol}^{-1}$ para o complexo com a CMT-3, sugerindo uma certa seletividade dos ligantes entre as gelatinases.

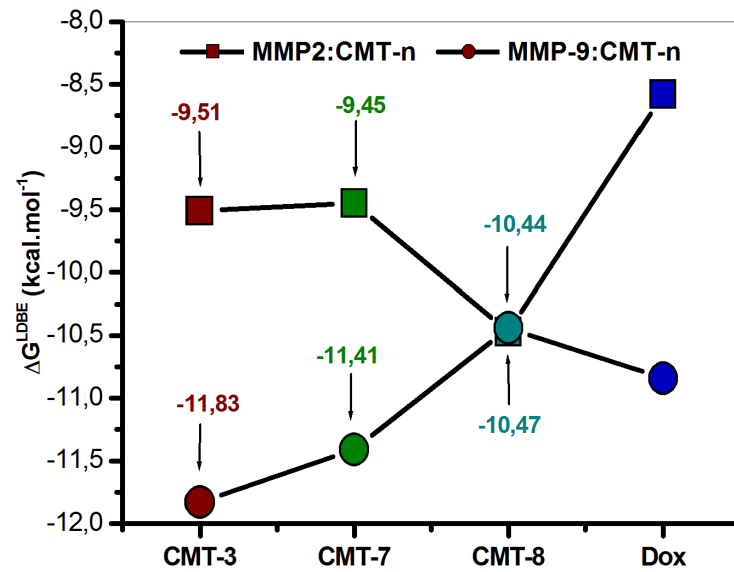
Tabela 7: Energia livre de ligação do AutoDock e constante de inibição para os complexos MMP-2:CMT-n, MMP-2:Dox, MMP-9:CMT-n e MMP-9:Dox. (Valores em kcal/mol-1). Os valores de ΔG^{LDBE} (2) se referem a segunda conformação de menor energia obtida na simulação.

Complexos	ΔG^{LDBE} (1)	ΔG^{LDBE} (2)	Ki (1) (nM)	Ki (2) (nM)
MMP-2:CMT-3	- 9,51	-9,50	106,04	100,04
MMP-2:CMT-7	-9,45	-9,44	118,05	108,05
MMP-2:CMT-8	-10,47	-10,46	21,33	19,33
MMP-2:Dox	-8,58	-6,85	513,27	9,520
MMP-9:CMT-3	-11,83	-11,82	2,14	2,16
MMP-9:CMT-7	-11,41	-11,40	4,30	4,31
MMP-9:CMT-8	-10,44	-10,43	22,24	23,24
MMP-9:Dox	-10,84	-10,83	11,35	12,35

Fonte: O autor.

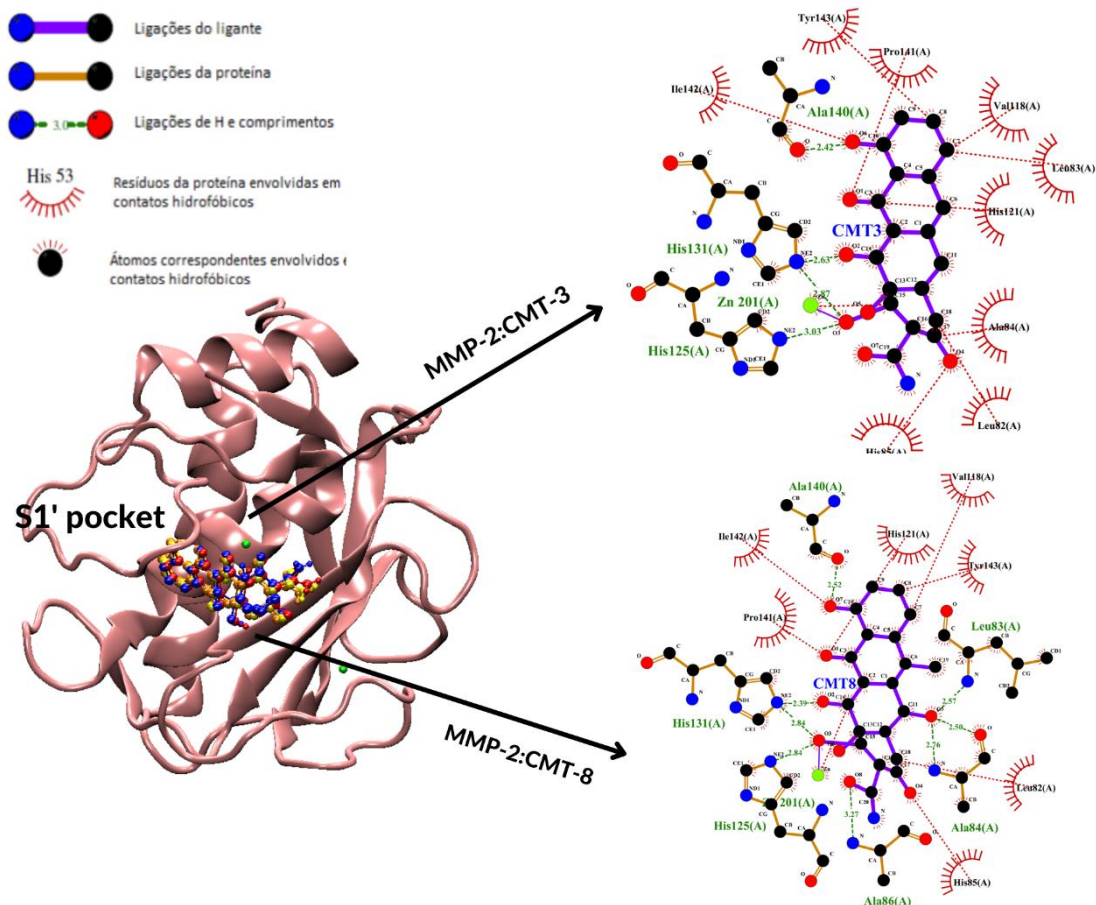
Quanto a ordem de estabilidade, vemos que a CMT-3 tem maior afinidade pela MMP-9 seguida pela CMT-7, CMT-8 e finalmente Dox. Mas no caso da MMP-2 a CMT-8 apresenta maior afinidade seguida pela CMT-3, CMT-7 e Dox. O comportamento observado difere de estudos descritos na literatura referente a MMP-2 e MMP-9, Marcial e colaboradores (2013) apresentam a CMT-3 como sendo a mais estável frente à MMP-2 devido ao fato desse ligante conseguir intercalar com o canal S1' da enzima aumentando a sua estabilidade. Porém, no presente estudo observa-se que isto não ocorreu (Figura 13), os ligantes adotam a mesma conformação dentro do sítio ativo da MMP-2. Nesse sentido, vale ressaltar que segundo Lukacova *et al.* (2004) nas MMPs a profundidade do canal S1' se constitui de acordo com a sequência de aminoácidos presentes na estrutura, e que o canal S1' das gelatinases MMP-2 e MMP-9 são muito mais profundos quando comparados as demais MMPs, porém cada estrutura resolvida das metaloenzimas pode possuir um padrão ligeiramente variável em relação a posição dos aminoácidos do sítio ativo, e no caso do estudo mencionado na literatura foi usada uma estrutura diferente (código 1QIB) da aplicada aqui (código 7XGJ). A CMT-8 e a CMT-3 ambas realizam uma interação monodentada com o ZN(II) através do O12a, mas a CMT-8 apresenta maior afinidade pela MMP-2 por realizar fortes ligações de hidrogênio entre o O5 do seu anel B com os aminoácidos LEU83, ALA84, conforme destacado na Figura 13.

Figura 12: Energia livre de ligação para os complexos com as gelatinases.



Fonte: autor (2023).

Figura 13: Sobreposição dos ligantes dentro do sítio ativo da MMP-2. Mapa 2D para os complexos MMP-2:CMT-3 e MMP-2:CMT-8. (CMT-3 laranja; CMT-7 amarelo; CMT-8 vermelho e Dox. azul).



Fonte: O autor (2023).

5.2.3 Interação das CMT-n e Dox com a estromelisina MMP-10

Das simulações realizadas com o receptor MMP-10 da família das estromelisininas foi possível observar um comportamento distinto em relação aos ligantes testados quanto a primeira e segunda conformação de menor energia obtidas. A curva apresentada na Figura 14 ilustra o comportamento energético dos complexos nas duas melhores poses dentro do sítio ativo da enzima. A CMT-3 e a CMT-7 são os ligantes com maior afinidade pelo sítio catalítico da MMP-10, mas na conformação (1) o complexo MMP-10:CMT-7 é cerca de $0,66 \text{ kcal.mol}^{-1}$ mais estável que o complexo MMP-10:CMT-3, porém na conformação (2) a CMT-3 mantém a energia de interação com a MMP-10 ($\Delta G^{\text{LDBE}} = -7,12 \text{ kcal.mol}^{-1}$), enquanto que a CMT-7 diminui a interação com a enzima e desestabiliza o complexo MMP-10:CMT-7 ($\Delta G^{\text{LDBE}} = -5,99 \text{ kcal.mol}^{-1}$). As principais interações presentes nos complexos com a CMT-3 e CMT-7 podem ser observadas no mapa de interações 2D ilustrado na Figura 15.

Figura 14: Energia livre de ligação para os complexos com a estromelisina MMP-10 nas duas melhores conformações obtidas com o docking.

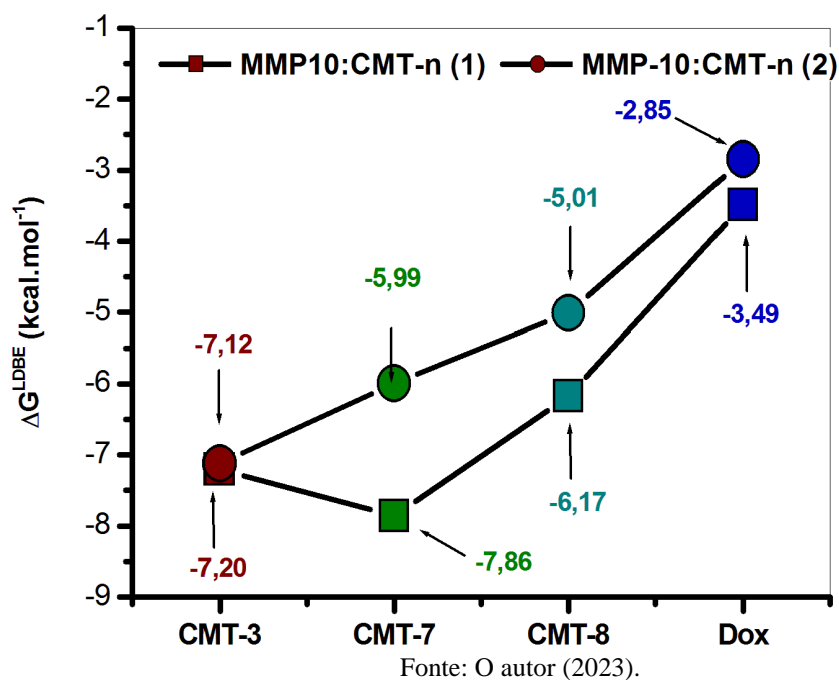
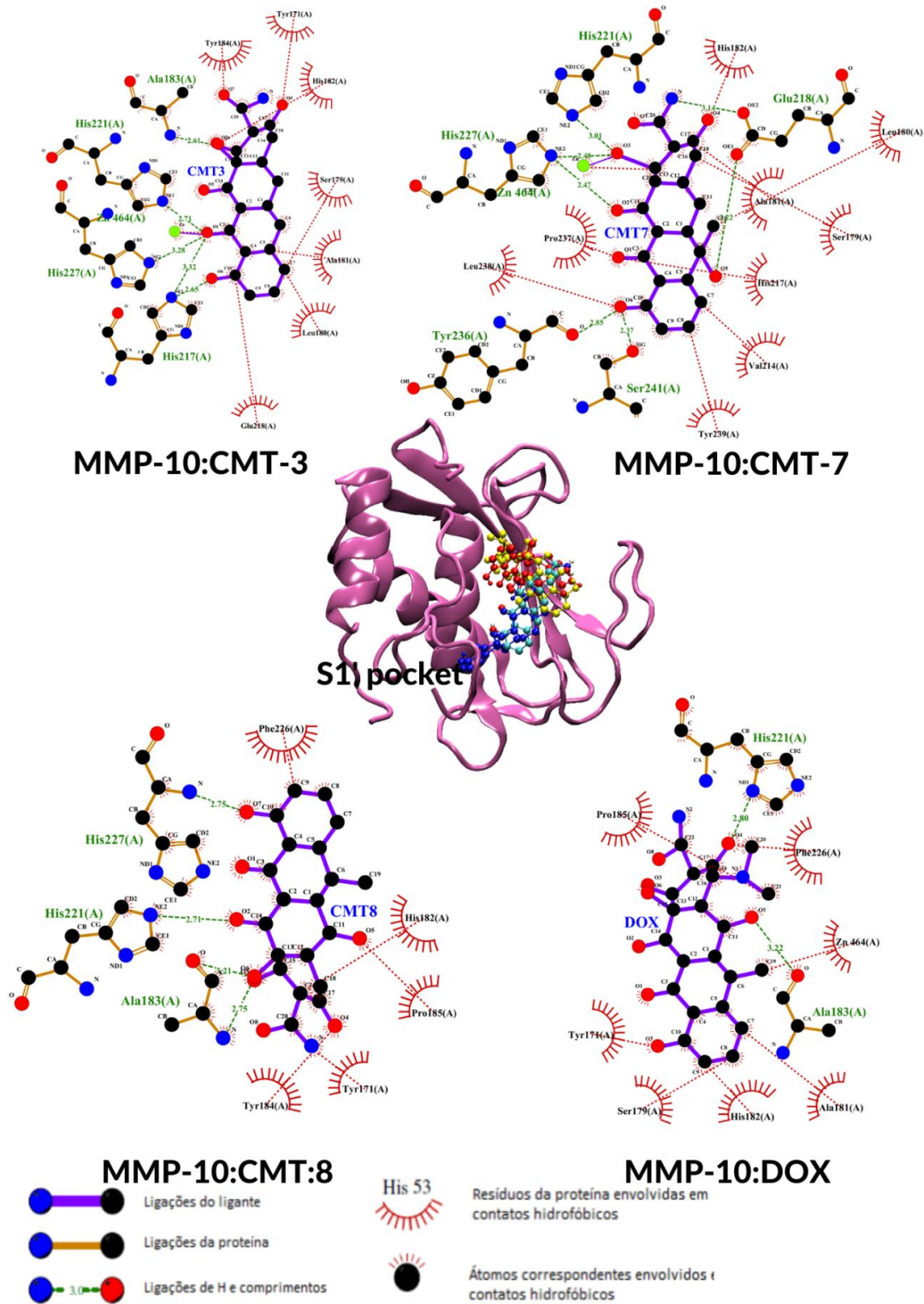


Figura 15: Sobreposição dos ligantes dentro do sítio ativo da MMP-10. Mapa 2D para todos os complexos com a estromelisina MMP-10 na conformação (1). (CMT-3 azul claro; CMT-7 azul escuro; CMT-8 vermelho e Dox. amarelo).



Fonte: O autor (2023).

O ligante CMT-7 e CMT-3 realizam várias ligações de H com as cadeias laterais dos aminoácidos da enzima, especialmente as histidinas coordenadas ao zinco catalítico (HIS217, HIS227, HIS22), além disso, ambos fazem uma interação com o íon de Zn(II), mas em regiões distintas do ligante. A CMT-3 interage via o O11 no anel C e a CMT-7 via O1 do anel A, o que sugere que a CMT-7 adentra mais ao sítio da MMP-10 do que a CMT-3. Porém, ao analisar o modo como ambos os ligantes encaixam no sítio catalítico, através da imagem sobreposta dos ligantes (Figura 15) é possível notar que os ligantes CMT-8 e a Dox não fazem nenhuma interação com o íon de Zn(II) devido ao modo como interagem com o sítio catalítico, e ambos apresentam baixa estabilidade do complexo formado, no caso da Dox cerca de 4,37 kcal.mol⁻¹ menos estável que o complexo com a CMT-7 na conformação (1). Esse comportamento sugere que as interações diretas estabelecidas entre o zinco catalítico possuem importância fundamental para a estabilidade dos complexos, mesmo não apresentando padrão conformacional definido, haja vista a baixa afinidade dos ligantes CMT-8 e Dox pela MMP-10.

5.2.4 Interação das CMT-n e Dox com a matrilisina MMP-7

A interação dos ligantes testados com o sítio catalítico da matrilisina MMP-7 é a que apresenta uma maior proximidade em termos de estabilidade dos complexos formados como pode ser observado pelos valores da energia livre de ligação na Tabela 8.

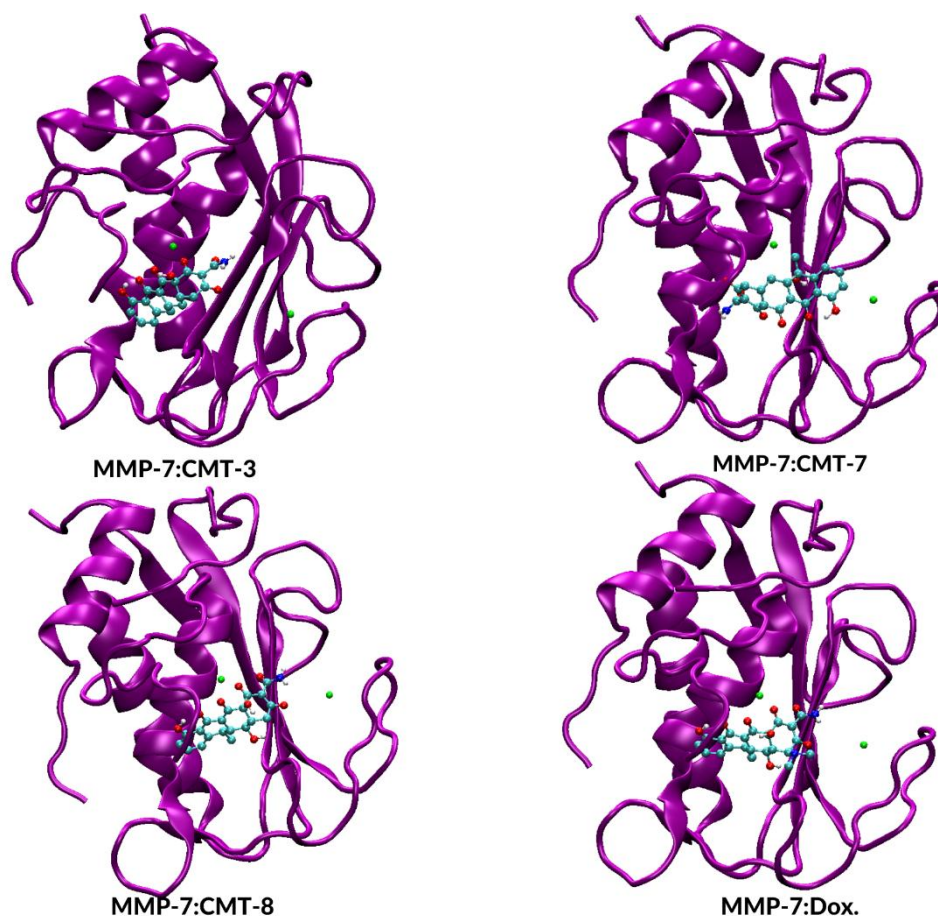
Tabela 8: Energia livre de ligação do AutoDock e constante de inibição para os complexos MMP-2:CMT-n, MMP-2:Dox, MMP-9:CMT-n e MMP-9:Dox. (Valores em kcal/mol-1). Os valores de ΔG^{LDBE} (2) se referem a segunda conformação de menor energia obtida na simulação.

Complexos	ΔG^{LDBE} (1)	ΔG^{LDBE} (2)	Ki (1) (nM)	Ki (2) (nM)
MMP-7:CMT-3	-8,68	-8,67	433,91	432,91
MMP-7:CMT-7	-8,19	-6,74	991,15	1,144 × 10 ⁴
MMP-7:CMT-8	-8,74	-8,36	392,48	741,95
MMP-7:Dox	-6,99	-6,83	7,490	9,850

Fonte: autor

A ordem de afinidade dos ligantes pela enzima é CMT-8>CMT-3>CMT-7>Dox, porém a diferença na energia não passa de 0,55 kcal.mol⁻¹ entre as CMTs. A forma como esses ligantes acessam o sítio catalítico é muito semelhante (Figura 16), a exceção da CMT-7, os demais adotam uma mesma conformação, a qual permite uma interação direta com o íon de Zn(II) de forma bidentada para os ligantes CMT-3 e CMT-8 através dos O12 e O1 nos anéis A e B, já para Dox ocorre uma interação monodentada através do O1. A forte semelhança no modo de interação da CMT-3 e CMT-8 justificam a proximidade da estabilidade dos complexos MMP-7:CMT-3 e MMP-7:CMT-8 dadas pelos valores de ΔG^{LBDE} desses complexos, 8,68 e 8,74 kcal.mol⁻¹, respectivamente.

Figura 16: Complexos dos ligantes dentro do sítio ativo da MMP-7.



Fonte: O autor (2023).

Nenhum dos ligantes testados consegue acessar o canal S1' da MMP-7, se devendo a estabilidade as interações com o metal catalítico, as ligações de H e aos contatos hidrofóbicos. Aqui vale ressaltar que segundo Li, Tay e Yiu (2020) todas as MMPs apresentam estruturas de domínio comuns entre elas com exceção justamente da

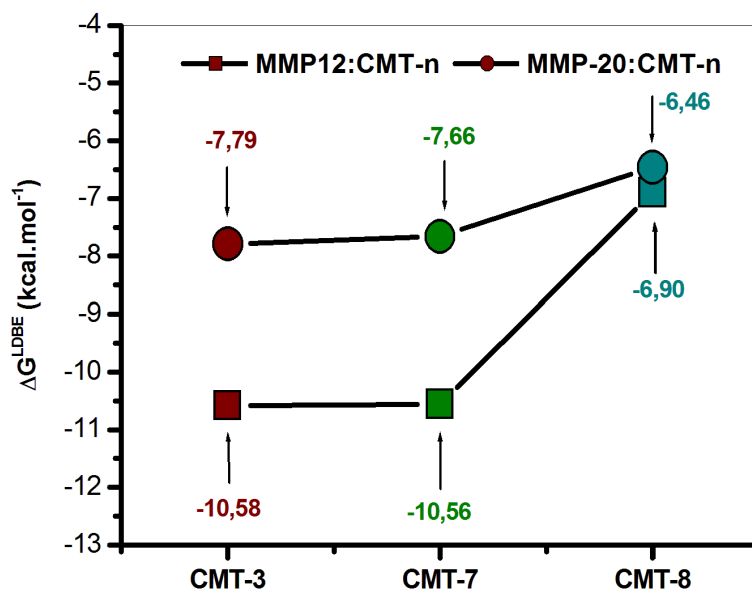
MMP-7, MMP-23 e MMP-26, que não possuem domínios ligados a hemopexina o que as caracterizam por serem menores que as demais MMPs. Essa afirmativa sustenta o pensamento de que como se trata de uma estrutura menor os aminoácidos se arranjam de forma a estabilizar a estrutura, e para essa metaloenzima o zinco catalítico se encontra distante do canal S1' devido sua posição na sequência estrutural e também possui um canal S1' raso devido a MMP-7 possuir estrutura pequena. Nar *et al.* (2001) corrobora com esta ideia afirmando que a MMP-1 e a MMP-7 possuem bolsos S1' rasos em comparação com as demais. Essas diferenças da matrilisina MMP-7 certamente dificultou o acesso dos ligantes ao canal S1', e nem mesmo a CMT-3, que possui uma estrutura sem substituintes nos anéis BCD conseguiu interagir com a esta região de alta especificidade da enzima.

5.2.5 Interação das CMT-n e Dox com as MMPs diversas MMP-12 e MMP-20

Para os resultados das simulações com as MMPs MMP-12 e MMP-20, a primeira questão a se observar é a grande diferença da afinidade das CMTs em relação as duas enzimas. A Figura 17 apresenta a curva das energias livres de ligação do docking para as CMTs, é possível perceber uma maior estabilidade dos complexos formados com a MMP-12. Embora a ordem de afinidade dos ligantes seja a mesma, ou seja CMT-3>CMT-7>CMT-8, temos que o complexo MMP-12:CMT-3 é 2,79 kcal.mol⁻¹ mais estável que o complexo MMP-20:CMT-3, já o complexo MMP-12:CMT-7 é 2,9 kcal.mol⁻¹ mais estável que o complexo MMP-20:CMT-7, sugerindo que de fato os ligantes tem maior afinidade pela MMP-20. Esse comportamento corrobora com a importância da especificidade estrutural das MMPs, visto que ao analisar os modos de inserção das CMTs dentro do sítio ativo das MMP-12 e MMP-20 (Figura 18) percebemos claramente que no caso da MMP-12 os ligantes conseguem acessar o canal S1' da enzima além de interagirem com o íon Zn(II), já na MMP-20 esses ligantes interagem com o metal, mas não conseguem maior inserção no sítio catalítico da enzima.

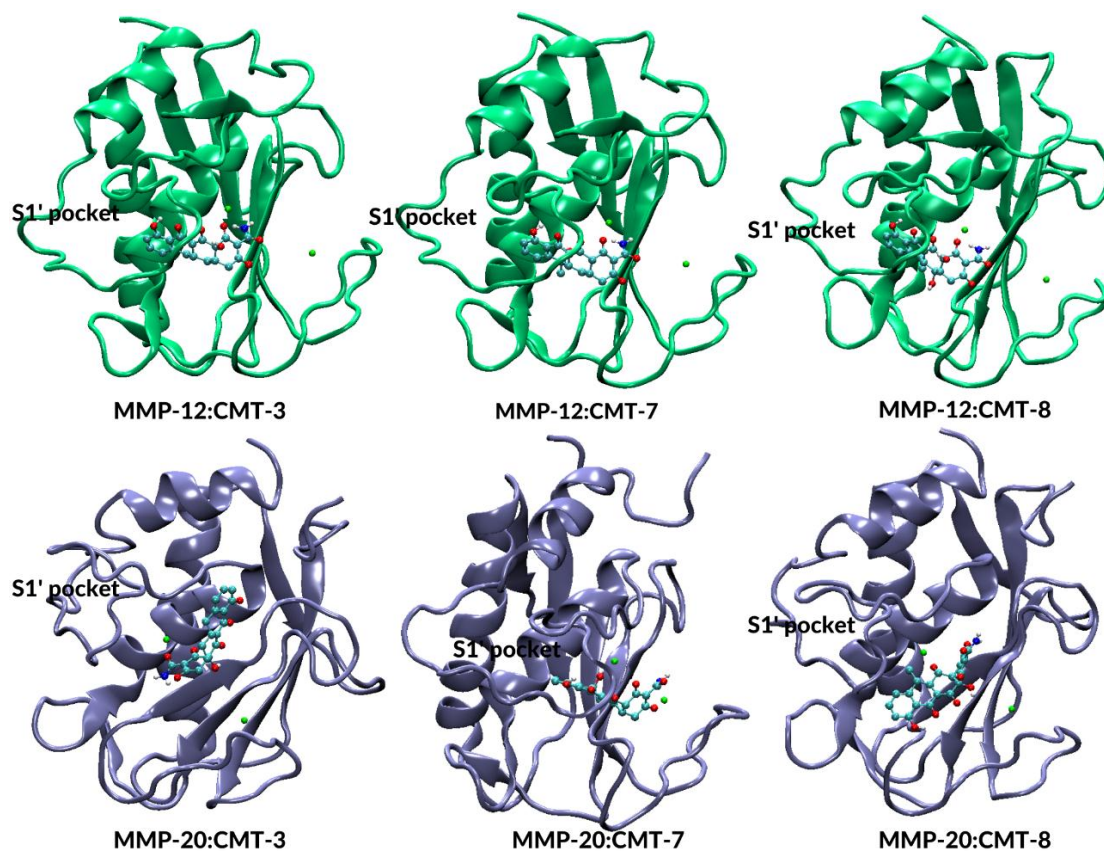
Na literatura é descrito que a homologia estrutural da MMP-12 possui em adjacência ao sítio catalítico o canal de especificidade S1' com cavidade grande que se estende através da proteína semelhante as MMP-3, 8 e 13 que também possuem canais de especificidade grandes e abertos (NAR *et al.*, 2001). Esse fator estrutural explicaria por que as CMTs conseguirem acessar o S1' da MMP-12 e conseqüentemente aumentar a interação com a enzima e sua afinidade.

Figura 17: Energia livre de ligação para os complexos com as MMP-12 e MMP-20. Os resultados para Dox foram omitidos, pois ela apresentou erros durante os cálculos.



Fonte: O autor (2023).

Figura 18: Complexos dos ligantes dentro do sítio ativo da MMP-12 e MMP-20.

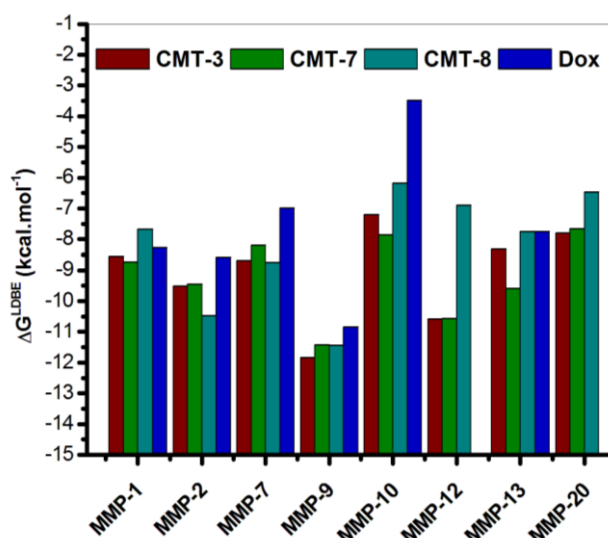


Fonte: O autor (2023).

5.2.6 Comparação da afinidade dos ligantes pelas MMPs

Tendo em vista todas as MMPs testadas no presente trabalho e que os resultados mostraram que a afinidade dos ligantes varia entre as diferentes enzimas, como discutido no texto acima acerca das possíveis razões para as respectivas estabilidades dos complexos formados com cada família de MMP, na Figura 19 plotamos os valores das energias livres de ligação para todos os complexos com objetivo de verificar a afinidade relativa dos ligantes entre as MMPs.

Figura 19: Comparação da Energia livre de ligação para os complexos com as MMPs.

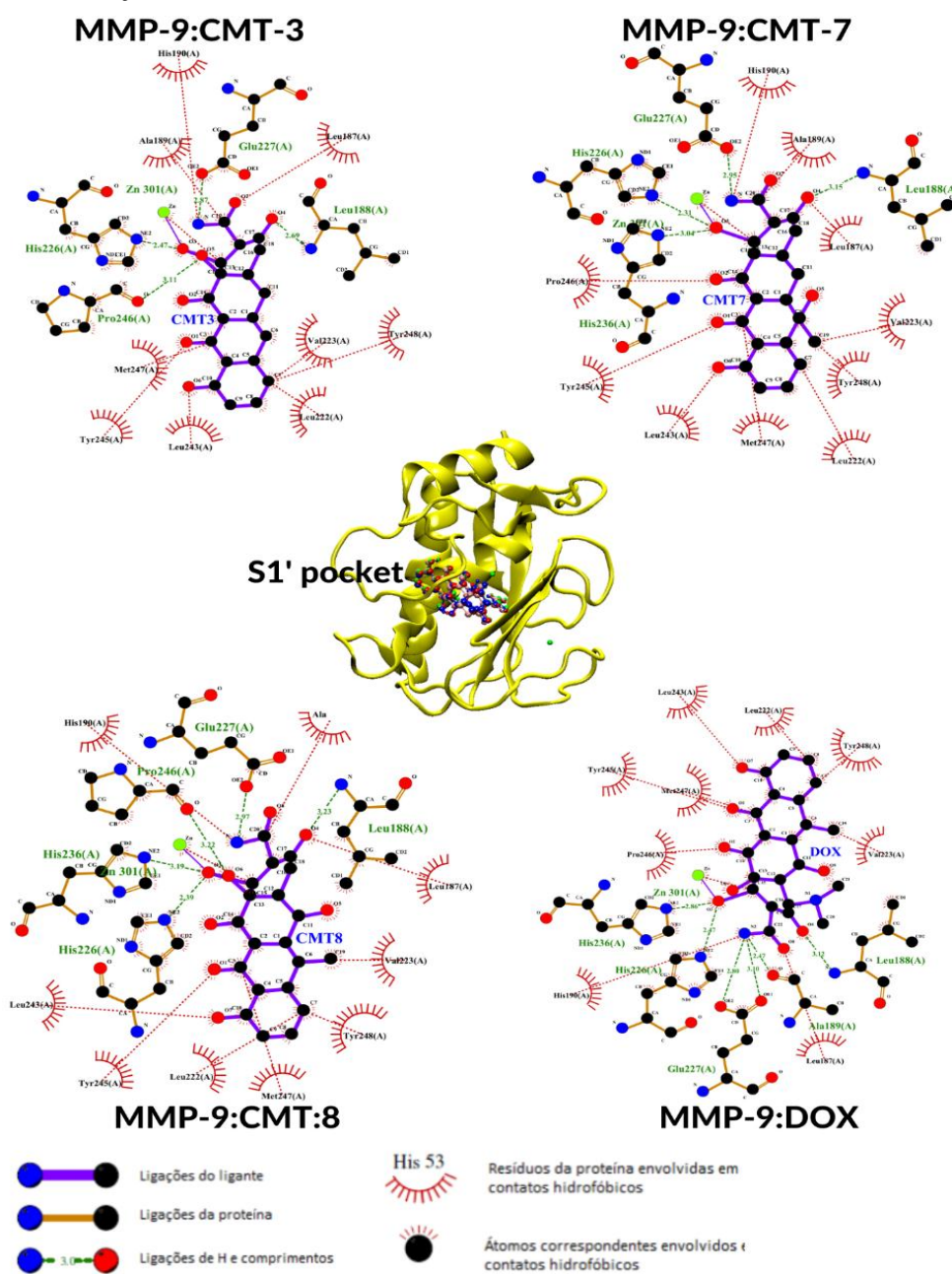


Fonte: O autor (2023).

Considerando todos os ligantes testados a MMP-9 é a enzima pela qual todos apresentam maior afinidade, sendo os complexos formados com esta enzima os mais estáveis. Como já mencionado a MMP-9 é uma gelatinase, e como tal apresenta um canal de especificidade S1' profundo na região do sítio catalítico, ao observarmos em detalhes o modo de interação dos ligantes com essa enzima (Figura 20) vemos claramente que todos se aproximam de modo a interagir com o Zn(II) através do O1 no anel A, possibilitando com que os anéis D e C possam interagir com os aminoácidos do canal S1' da enzima. Isso certamente aumenta a estabilidade dos complexos formados fazendo com que a energia do menos estável, que é MMP-9:Dox seja 0,3 kcal.mol⁻¹ mais estável que o complexo formado com a MMP-12:Dox, que seria a segunda enzima com maior afinidade pelos ligantes. Além disso, o complexo mais estável obtido neste estudo é MMP-9:CMT-3 (-11,83 kcal.mol⁻¹), seguido pelo complexo MMP-12:CMT-3 (-10,58

kcal.mol⁻¹), esse resultado corrobora com a literatura, que afirma ser a CMT-3 a tetraciclina quimicamente modificada com maior potencial como inibidora das MMPs, sobretudo as gelatinases, estando o composto CMT-3 ou COL3 chamada de *Metastat* em fase II de testes clínicos em pesquisas com tumores metastáticos, produzindo efeito estabilizador da doença, bem como boa resposta à sobrevida de paciente em caso de sarcoma de Kaposi relacionado à AIDS (DAS, AMIN E JHA, 2021; SHI *et al.*, 2021; SANYAL *et al.*, 2022).

Figura 20: Sobreposição dos ligantes dentro do sítio ativo da MMP-9 e mapa 2D das principais interações. (CMT-3 rosa; CMT-7 verde; CMT-8 vermelho e Dox. azul).



Fonte: O autor (2023).

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com o intuito de contribuir com estudos que buscam o desenvolvimento de novos candidatos a inibidores das MMPs e por consequência as patologias associadas ao seu desequilíbrio no organismo, sobretudo o processo de metástase tumoral, neste trabalho buscou-se descrever a estrutura e propriedade das diferentes classes de MMPs e seus possíveis inibidores por meio de pesquisa na literatura científica da área e através da aplicação de métodos de modelagem molecular pode-se investigar a formação de complexos dos candidatos a inibidores das MMPs derivados das tetraciclinas, as CMTs e a doxiciclina (Dox).

As MMPs constituem uma família de enzima dependentes de zinco e cálcio, sendo que são conhecidas atualmente 26 MMPs, divididas por classes de acordo com o tipo de substrato natural e propriedades estruturais. Todas as classes de MMPs possuem domínios estruturais comuns, estando presente em todas elas um domínio catalítico contendo um íon de Zn(II) e um canal de especificidade conhecido com S1' pocket. A principal função dessas enzimas é a degradar e remodelar a matriz extracelular (MEC) estando, portanto, envolvidas em importantes processos fisiológicos bem como patológicos. Sendo a inibição das MMPs uma estratégia terapêutica que vem sendo investigada há décadas para diferentes doenças, especialmente processos inflamatórios e metástase tumoral, havendo vários inibidores sintéticos sendo testados e estudados ao longo dos últimos anos.

Para explorar a interação de uma das família de compostos candidatos a inibidores das MMPs aplicamos a metodologia de docking molecular para simular a formação de complexos entre as CMT-3, CMT-7, CMT-8 e a Dox e as MMPs representantes de cada família: colagenases (MMP-1, MMP-13), gelatinases (MMP-2 e MMP-9), estromelina (MMP-10), matrilina (MMP-7) e MMP diversas (MMP-13 e MMP-20). Cada ligante foi ancorado no sítio catalítico das enzimas, sendo as melhores conformações obtidas baseadas na energia livre de ligação do programa Autodock (ΔG^{LDBE}) possibilitando o ranqueamento dos ligantes quanto a afinidade pelo sítio ativo.

Analisando a interação dos ligantes com cada família de MMPs individualmente, percebe-se que para cada família de metaloenzimas, devido as suas características estruturais, apresentou comportamentos diferentes em termos da afinidade pelos ligantes. Sendo que a as colagenases MMP-1 e MMP-13 destaca-se como o ligante de maior afinidade a CMT-7 apresentando $-8,73 \text{ kcal.mol}^{-1}$ para a MMP-1 e $-9,58 \text{ kcal.mol}^{-1}$ para a MMP-13, as gelatinases MMP-2 e MMP-9 apresentaram diferentes afinidades,

enquanto a MMP-2 demonstrou maior afinidade pela CMT-8 com $-10,47 \text{ kcal.mol}^{-1}$ a MMP-9 pela CMT-3 com $-11,83 \text{ kcal.mol}^{-1}$, a estromelina MMP-10 apresentou como ligante de maior afinidade a CMT-7 com $-7,86 \text{ kcal.mol}^{-1}$, a matrilisina MMP-7 apresenta como ligante de maior afinidade a CMT-8 com $-8,74 \text{ kcal.mol}^{-1}$, Já as MMPs sem classificação por família específicas a MMP-12 e MMP-20 tem maior afinidade com a CMT-3 $-10,58 \text{ kcal.mol}^{-1}$ e $-7,79 \text{ kcal. mol}^{-1}$, respectivamente.

Em todos complexos obtidos os ligantes buscam interagir com o íon de zinco catalítico e realizam ligações de H e contatos hidrofóbicos com as cadeias laterais dos aminoácidos da enzima. Em geral, os complexos com maior estabilidade são aqueles que conseguem acessar o canal de especificidade S1' da enzima.

Por fim, ao analisar a afinidade relativa dos ligantes testados com todos as enzimas, percebemos que há uma preferência pela MMP-9 por todos os ligantes. Sendo que o complexo mais estável obtido neste estudo foi o MMP-9:CMT-3 ($-11,83 \text{ kcal.mol}^{-1}$) seguido MMP-12:CMT-3 ($-10,58 \text{ kcal.mol}^{-1}$), resultado esse que está em acordo com a literatura que afirma ser a CMT-3 a CMT com maior potencial como inibidora das MMPs, sobretudo as gelatinases, estando o composto CMT-3 ou COL3, chamado de *Metastat*, em fase II de testes clínicos.

Como perspectivas futuras de trabalho, os melhores complexos obtidos com a modelagem por docking devem ser submetidos a um tratamento refinado de otimização aplicando simulações de dinâmica molecular para melhor compreender os fatores chaves para inibição das MMPs pelos ligantes aqui investigados.

Os resultados discutidos neste trabalho acreditamos ser uma pequena contribuição dentro de uma grande área de estudos, e que demandará ainda muitas pesquisas envolvendo diferentes áreas do conhecimento para melhor compreensão das MMPs e todo seu potencial terapêutico bem como desenvolver novos inibidores mais seletivos e potentes.

Do ponto de vista acadêmico, destaca-se a possibilidade de envolvimento com a pesquisa aplicando metodologias de química computacional em sistemas biológicos de interesse, uma excelente oportunidade de aprendizado para a formação acadêmica, no âmbito de uma outra vertente de estudo, se diferenciando da grade curricular curso.

REFERÊNCIAS

- ACHARYA, M. R. *et al.* Chemically Modified Tetracyclines as Inhibitors of Matrix Metalloproteinases. **Drug Resistance Updates**. v. 7, n. 3, p. 195-208, 2004.
- AGRAWAL, A. *et al.* Zinc-Binding Groups Modulate Selective Inhibition of Mmps. *Chemmedchem*. v. 3, p. 812-820, 2008.
- ALYOUSEF, A. A.; DIVAKAR, D. D.; MUZAHEED. Chemically modified tetracyclines an emerging host modulator in chronic periodontitis patients: A randomized, double-blind, placebo-controlled, clinical trial. **Microbial Pathogenesis**. v. 110, p. 279-284, 2017.
- ARAÚJO, S. V. *et al.* Metaloproteinases: aspectos fisiopatológicos sistêmicos e sua importância na cicatrização. p. 82-88, 2011.
- BERTINI, I.; GRAY, H. B.; STIEFEL, E. I.; VALENTINE, J. S.: Química Inorgânica Biológica. Sausalito, CA: Livros de Ciências da Universidade; 2007.
- BORGHI, A. A.; PALMA, M. S. A. Tetracycline: production, waste treatment and environmental impact assessment. *Braz. J. Pharm. Sci*, v. 50, n. 1, p. 25-40, 2014.
- BRAUER, R.; TURECKOVA, J.; KANCHEV, I.; *et al.* MMP-19 deficiency causes aggravation of colitis due to defects in innate immune cell function. v. 9, n. 4, 2016.
- CABRAL-PACHECO, G. A.; GARZA-VELOZ, I.; ROSA, C. C.; *et al.* The Roles of Matrix Metalloproteinases and Their Inhibitors in Human Diseases. n. 1, 2020.
- CZARNY, B.; STURA, E. A.; DEVEL, L.; *et al.* *Journal of Medicinal Chemistry*. v. 56, p. 1149-1159, 2013.
- CLENDENINN, N. J.; APPELT, K. Matrix Metalloproteinase Inhibitors in Cancer Therapy. Totowa: Humana Press, 2001.
- DAS, S.; AMIN, Sk. A.; JHA, T. European Journal of Medicinal Chemistry Inhibitors of gelatinases (MMP-2 and MMP-9) for the management of hematological malignancies. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 223, p. 113623, 2021.
- DE AZEVEDO, W. F. Docking Screens for Drug Discovery. [s.l.: s.n.], 2019.
- DINGLE, J. T. Recent studies on the control of joint damage: The contribution of the Strangeways research laboratory, **Annals of the Rheumatic Diseases**, v. 38, n. 3, p. 201-214, 1979.
- DNYANDEV, K. M.; BABASAHEB, G. V.; CHANDRASHEKHAR, K. V.; *et al.* A Review on Molecular Docking. **International Research Journal of Pure and Applied Chemistry**, n. May, p. 60-68, 2021.

FERREIRA, H. H. Graduação histológica e expressão de metaloproteinases (MMP-9 e MMP-2) e seus inibidores (TIP-1 e TIMP-2) na glândula mamária canina neoplástica. 2012.

FONSECA, J. J. S. Metodologia da pesquisa científica. Fortaleza: UEC, 2002.

FIDLER, M. M.; BRAY, F.; SOERJOMATARAM, I. The global cancer burden and human development: A review. *Scand J Public Health*. 46(1), p. 27-36, 2018.

FISHER, J. F.; MOBASHERY, S. Recent advances in MMP inhibitor design. **Cancêr Metástasis Reviews**, 25(1), 115–36, 2006.

FREITAS, D. M. EFEITO INIBITÓRIO EM METALOPROTEINASE DE MATRIZ. Instituto superior de ciências da saúde egas moniz mestrado integrado em ciências farmacêuticas. 2014.

GATTO, C.; RIEPPI, M.; BORSOTTI, P.; *et al.* BAY 12-9566, a novel inhibitor of matrix metalloproteinases with antiangiogenic activity. *Clin Cancer Res*. 5(11), p. 3603-7, 1999. PMID: 10589777.

GIRAUDO, E.; INOUE, M.; HANAHAN, D.; *et al.* An amino-bisphosphonate targets MMP-9 – expressing macrophages and angiogenesis to impair cervical carcinogenesis. v. 114, n. 5, p. 623–633, 2004.

GUIDO, R.V. C.; ANDRICOPULO, A. D.; OLIVA, G. Planejamento de fármacos, biotecnologia e química medicinal: Aplicações em doenças infecciosas. **Estudos Avançados**, v. 24, n. 70, p. 81–98, 2010.

GOLDBERG G. I.; EISEN A. Z. Extracellular matrix metalloproteinases in tumor invasion and metastasis. 1991.

GUPTA, S. P. Quantitative Structure–Activity Relationship Studies on Zinc-Containing Metalloproteinase Inhibitors. **Chemical Reviews**, v. 107, p. 3042-3087, 2007.

GROSS, J.; LAPIERE M. C. Collagenolytic Activity Amphibian Tissues: A Tissue Culture Assay. p. 1014–1022, 1962.

HAUSINGER, R. P. ScienceDirect New metal cofactors and recent metallocofactor insights. **Current Opinion in Structural Biology**, v. 59, p. 1–8, 2019.

HASHIMOTO, M.; KAWAI, K.; KAWAKAMI, H.; IMAZATO, S. Inibição de metaloproteases de matriz e biocompatibilidade de nanopartículas de ouro e platina. *J. Biomed. Mater. Res. Parte A*. 104 (1), p. 209–217, 2016.

HOLMES, S. *et al.* CMT3 Alters Mitochondrial Function in Murine Osteoclast Lineage Cells. **Biochemical And Biophysical Research Communications**, v. 365, n. 4, p. 840-845, 2008.

HOROZOLU, C.; ÖZDES, T.; ERGINEL, T.; *et al.* Expression of MMP-15 and MMP-24 in atherosclerotic and nonatherosclerotic coronary arteries. p. 15–20, 2014.

JACOBSEN, J. A.; JOURDEN, J. L. M.; MILLER, M. T.; COHEN, S. M. *Biochimica Et Biophysica Acta-Molecular Cell Research* 1803, p. 72-94.

KAPOOR, C.; VAID, S.; WADHWAN, V.; HITESH, K. G.; PATHAK, A. Gangorra de metaloproteinases de matriz (MMPs). **J Cancer Res Ther**, 2016.

LI, K.; TAY, F. R.; YIU, C. K. Y. The past, present and future perspectives of matrix metalloproteinase inhibitors. **Pharmacology and Therapeutics**, v. 207, p. 107465, 2020.

LIOTTA, A. L.; UNNUR, P. T.; GARBISA, S. Role of collagenases in tumor cell invasion. v. 288, p. 277–288, 1982.

LIU, Y. *et al.* The lipophilicity, pharmacokinetics, and cellular uptake of different chemically-modified tetracyclines (CMTs). **Current Medicinal Chemistry**. v. 8, n.3, p. 243-252, 2001.

LOKESHWAR, B. L.; ESCATEL, E.; ZHU, B. Q. Cytotoxic Activity and Inhibition of Tumor Cell Invasion by Derivatives of a Chemically Modified Tetracycline CMT-3 (COL3). **Current Medicinal Chemistry**, v. 8, n. 3, p. 271-279, 2001.

LUKACOVA, V.; ZHANG, Y.; MACKOV, M.; *et al.* Similarity of binding sites of human matrix metalloproteinases. **The Journal of Biological Chemistry**, 279(14), 14194–200, 2004.

MAGALHÃES, C. S. Algoritmos Genéticos para o Problema de Docking Proteína-Ligante. 2006. *Tese (Doutorado)* – Curso de Modelagem Computacional, Laboratório Nacional de Computação Científica, Petrópolis, RJ, 2006.

MARCIAL, B. L. Tetraciclina Quimicamente Modificada Como Inibidores De Metaloproteinases De Matriz (Mmps): Um Estudo De Estrutura, Reatividade, Dinâmica E Implicações Biológicas. 2013. *Tese (Doutorado em Química)* – Programa de Pós-Graduação em Química, Universidade de Juiz de Fora, Juiz de Fora.

MARCIAL, B. L.; *et al.* Chemically Modified Tetracyclines as Inhibitors Of MMP-2 Matrix Metalloproteinase: A Molecular and Structural Study. *Journal of Physical Chemistry B*, v. 116, n. 46, p. 13644-13654, 2012.

MATOS, K. S. L.; VIEIRA, S. V. **Pesquisa educacional: o prazer de conhecer**. Fortaleza: Demócrito Rocha, p. 143, 2001.

MCDONNELL, S.; FINGLETON, B. Role of matrix metalloproteinases in invasion, and metastasis: biology, diagnosis and inhibitors. **Cytotechnology**, v. 12, n. 1–3, p. 367–384, 1993.

MENG, Xuan-Yu; ZHANG, Hong-Xing; MEZEI, Mihaly; *et al.* Molecular Docking: A Powerful Approach for Structure-Based Drug Discovery. **Current Computer Aided-Drug Design**, v. 7, n. 2, p. 146–157, 2012.

MORGON, H. N.; COUTINHO, K. Métodos de química teórica e modelagem molecular. 1ª. ed. São Paulo: Livraria da física, 2007.

MORRIS, G. M. et al. Automated docking using a Lamarckian genetic algorithm and an empirical binding free energy function. **Journal of Computational Chemistry**, v. 19, n. 14, p. 1639-1662, 1998.

NAGASSE, H.; VISSE, R.; MURPHY, G. Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs. **Cardiovascular Research**, v. 69, p. 562–73, 2006.

NAR, H.; WERLE, K.; BAUER, M. M. T.; *et al.* Crystal Structure of Human Macrophage Elastase (MMP-12) in Complex with a Hydroxamic Acid Inhibitor. 2001.

NUTI, E.; TUCCINARDI, T.; ROSSELLO, A. Current Pharmaceutical Design. v. 13, p. 2087- 2100, 2007.

OGUT, D.; REEL, B.; KORKMAZ, C. G.; *et al.* Doxycycline down-regulates matrix metalloproteinase expression and inhibits NF- k B signaling in LPS-induced PC3 cells. v. 54, n. 4, p. 171–180, 2016.

PAGADALA, N. S.; SYED, K.; TUSZYNSKI, J. Software for molecular docking: a review. **Biophysical Reviews**, v. 9, n. 2, p. 91–102, 2017.

PEREIRA-MAIA, E. C.; SILVA, P. P.; ALMEIDA, W. B.; *et al.* Tetraciclina e glicilciclina: uma visão geral. **Química Nova**, v. 33, n. 3, p. 700–706, 2010.

PONDER, J. W.; CASE, D. A. FORCE FIELDS FOR PROTEIN SIMULATIONS. **Advances**, v. 66, p. 27–85, 2003.

RIVAS, E. C.; CAROLINA, M.; RAMOS, P. systematic review the role of enamelysin (MMP-20) in tooth development. v. 27, 2017.

ROUSELL *et al.* Crystal structure of human MMP9 in complex with a reverse hydroxamate inhibitor. **Journal of molecular biology**. v. 319, n. 1, p.173-183, 2002.

RYDLOVA, M; JR, L. H.; JR, M. L.; *et al.* Biological Activity and Clinical Implications of the Matrix Metalloproteinases. v. 1398, p. 1389–1397, 2008.

SANYAL, S.; AMIN, Sk A.; BANERJEE, P.; *et al.* A review of MMP-2 structures and binding mode analysis of its inhibitors to strategize structure-based drug design. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 74, p. 117044, 2022.

SERRA, P.; BRUCZKO, M.; ZAPICO, J. M. MMP-2 selectivity in hydroxamate-type inhibitors. Current medicinal chemistry, v.19(7), p.1036-1064, 2012.

SILVA, L. R. *et al.* MATRIX METALLOPROTEINASE 26 (MMP-26) OVEREXPRESSION IN 2 PROSTATIC ADENOCARCINOMA. p. 1–25, 2021.

SU, L., XU, W. Peptidomiméticos e inibidores de metaloprotease como drogas anticancerígenas. **Sci. China Ser. B-Química**. 52, p. 535-548, 2009.

- SHI, Y.; MA, X.; FANG, G.; *et al.* Matrix metalloproteinase inhibitors (MMPIs) as attractive therapeutic targets: Recent progress and current challenges. **NanoImpact**, v. 21, n. January, p. 100293, 2021.
- TALLANT, C.; MARRERO, A.; GOMIS-RÜTH, F. X. Matrix metalloproteinases: Fold and function of their catalytic domains. **BBA - Molecular Cell Research**, v. 1803, n. 1, p. 20–28, 2010.
- TURK, B. E.; LEE, D. H.; YAMAKOSHI, Y.; *et al.* MMP-20 is Predominately a Tooth-specific Enzyme with a Deep Catalytic Pocket that Hydrolyzes Type V Collagen. **NIH Public Access**. v. 45, n. 12, p. 3863–3874, 2008.
- WALLACE, A.; LASKOWSKI, R.; THORNTON, J. Ligplot: A program to generate schematic diagrams of protein-ligand interactions. **Protein Engineering**, v. 8, p. 127–134, 1995.
- WAHL, R.C.; DUNLAP, R.P.; MORGAN, B.A. Biochemistry and Inhibition of Collagenase and Stromelysin. *Annual reports in medicinal chemistry*. V. 25, p. 177-184, 1990.
- WHEELER, D. L. *et al.* Database resources of the National Center for Biotechnology Information. **Nucleic Acids Research**. v. 33, p. D39-D45, 2005.
- WINER, A.; ADAMS, S.; MIGNATTI, P. Matrix metalloproteinase inhibitors in cancer therapy: Turning past failures into future successes. **Molecular Cancer Therapeutics**, v. 17, n. 6, p. 1147–1155, 2018.
- WIESNER, L. **Modelagem Molecular De Novos Inibidores Das Metaloproteínas de Matriz (MMPs) Baseados Em Ligantes Não ZBGs Derivados Das Tetraciclinas**. 2019. TCC - Graduação em Química. Instituto Federal De Educação, Ciência e Tecnologia Goiano, Morrinhos.
- VERLI, H. **Bioinformática: da Biologia à Flexibilidade Molecular**. Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular. 1. ed. - São Paulo: SBBq, 2014.
- VERMA, R. P.; HANSCH, C. Matrix metalloproteinases (MMPs): Chemical – biological functions and (Q) SARs. v. 15, p. 2223–2268, 2007.
- VISSE, R.; NAGASE, H. *Matrix Metalloproteinases and Tissue Inhibitors of Metalloproteinases*. 2003.
- ZAPICO, J. M.; PUCKOWSKA, A.; FILIPIAK, K. Design and synthesis of potent hydroxamate inhibitors with increased selectivity within the gelatinase Family. **Organic & biomolecular chemistry**, v.13(1), p.142-156, 2015.

ANEXOS

Anexo 1: Coordenadas Cartesianas dos ligantes otimizados a nível B3LYP/6-1G(d) usados neste trabalho.

CMT-3				CMT-7				CMT-8				Doxiciclina			
1 C	0.914	-1.112	-0.734	1 C	-0.750	0.882	-0.762	1 C	-0.883	0.884	-0.598	1 C	-1.176	0.886	-0.339
2 C	1.045	0.379	-0.475	2 C	-0.853	-0.629	-0.604	2 C	-0.999	-0.626	-0.447	2 C	-1.361	-0.622	-0.330
3 C	2.347	0.909	-0.115	3 C	-2.133	-1.198	-0.261	3 C	-2.298	-1.183	-0.127	3 C	-2.711	-1.143	-0.212
4 C	3.435	-0.023	0.191	4 C	-3.248	-0.301	0.066	4 C	-3.391	-0.272	0.213	4 C	-3.805	-0.214	0.054
5 C	3.170	-1.408	0.355	5 C	-3.026	1.085	0.287	5 C	-3.120	1.093	0.509	5 C	-3.527	1.114	0.482
6 C	1.739	-1.895	0.295	6 C	-1.577	1.600	0.335	6 C	-1.659	1.541	0.581	6 C	-2.074	1.493	0.778
7 C	4.216	-2.283	0.614	7 C	-4.113	1.914	0.544	7 C	-4.185	1.947	0.769	7 C	-4.586	1.994	0.665
8 C	5.529	-1.801	0.721	8 C	-5.415	1.389	0.587	8 C	-5.505	1.467	0.747	8 C	-5.908	1.576	0.440
9 C	5.810	-0.450	0.586	9 C	-5.648	0.039	0.400	9 C	-5.784	0.136	0.494	9 C	-6.199	0.278	0.057
10 C	4.768	0.456	0.336	10 C	-4.567	-0.825	0.153	10 C	-4.728	-0.755	0.243	10 C	-5.152	-0.639	-0.121
11 C	-0.551	-1.566	-0.793	11 C	0.711	1.360	-0.837	11 C	0.577	1.371	-0.764	11 C	0.302	1.300	-0.262
12 C	-1.406	-0.596	-1.628	12 C	1.551	0.443	-1.741	12 C	1.430	0.384	-1.584	12 C	1.233	0.366	-1.091
13 C	-1.419	0.786	-0.966	13 C	1.599	-0.971	-1.141	13 C	1.462	-0.996	-0.928	13 C	1.135	-1.089	-0.611
14 C	-0.004	1.244	-0.656	14 C	0.212	-1.473	-0.836	14 C	0.054	-1.479	-0.652	14 C	-0.324	-1.503	-0.490
15 C	-2.276	0.800	0.343	15 C	2.503	-1.062	0.118	15 C	2.297	-0.999	0.393	15 C	1.874	-1.328	0.745
16 C	-3.444	-0.070	0.402	16 C	3.667	-0.178	0.182	16 C	3.465	-0.132	0.451	16 C	2.887	-0.368	1.165
17 C	-3.705	-0.967	-0.629	17 C	3.885	0.777	-0.803	17 C	3.730	0.757	-0.588	17 C	3.223	0.713	0.358
18 C	-2.844	-1.078	-1.851	18 C	2.973	0.962	-1.981	18 C	2.863	0.884	-1.804	18 C	2.687	0.896	-1.053
19 O	5.082	1.757	0.236	19 O	-4.843	-2.128	-0.002	19 O	-5.037	-2.042	0.028	19 O	-5.476	-1.894	-0.468
20 O	2.548	2.166	-0.070	20 O	-2.317	-2.460	-0.254	20 O	-2.496	-2.441	-0.159	20 O	-2.945	-2.388	-0.359
21 O	-2.045	1.699	-1.867	21 O	0.122	-2.794	-0.821	21 O	2.122	-1.886	-1.826	21 O	1.770	-1.945	-1.558
22 O	0.102	2.566	-0.581	22 O	2.240	-1.893	0.987	22 O	-0.045	-2.803	-0.631	22 O	-0.484	-2.819	-0.584
23 O	-1.972	1.598	1.234	23 C	4.655	-0.247	1.289	23 O	1.974	-1.786	1.289	23 O	1.589	-2.342	1.387
24 C	-4.394	-0.048	1.542	24 N	4.453	-1.137	2.273	24 C	4.416	-0.157	1.590	24 C	3.561	-0.463	2.485
25 N	-4.158	0.800	2.556	25 O	4.921	1.581	-0.795	25 N	4.167	-0.995	2.611	25 N	3.310	-1.528	3.259
26 O	-4.744	-1.766	-0.623	26 O	5.659	0.512	1.301	26 O	4.778	1.543	-0.587	26 O	4.034	1.661	0.764
27 O	-5.398	-0.808	1.557	27 H	-3.969	-2.591	-0.106	27 O	5.428	0.589	1.600	27 O	4.354	0.439	2.868
28 H	4.229	2.250	0.120	28 H	-3.974	2.976	0.707	28 H	-4.181	-2.533	-0.066	28 H	-4.634	-2.415	-0.487
29 H	4.014	-3.344	0.739	29 H	0.745	2.379	-1.239	29 H	-4.015	2.993	0.993	29 H	-4.407	3.013	0.984
30 H	-0.603	-2.571	-1.229	30 H	1.136	1.394	0.172	30 H	1.033	1.499	0.231	30 H	0.619	1.290	0.791
31 H	-0.956	-1.644	0.225	31 H	1.052	0.381	-2.717	31 H	0.950	0.274	-2.564	31 H	0.864	0.408	-2.119
32 H	-0.935	-0.473	-2.612	32 H	3.628	-1.731	2.237	32 H	1.883	-2.786	-1.540	32 H	1.450	-2.843	-1.355
33 H	-1.804	2.591	-1.561	33 H	5.129	-1.179	3.022	33 H	3.345	-1.592	2.571	33 H	2.667	-2.241	2.922
34 H	-3.341	1.404	2.514	34 H	-6.645	-0.385	0.446	34 H	4.827	-1.021	3.375	34 H	3.775	-1.587	4.154
35 H	-4.814	0.817	3.323	35 H	-6.251	2.056	0.780	35 H	-6.798	-0.251	0.494	35 H	-7.217	-0.062	-0.100
36 H	6.819	-0.062	0.679	36 H	-1.235	1.152	-1.715	36 H	-6.323	2.155	0.944	36 H	-6.719	2.285	0.581
37 H	6.341	-2.497	0.919	37 H	2.974	2.025	-2.246	37 H	-1.389	1.179	-1.531	37 H	-1.539	1.279	-1.302
38 H	1.362	-1.313	-1.722	38 C	-1.482	3.126	0.198	38 H	-1.239	1.107	1.503	38 H	-1.797	0.966	1.707
39 H	1.275	-1.777	1.287	39 H	-1.882	3.481	-0.758	39 H	2.863	1.928	-2.127	39 H	2.642	1.985	-1.235
40 H	1.718	-2.966	0.063	40 H	-2.032	3.626	1.002	40 H	3.333	0.294	-2.601	40 C	-1.877	2.991	1.039
41 H	-2.871	-2.117	-2.197	41 H	-0.441	3.441	0.285	41 O	0.632	2.597	-1.492	41 H	-2.116	3.597	0.160
42 H	-3.315	-0.470	-2.635	42 O	-0.983	1.205	1.585	42 H	0.245	3.298	-0.949	42 H	-2.507	3.317	1.873

43 H -1.569 1.511 2.296	43 C -1.490 3.062 0.696	43 H -0.843 3.205 1.315
44 H 3.428 0.434 -2.833	44 H -0.441 3.323 0.877	44 O 0.373 2.630 -0.785
45 H 2.042 -1.671 -1.865	45 H -1.846 3.588 -0.198	45 H 1.108 3.094 -0.358
	46 H -2.042 3.454 1.554	46 N 3.618 0.280 -2.020
		47 C 4.898 0.990 -2.064
		48 H 5.557 0.476 -2.768
		49 H 4.794 2.044 -2.391
		50 H 5.382 0.992 -1.087
		51 C 3.068 0.176 -3.372
		52 H 2.727 1.146 -3.782
		53 H 3.856 -0.205 -4.029
		54 H 2.248 -0.542 -3.398

Anexo 2: Arquivo da grid gerado pelo *autogrid* no programa Autodock® usada neste trabalho

npts 80 80 80	# num.grid points in xyz
gridfld MMP1.maps.fld	# grid_data_file
spacing 0.275	# spacing(A)
receptor_types A C Ca HD N OA SA Zn	# receptor atom types
ligand_types A C HD OA N	# ligand atom types
receptor MMP1.pdbqt	# macromolecule
gridcenter 14.791 29.686 23.203	# xyz-coordinates or auto
smooth 0.5	# store minimum energy w/in rad(A)
map MMP1.A.map	# atom-specific affinity map
map MMP1.C.map	# atom-specific affinity map
map MMP1.HD.map	# atom-specific affinity map
map MMP1.OA.map	# atom-specific affinity map
map MMP1.N.map	# atom-specific affinity map
elecmap MMP1.e.map	# electrostatic potential map
dsolvmap MMP1.d.map	# desolvation potential map
dielectric -0.1465	# <0, AD4 distance-dep.diel;>0, constant